



UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

In Biologia Molecolare e Applicata

**EFFETTO DELL'ESPOSIZIONE CRONICA AD ALTE
CONCENTRAZIONI DI GLUCOSIO SULLO STRESS
OSSIDATIVO IN CELLULE INTESTINALI**

**EFFECT OF CHRONIC EXPOSURE OF HIGH GLUCOSE ON
OXIDATIVE STRESS ON INTESTINAL CELLS**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Testasecca Valentina

Relatore:

Prof.ssa Bacchetti Tiziana

Correlatore:

Dott.ssa Morresi Camilla

Sessione autunnale

Anno Accademico 2018/2019

INDICE

PREMESSA E SCOPO DELLA TESI.....	5
1 RUOLO FISIO-PATOLOGICO DELLO STRESS OSSIDATIVO A LIVELLO INTESTINALE.....	7
1.1 Omeostasi intestinale	7
1.2 Tipi e fonti di radicali liberi nel tessuto intestinale.....	11
1.3 Perossidazione lipidica e radicali lipidici nel tratto intestinale.....	21
1.4 ROS e Apoptosi.....	24
1.5 Sistemi di difesa antiossidanti nel tratto gastrointestinale.....	33
1.6 Le malattie infiammatorie intestinali.....	41
1.7 Disfunzione mitocondriale nelle IBD.....	45
1.8 Stress ossidativo e IBD.....	51
1.9 Dieta e IBD.....	56
2 IPERGLICEMIA: UN FATTORE DI STRESS OSSIDATIVO.....	60
2.1 Reazione di Maillard.....	62
2.2 Disfunzione mitocondriale e stress ossidativo indotto dall'iperglicemia.....	68
PARTE SPERIMENTALE.....	76

3 MATERIALI E METODI	77
3.1 Modello sperimentale: linea cellulare CaCo-2.....	77
3.2 Trattamento delle cellule con il glucosio.....	79
3.3 Estrazione proteica totale e determinazione della concentrazione proteica mediante il saggio di Bradford.....	80
3.4 Western Blot.....	82
3.5 Valutazione della produzione di ROS.....	84
3.6 Valutazione della perossidazione lipidica.....	87
3.7 Valutazione dei composti di glicazione (AGEs).....	89
3.8 Saggio MTT.....	91
3.9 Livelli e attività delle caspasi.....	92
3.10 Valutazione dell'apoptosi.....	93
3.11 Valutazione delle attività degli enzimi antiossidanti.....	94
3.11.1 Saggio per la determinazione dell'espressione e dell'attività lattonasica della PON2.....	94
3.11.2 Valutazione della glutatione reduttasi.....	97
3.11.3 Valutazione della glutatione S-transferasi.....	97
3.11.4 Valutazione della glutatione perossidasi.....	98
3.11.5 Valutazione dell'attività della catalasi.....	99

3.12	Analisi statistiche.....	100
4	RISULTATI.....	101
4.1	Effetto del trattamento ad alte concentrazioni di glucosio sulla formazione di ROS intracellulari e perossidazione lipidica.....	101
4.2	Effetto del trattamento ad alte concentrazioni di glucosio sulla formazione di composti di glicazione (AGEs)	104
4.3	Effetto del trattamento ad alte concentrazioni di glucosio su MTT.....	109
4.4	Effetto del trattamento ad alte concentrazioni di glucosio sui livelli e attività delle caspasi.....	111
4.5	Effetto del trattamento ad alte concentrazioni di glucosio sull'apoptosi.....	115
4.6	Effetto del trattamento ad alte concentrazioni di glucosio sull'espressione e attività di enzimi cellulari antiossidanti.....	117
5	DISCUSSIONE.....	122
6	BIBLIOGRAFIA.....	129

PREMESSA E SCOPO DELLA TESI

Molti studi hanno precedentemente dimostrato una stretta correlazione tra l'iperglicemia e l'aumento dello stress ossidativo che nell'insieme determinano un'accelerazione della reazione di glicazione non enzimatica con la formazione di proteine glicate e di prodotti di glicazione avanzata (AGEs); un processo che nell'insieme viene definito glico-ossidazione. Questo causa delle alterazioni alle principali macromolecole e contribuisce con meccanismi diversi alla disfunzione cellulare e subcellulare (Fiordaliso et al, 2004).

In particolare la mucosa intestinale è soggetta ad un elevato stress glico-ossidativo proprio per la sua continua esposizione alle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e agli AGEs di origine endogena ed esogena (Halliwell et al., 2000). I danni indotti dall'ossidazione a livello intestinale portano pertanto ad alterazioni della funzionalità della barriera intestinale e alla compromissione della sua integrità determinando così la perdita dell'omeostasi intestinale e sviluppando numerose infezioni e malattie intestinali infiammatorie come il morbo di Crohn e la colite ulcerosa (Kruidenier et al., 2002; Rezaie, et al 2007).

Le cellule intestinali, tuttavia, possiedono vari sistemi antiossidanti endogeni che concorrono in condizioni fisiologiche a proteggere gli enterociti e a mantenere l'integrità della mucosa intestinale, tra questi la glutazione S-

transferasi, la glutatione reduttasi, la glutatione perossidasi, la catalasi e la paraoxonasi-2 (PON2).

Poiché non ci sono studi che valutano lo stress ossidativo a livello intestinale in condizioni di iperglicemia, lo scopo della presente tesi è investigare l'effetto dell'esposizione cronica al glucosio a livello intestinale utilizzando come modello cellulare le cellule intestinali tumorali (CaCo-2, Carcinoma COlorectal cells). In particolare si è valutato il livello di stress ossidativo indotto dall'esposizione cronica al glucosio, analizzando la produzione di ROS a livello intracellulare, i prodotti di glicazione non enzimatica e di perossidazione lipidica e di contro l'espressione e l'attività di alcuni enzimi antiossidanti endogeni per dare una visione d'insieme riguardo alla condizione di stress ossidativo che si instaura a livello intestinale in condizione di iperglicemia. Inoltre sono stati investigati anche gli effetti sull'attivazione di meccanismi pro-apoptotici.

1. RUOLO FISIO-PATOLOGICO DELLO STRESS OSSIDATIVO A LIVELLO INTESTINALE

1.1 Omeostasi intestinale

L'epitelio intestinale mostra sia funzioni organo-specifiche che immunitarie giocando un ruolo importante sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Le cellule epiteliali formano una barriera a livello cellulare essenziale per il mantenimento dell'omeostasi mucosale. Questa barriera viene mantenuta dalle giunzioni strette e aderenti e dai desmosomi. Inoltre a comporre l'epitelio intestinale ci sono le cellule di Paneth, quelle a forma di calice, le cellule assorbitive e le cellule enteroendocrine che sono le quattro cellule secretorie più importanti.

La permeabilità intestinale permette di assorbire i nutrienti che derivano dalla precedente digestione dei cibi introdotti con la dieta ma allo stesso tempo risulta essere selettiva in quanto non permette l'entrata di patogeni (Beisner et al. 2010).

Durante l'omeostasi intestinale le cellule intestinali epiteliali vengono protette dal contenuto del lume, sia dalle cellule a forma di calice tramite la produzione di uno strato mucoso, sia dalle cellule di Paneth con la produzione e il rilascio

di peptidi antimicrobici. In questo stato fisiologico i mitocondri sono ben formati con creste mitocondriali ben sviluppate, mentre le giunzioni strette inibiscono la traslocazione degli antigeni presenti nel lume attraverso la barriera epiteliale; le specie reattive dell'ossigeno (ROS) che si formano sono, invece, neutralizzate dagli antiossidanti endogeni, mentre i leucociti che si trovano a livello della lamina propria non innescano nessun meccanismo immunitario.

Quando la permeabilità è eccessiva si instaurano delle condizioni di infiammazione che possono portare all'insorgenza di patologie. In queste condizioni di infiammazione intestinale accade che lo strato mucoso si riduce e la produzione di peptidi antimicrobici diminuisce esponendo l'epitelio intestinale ai microrganismi e agli antigeni presenti nel lume. I mitocondri aumentano di dimensioni e presentano creste che diventano irregolari e assumono una forma anomala, portando così ad una riduzione della produzione di ATP aumentando invece quella dei ROS. Di conseguenza si ha un aumento della permeabilità epiteliale che permette la traslocazione dei batteri e degli antigeni luminali all'interno della mucosa intestinale. Il risultato di ciò determina l'infiltrazione delle cellule immunitarie che comporta un ulteriore aumento dei ROS. Da queste cellule vengono rilasciate IL-8 e IL-1B, mentre le interazioni tra le cellule immunitarie e quelle batteriche rilasciano mediatori

pro-infiammatori influenzando l'epitelio intestinale in tutte le sue componenti (Elizabeth A. Novak and Kevin P. Mollen, 2015) (Figura 1).

In particolare, in diversi studi riguardanti pazienti con infiammazioni intestinali sono stati osservati mitocondri anomali che hanno sviluppato processi quali l'autofagia, lo stress del reticolo endoplasmatico e la produzione irregolare di ROS (Novak 2015).

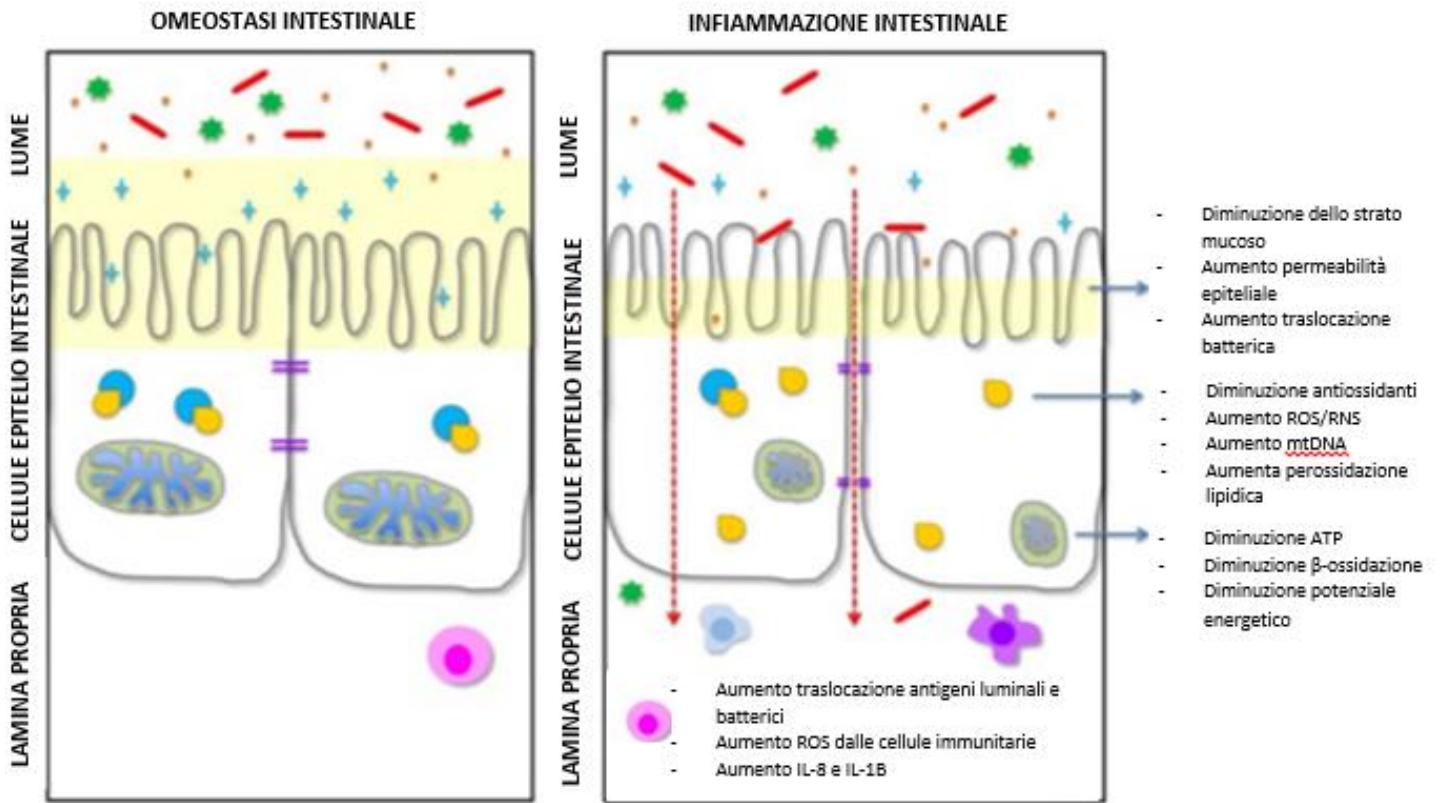


Figura 1: funzione delle cellule epiteliali intestinali e omeostasi intestinale che possono essere influenzate dalla disfunzione mitocondriale (fonte Novak et al. 2005)

1.2 Tipi e fonti di radicali liberi nel tessuto intestinale

In condizioni fisiologiche, sia i ROS che le specie reattive dell'azoto (RNS) vengono prodotti in concentrazioni medio-basse come molecole segnale coinvolte nella risposta mitogenica o in difesa contro agenti infettanti. Eccessive produzioni di questi radicali liberi o un inefficiente scavenging di essi conduce al cosiddetto stress ossidativo e/o nitrosativo.

Lo stress ossidativo è implicato in molte malattie umane incluse quelle intestinali, quali le IBD e il cancro al colon-retto.

Il fatto che il lume intestinale e l'epitelio siano continuamente esposti a stimoli, (nutrienti ingeriti, microrganismi che vivono nell'intestino, infezioni, acido gastrico, periodi di ischemia/riperfusion), determina la generazione di radicali sia dell'ossigeno che dell'azoto (Parks, 1989; Young and Woodside, 2001).

I ROS rappresentano la maggior parte dei radicali che, se prodotti in eccesso, danneggiano i sistemi biologici; più precisamente possono dare il via a reazioni autocatalitiche in modo tale che le molecole con le quali reagiscono sono esse stesse convertite in radicali liberi che, a loro volta, sono in grado di propagare il danno (Rahman, 2007).

L'infiltrazione di leucociti, monociti e neutrofilo durante l'infiammazione può ulteriormente incoraggiare la produzione di ROS a livello intestinale attraverso

il burst respiratorio e il metabolismo delle prostaglandine e dei leucotrieni (Babbs C.F., 1992), andando ad infiammare ancor di più l'intestino e innescando una cascata di reazioni che portano all'infiammazione e/o all'apoptosi (figura 2):

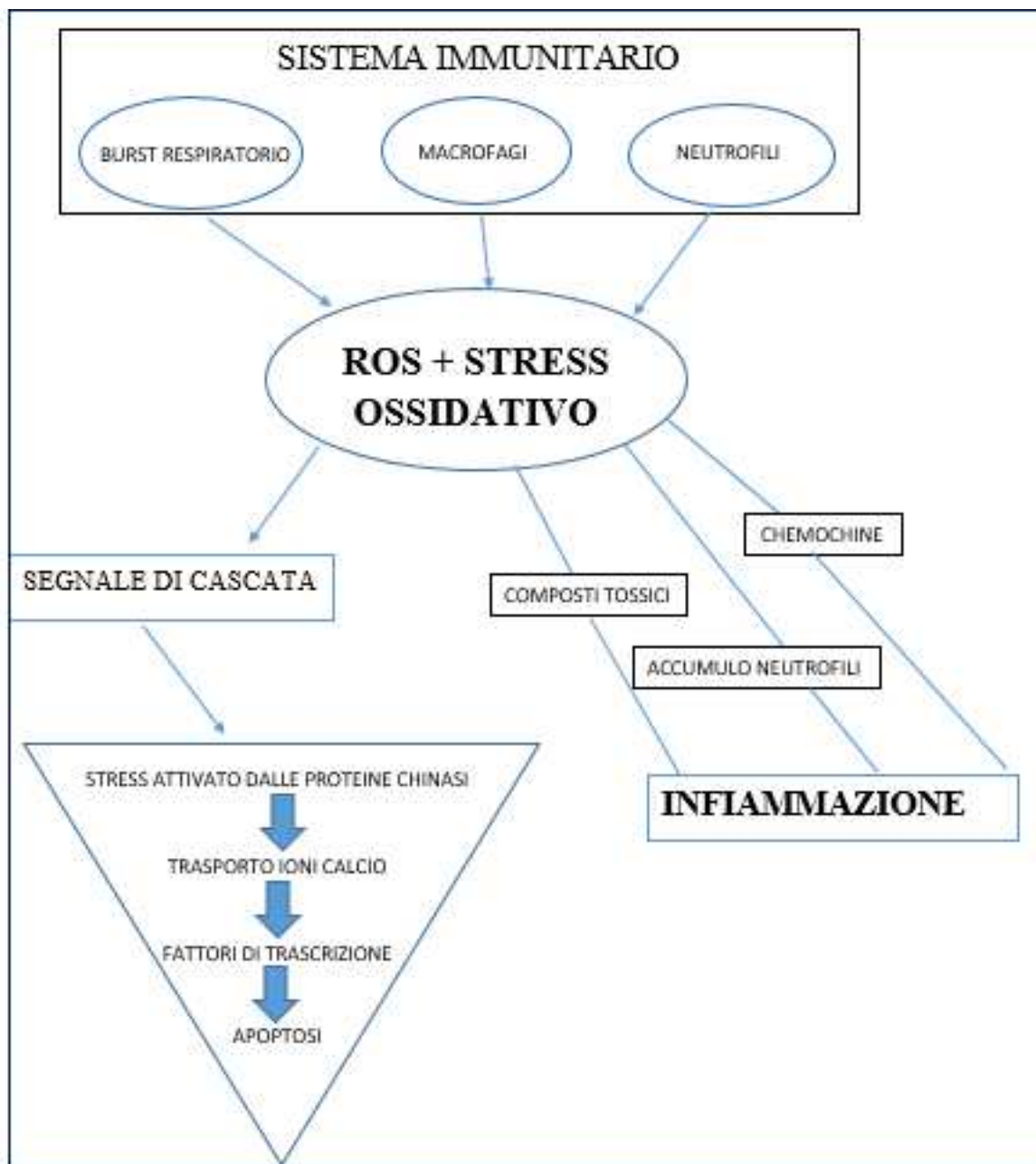


Figura 2: Origine dei ROS da parte del sistema immunitario e loro effetti (Balmus et al. 2016)

Tra le varie specie reattive prodotte, il più abbondante radicale libero nei tessuti umani è l'anione superossido($O_2^{\bullet -}$) generato dall'aggiunta di un elettrone alla molecola di ossigeno.

L'anione superossido è molto reattivo, altamente instabile e ha un'emivita molto breve; per questo motivo reagisce molto velocemente con le molecole che trova rendendo la membrana impermeabile. In condizioni fisiologiche, esso viene convertito in un'altra specie reattiva, cioè in perossido di idrogeno (H_2O_2) nella reazione catalizzata dalla catalasi e/o dalla glutatione perossidasi. L' H_2O_2 , prodotto invece dai neutrofili, viene utilizzata dalla mieloperossidasi (MPO) per produrre lo ione ipoclorito (OCl^-). Un'aumentata attività della MPO è stata misurata nella mucosa infiammata delle coliti ulcerative, contribuendo probabilmente alla progressione della malattia (Ullman TA et al. 2011).

Sempre in condizioni fisiologiche il perossido di idrogeno (H_2O_2) prodotto dai perossisomi viene convertito in H_2O dalla catalasi; quando essi però si danneggiano rilasciano H_2O_2 direttamente nel citoplasma, contribuendo allo squilibrio ossidativo.

Il perossido di idrogeno a differenza dell'anione superossido può diffondersi attraverso le membrane cellulari, ossidando composti localizzati altrove. La diffusione di H_2O_2 nel tratto gastrointestinale è facilitato dall'acquaporina 8.

La principale fonte di anione superossido nella cellula deriva invece dai complessi I e III della catena di trasporto degli elettroni, i quali convertono dall'1 al 3% dell'ossigeno totale in anione superossido (Miller et al. 1990).

Un'altra fonte di anione superossido è rappresentata dalla xantina ossidasi, localizzata a livello della membrana plasmatica esterna e nel citoplasma, la quale catalizza l'ossidazione dell'ipoxantina in xantina e poi in acido urico durante il catabolismo delle purine. Esso viene poi convertito in H_2O_2 nella reazione catalizzata dalla catalasi e/o dalla glutatione perossidasi.

Questo enzima è principalmente espresso a livello del fegato e nella mucosa del piccolo intestino; durante gli eventi di ischemia/riperfusion è il principale componente dell'infiammazione intestinale e in stati patologici la xantina ossidasi circolante si lega alle cellule endoteliali vascolari, producendo delle ferite ossidative sito-specifiche del tessuto intestinale (Yokoyama Y. et al. 1993).

Anche il complesso della NADPH ossidasi, presente a livello della membrana plasmatica, rilascia nello spazio extracellulare $O_2^{\cdot-}$. Esso è coinvolto nel burst respiratorio, un processo attraverso cui le cellule fagocitiche consumano grandi quantità di ossigeno per la loro attività chiamata fagocitosi, attivando appunto la NADPH ossidasi che porta al rilascio di anione superossido (Babior BM,

Kipnes RS, Curnutte JT 1973). Vi sono sei omologhi della NADPH ossidasi, di cui due (NOX1 e DUOX2) svolgono ruoli importanti nelle patologie gastrointestinali, come le IBD e lo sviluppo del cancro. In particolare NOX1 è altamente espresso nell'epitelio del colon (Dutta S, Rittinger K, 2010). Quando è attivato, NOX1 catalizza il trasporto di elettroni transmembrana a due molecole di ossigeno formando l'anione superossido. Quest'attivazione potrebbe portare a livello del lume del colon ad aumentare le difese dell'ospite (Geiszt. M et al. 2003).

In condizioni di stress, l'anione superossido aumentando le sue concentrazioni inizia a produrre in maniera eccessiva il radicale idrossile ($\text{OH}\cdot$) attraverso la reazione di Haber-Weiss.

Il radicale idrossile viene anche generato nella reazione di Fenton ed è catalizzato dallo ione ferroso (Fe^{2+}) in presenza di perossido di idrogeno. Anche altri metalli di transizione quali rame, cromo o cobalto possono partecipare alla produzione di radicale idrossile, che in condizioni di stress ossidativo diventano una fonte di generazione di questo radicale.

Nel tratto gastrointestinale il radicale idrossile inattiva la piruvato deidrogenasi, un enzima mitocondriale che depolimerizza la mucina gastrointestinale e causa danni a livello dell'RNA e del DNA mitocondriale (Tabatabaie T et al. 1996).

Un'altra forma protonata dell'anione superossido, oltre al radicale idrossile, è rappresentata dal radicale perossile ($\text{HOO}\cdot$), il quale funge da innesco per l'inizio della perossidazione lipidica. Questo determina un'alterazione dell'integrità, della fluidità e permeabilità delle membrane con modifica anche delle lipoproteine in forme pro-infiammatorie e generando dei prodotti potenzialmente tossici, con proprietà mutagene e cancerogene (Poli G et al. 2008; Winczura A et al. 2012).

Un altro gruppo di radicali liberi è rappresentato dalle specie reattive dell'azoto (RNS, reactive nitrogen species) rappresentato per lo più dai sottoprodotti dell'ossido nitrico sintasi (NOS), espresso in cellule specifiche della sottomucosa intestinale e delle regioni della mucosa. Questo enzima catalizza l'ossidazione dell'arginina in citrullina e forma il radicale ossido nitrico ($\text{NO}\cdot$). Questo radicale ha un'emivita relativamente lunga ma il suo tempo di reazione è breve, in quanto si diffonde rapidamente nel circolo sanguigno e viene inattivato dall'emoglobina. L'ossido nitrico è vitale per il funzionamento dell'organismo, in quanto coinvolto nella neurotrasmissione, nella regolazione della pressione sanguigna e nell'immunomodulazione. L'azione vasodilatatoria dell'ossido nitrico gioca un ruolo importante nell'iperemia, catalizzata dall'isoforma endoteliale dell'enzima NOS, localizzata nei capillari dell'interfaccia mucosa-sottomucosa (Matheson et al. 2000). L'isoforma

inducibile, chiamata iNOS, viene rilevata solo in tessuti infiammati ed è responsabile di un'eccessiva generazione di RNS da parte di macrofagi attivati, leucociti e cellule epiteliali nella mucosa intestinale (Binion 2000).

È stato anche dimostrato che nelle coliti ulcerose, l'attivazione di iNOS/cicloossigenasi-2/5-lipoossigenasi, con un'aumentata produzione di prodotti finali, quali prostaglandine-E2 e leucotrieni B₄, contribuiscono al danno della mucosa dell'intestino crasso con un'eccessiva produzione di radicali liberi e una diminuzione dei sistemi antiossidanti.

La reazione tra ossido nitrico e anione superossido conduce alla produzione di perossinitrito (ONOO⁻), un agente ossidante molto forte che può addirittura causare la frammentazione del DNA e l'ossidazione lipidica. A livello intestinale, questo radicale si forma in casi di risposta infiammatoria stimolata dai leucociti.

Nella tabella seguente sono riassunte tutte le reazioni enzimatiche che partecipano alla generazione di ROS/NOS nel tratto gastrointestinale (Tabella 1, fonte Piechota-Polanczyk 2014):

Enzimi	Reazione	Sito di azione
Complesso I e III/ubichinone della catena di trasporto mitocondriale	Complesso I (NADH deidrogenasi): $O_2 + NADH \rightarrow O_2^- + NAD^+$ Complesso III (citocromo bc1): $O_2 \rightarrow O_2^-$	Mitocondri
Xantina ossidasi	$Xantina + O_2 + NADPH \rightarrow O_2^- + H_2O_2 + NADP^+ + \text{acido urico}$	Plasma e citoplasma delle cellule epiteliali
NADPH ossidasi	$2 O_2 + NADPH \rightarrow 2 O_2^- + NADP^+ + H^+$	Membrana cellulare
Reazione di Haber-Weiss	$H_2O_2 + O_2^- \rightarrow O_2 + OH + OH\cdot$	Plasma e citoplasma delle cellule
Reazione di Fenton	$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH + OH\cdot$	Plasma e citoplasma delle cellule
Ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS)	$L\text{-arginina} + O_2 \rightarrow L\text{-citrullina} + NO\cdot$	Membrana cellulare delle cellule endoteliali
Ossido nitrico sintasi inducibile	$NO\cdot + O_2^- \rightarrow ONOO^-$	Citoplasma delle cellule epiteliali e infiammatorie

Tabella 1: reazioni enzimatiche che generano ROS e RNS nel tratto GI

In particolare, si è notato che i livelli basali di produzione dei ROS negli enterociti differiscono a seconda del tratto GI di cui si parla: la concentrazione è più bassa nel piccolo intestino e più alta nel colon (Sanders et al. 2004). Le differenze nella generazione di ROS possono così influenzare i livelli di proteine e lipidi ossidati e il danno al DNA, contribuendo ad una più alta suscettibilità del colon alle malattie GI (Piechota-Polanczyk et al. 2014).

L'innescò dello stress ossidativo può derivare anche da fonti esterne con effetti diretti o indiretti a livello intestinale. Nella figura 3 sono elencate le varie fonti, sia endogene (spiegate precedentemente) che esogene capaci di produrre ROS:

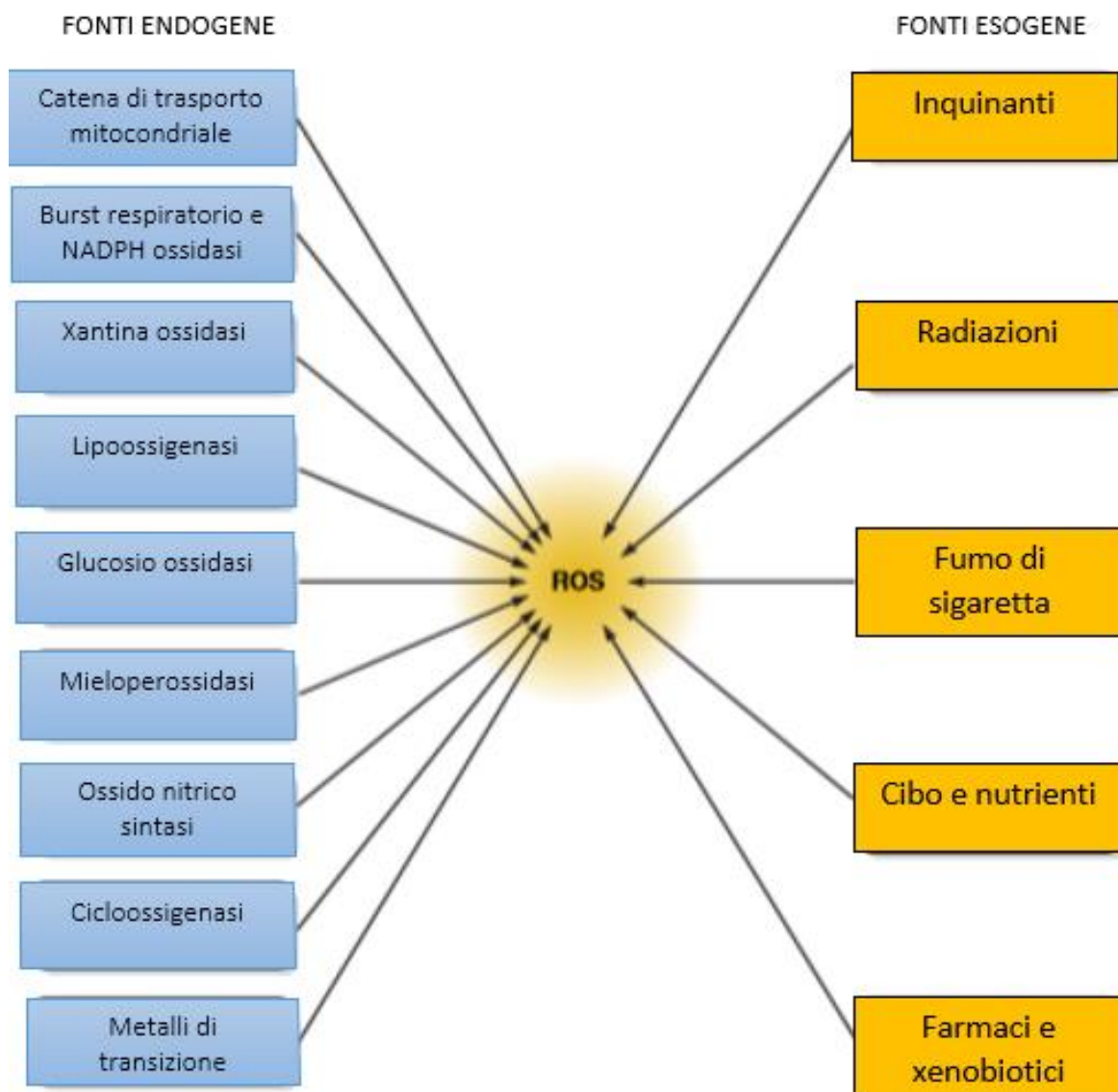


Figura 3: fonti endogene ed esogene di ROS (Bhattacharyya et al. 2014)

Per quanto riguarda le esogene, alti livelli di radiazioni ionizzanti possono causare problemi a livello gastrointestinale fino alla morte delle cellule dell'epitelio, in quanto riducono anche i livelli di vitamina E e di beta-carotene, aumentando di conseguenza lo stress ossidativo (Clemens et al. 1990).

Il fumo di sigaretta è un altro generatore di ROS ed è associato a varie patologie gastrointestinali come ulcere peptiche e malattia di Crohn.

Anche il cibo con i suoi nutrienti, una volta ingeriti possono generare anione superossido e perossido di idrogeno nel tratto gastrointestinale. Ad esempio, i lipidi di origine animale e vegetale, quando trattati nel forno a microonde, generano radicali liberi.

I farmaci e gli xenobiotici anch'essi portano alla produzione di ROS; ne sono esempi le antracicline e analoghi, l'aspirina e gli antipiretici, gli analgesici come l'ibuprofene e il naproxene.

1.3 Perossidazione lipidica e radicali lipidici a livello intestinale

Sia i ROS che gli RNS, tra le varie reazioni a cui partecipano, possono contribuire alla perossidazione lipidica. Infatti, sia le membrane lipidiche che le lipoproteine, in quanto ricche di acidi grassi poliinsaturi, sono particolarmente suscettibili allo stress ossidativo. Questo può portare o ad

alterare la struttura delle biomembrane e delle lipoproteine attraverso il disturbo delle interazioni lipidi-lipidi e lipidi-proteine oppure alla generazione di radicali idroperossidi e di derivati reattivi dell'aldeide.

Il processo generale di perossidazione lipidica consiste di tre fasi: inizio, propagazione e terminazione (Català A. 2006) (figura 4).

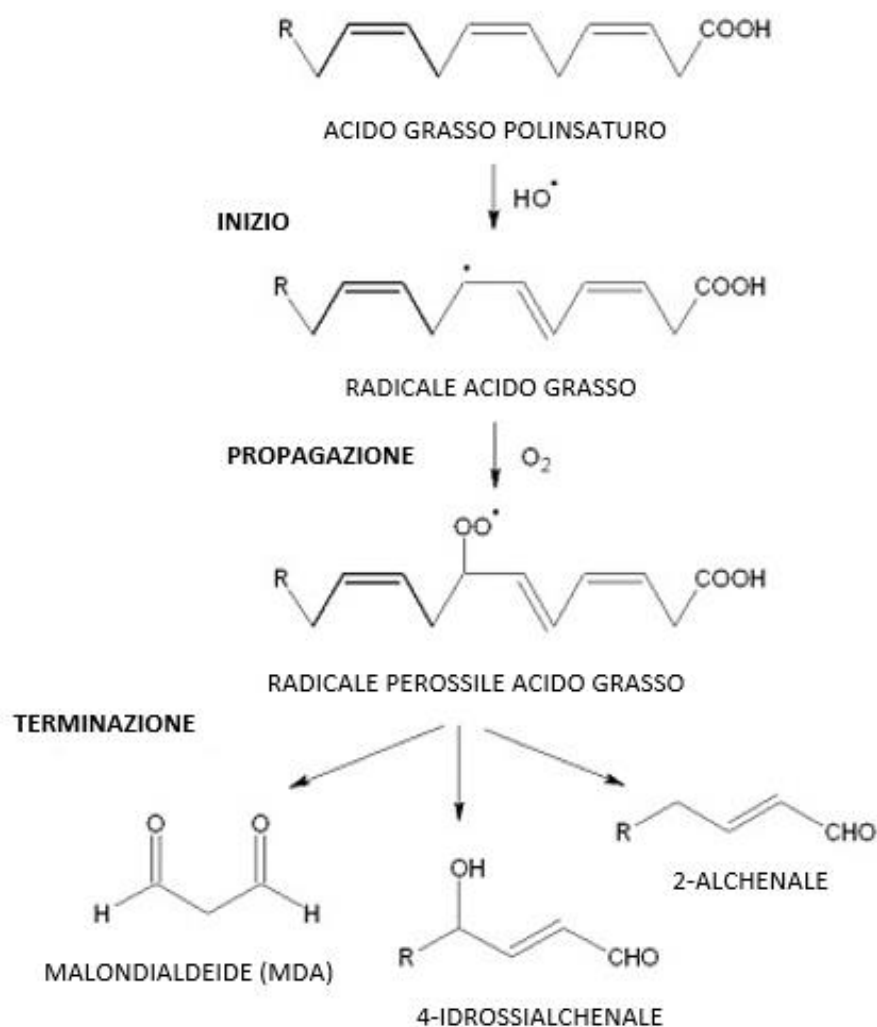


Figura 4: fasi della perossidazione lipidica (fonte chimicamo)

La fase di inizio della perossidazione lipidica include l'estrazione degli atomi di idrogeno. Parecchie specie reattive, tra cui i radicali idrossile, alcossile e perossile, possono estrarre il primo atomo di idrogeno dai fosfolipidi della membrana lipidica, i quali contengono acidi grassi poliinsaturi. Ciò viene fatto a partire da un gruppo metilenico lasciando così un elettrone spaiato al carbonio. Da qui l'ossigeno o una sua specie reattiva si lega a questo perossile, formando i perossidi attraverso una cascata di reazioni che si propaga lungo tutta la membrana fosfolipidica arrivando alla fine con dei composti completamente ossidati, causando un danno alla cellula.

I prodotti finali della perossidazione lipidica, come la malondialdeide o il 4-idrossinonenale, possono causare un danno alle proteine in seguito alla reazione con ad esempio i gruppi aminici della lisina, dell'imidazolo dell'istidina o dei gruppi sulfidrilici della cisteina (Catala A. 2009).

Sebbene la perossidazione lipidica avvenga in tutti i pazienti con IBD, essa potrebbe avere origini differenti a seconda del tipo di IBD stesso.

È stato dimostrato, infatti, che nel morbo di Crohn la perossidazione lipidica è associata con l'attività della superossido dismutasi mitocondriale, suggerendo il coinvolgimento di OH^\bullet e di $\text{O}_2^{\bullet-}$, mentre nelle coliti ulcerose la quantità di

prodotti della perossidazione lipidica è associata con l'espressione CAT epiteliale e con l'attività della mieloperossidasi neutrofila, suggerendo un meccanismo mediato dal perossido di idrogeno e/o dallo ione ipocloroso.

1.4 ROS e apoptosi

Le specie reattive dell'ossigeno e i mitocondri giocano un ruolo importante anche nell'induzione dell'apoptosi sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

L'apoptosi è un fenomeno biologico che consiste in una sequenza programmata di eventi biochimici che culminano nell'eliminazione selettiva delle cellule danneggiate, infettate o potenzialmente neoplastiche (Reed JC, 1999). Questa modalità di morte cellulare viene chiamata programmata ed è una componente dello sviluppo e del mantenimento dei tessuti (Vaux, 1999), così come un meccanismo di difesa per lo sviluppo e l'avanzamento del cancro.

L'apoptosi è sotto uno stringente controllo genetico e può essere attivato da stimoli provenienti da diverse fonti. È iniziato in risposta a segnali ambientali specifici o da stimoli, come l'attivazione del TNFR (Tumor Necrosis Factor receptors), da un danno al DNA o come detto dai ROS.

Un'eccessiva o limitata apoptosi può distruggere l'omeostasi tissutale degli organismi multicellulari.

L'apoptosi tipicamente avviene attraverso una delle tre vie di segnale, definite: via intrinseca, via estrinseca e via mista.

Per quanto riguarda la *via intrinseca*, i segnali di morte intracellulare sono traslocati nei mitocondri dove attivano questa prima modalità di apoptosi. In particolare gli stimoli apoptotici attivano p53. A sua volta quest'ultimo attiva le proteine pro-apoptotiche Bcl-2 che a turno formano canali permeabili nella membrana mitocondriale esterna. Questi canali permeabili facilitano il rilascio di proteine apoptogeniche (Diablo/Smac e il citocromo c) dallo spazio intermembrana mitocondriale al citosol. Qui, il citocromo c attiva prima l'apaf-1 (apoptotic protease factor 1), che promuove a sua volta la transizione delle procaspasi in caspasi culminando poi nell'evento dell'apoptosi, mentre Diablo/Smac interagisce con le IAPs impedendo la loro abilità a inibire le caspasi, favorendo anch'esso l'apoptosi. Nel momento del rilascio nel citosol, Diablo/Smac e il citocromo c inducono una cascata di reazione delle caspasi che culminano nell'evento dell'apoptosi (Coultas et al. 2003).

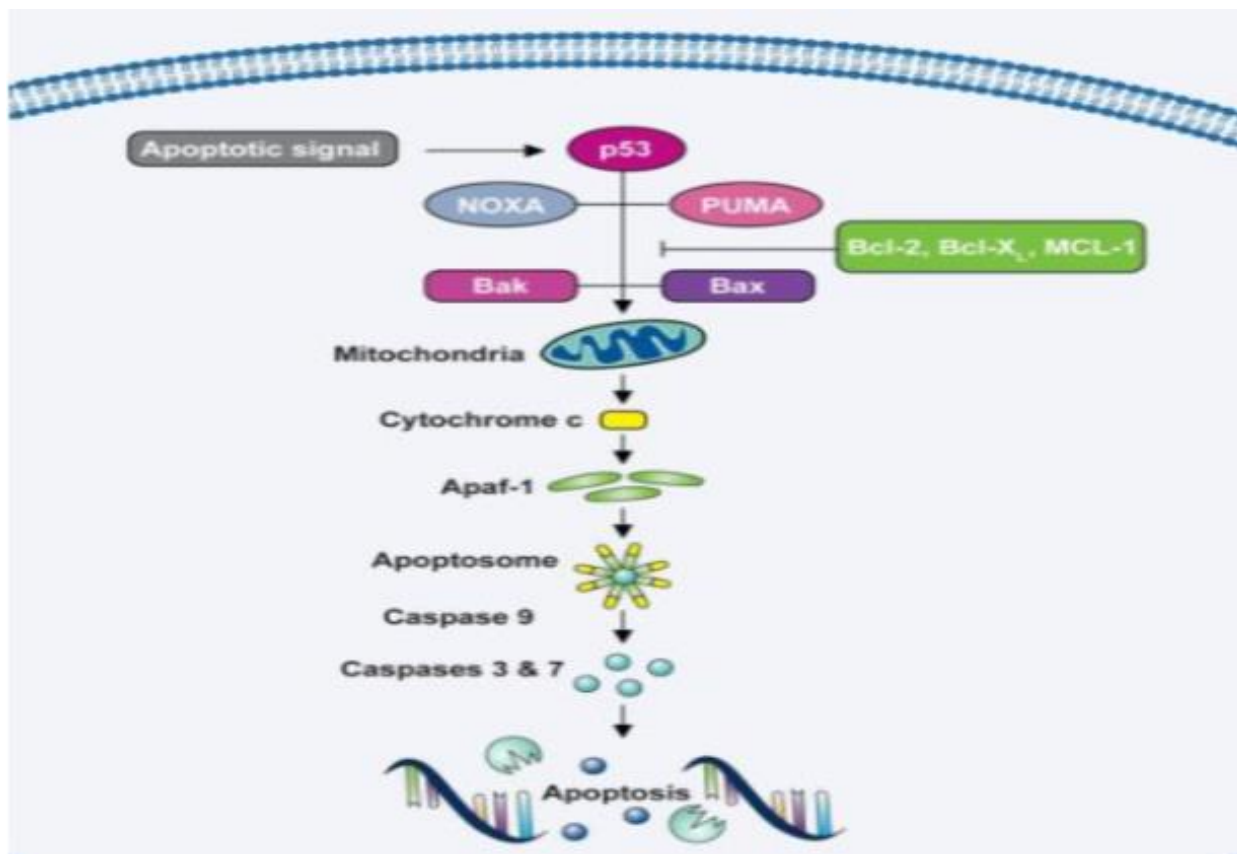


Figura 5: Via intrinseca mitocondriale dell'apoptosi. (Fonte: Dr. Mohd Saquib Khan)

Al contrario della via intrinseca, i segnali di morte della **via estrinseca** iniziano all'esterno della cellula. L'induzione della via estrinseca non coinvolge il mitocondrio né le proteine Bcl-2, né il rilascio del citocromo c dallo spazio intermembrana al citosol. In questa via, i specifici ligandi di morte come il fattore di necrosi tumorale (TNF), Fas Ligand o il ligando che induce l'apoptosi correlato a TNF (TRAIL), si legano ai loro specifici recettori di morte transmembrana (Wajant H 2002).

Il legame dei ligandi di morte ai loro recettori specifici promuove la raccolta e il reclutamento del dominio di morte associato alla proteina adattatrice Fas e alle forme inattive delle caspasi 8 e 10 iniziatrici (pro-caspasi 8 e 10), permettendo così la formazione del complesso di signalling che induce la morte (DISC). Il DISC trasporta a questo punto le molecole procaspasi in stretta prossimità assicurando l'accesso per la loro autocatalisi e l'eventuale rilascio nel citosol. Le caspasi 8 e 10 attiveranno poi le caspasi effettrici 3 e 7 in una cascata che culminerà nell'apoptosi (Wang et al 2001; Bao et al. 2007).

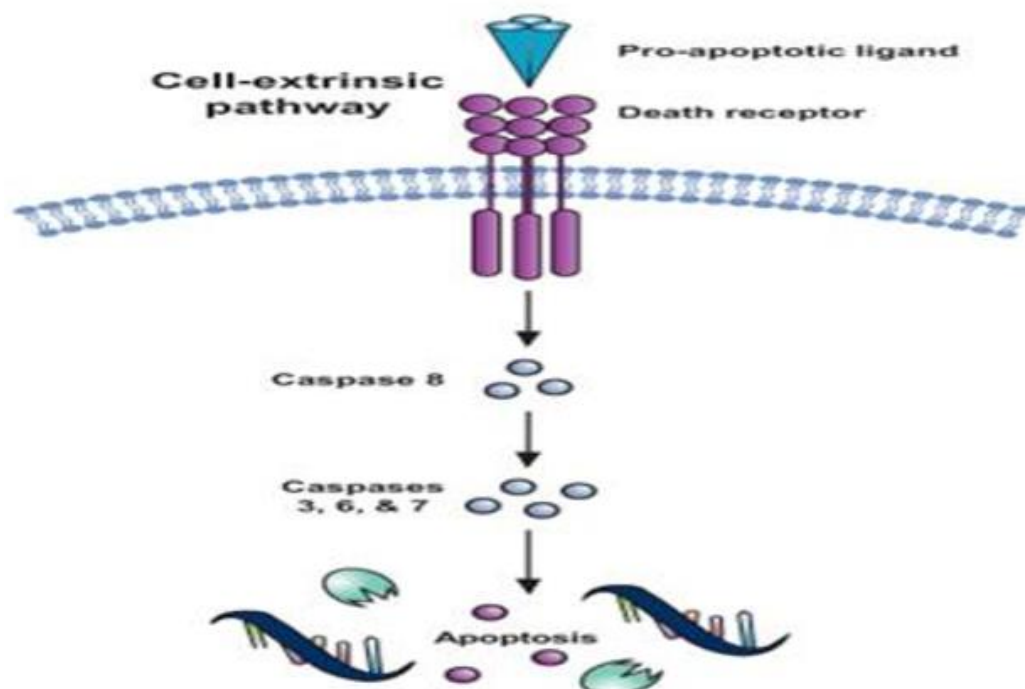


Figura 6: Via estrinseca dell'apoptosi (fonte: Dr. Mohd Saquib Khan)

La *via mista* di apoptosi è un fenomeno, invece, attraverso cui l'induzione della cascata di segnalazione apoptotica da fonti esterne provoca l'attivazione sia della via intrinseca che della via estrinseca. Essa comporta che gli stimoli generati extracellularmente causino l'attivazione delle pro caspasi 8 e 10 e la formazione del DISC, come per la via estrinseca. La formazione del DISC comporta l'autocatalisi e l'eventuale attivazione delle caspasi 8 e 10. Quando la caspasi 8 è attivata, si possono prendere una delle due vie: o si possono attivare le caspasi effettrici 3, 6 e 7 rientrando nella via estrinseca oppure può entrare in gioco la famiglia di proteine Bcl-2 prendendo la via intrinseca (Bao et al. 2007) (Figura 7).

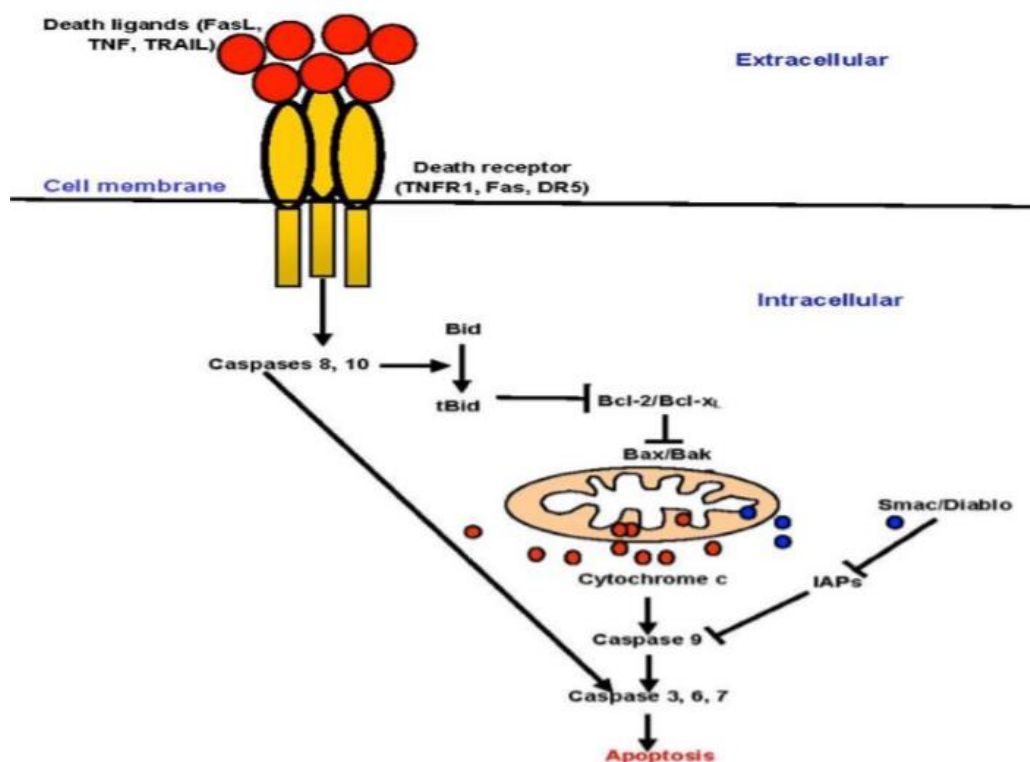


Figura 7: via mista dell'apoptosi (fonte Mackallan Neely 2017)

Tra i regolatori primari dell'apoptosi giocano quindi un ruolo importante le caspasi; esse costituiscono un gruppo di proteasi della cisteina che tagliano le proteine a siti che sono prossimi ai residui dell'acido aspartico. L'attivazione delle caspasi è considerata una caratteristica dell'apoptosi.

In particolare, le caspasi esistono in forma inattiva, sotto forma di pro-caspasi e si attivano durante l'apoptosi grazie alle proteine pro-apoptotiche (Shi Y. et al, 2004).

Tra le caspasi identificate non tutte giocano un ruolo nel regolare l'apoptosi. Quelle che partecipano alla regolazione sono divise in due classi: quelle iniziatrici e quelle effettrici. Le caspasi iniziatrici includono le caspasi 2, 8, 9 e 10 e sono attivate in risposta a stimoli apoptotici. Esse tagliano e processano le caspasi effettrici che sono la 3, la 6 e la 7. Al momento del taglio, esse innescano la morte cellulare degradando le proteine intracellulari strutturali critiche. Un esempio di via dipendente dalle caspasi, mediata dal mitocondrio è rappresentata nella figura sottostante:

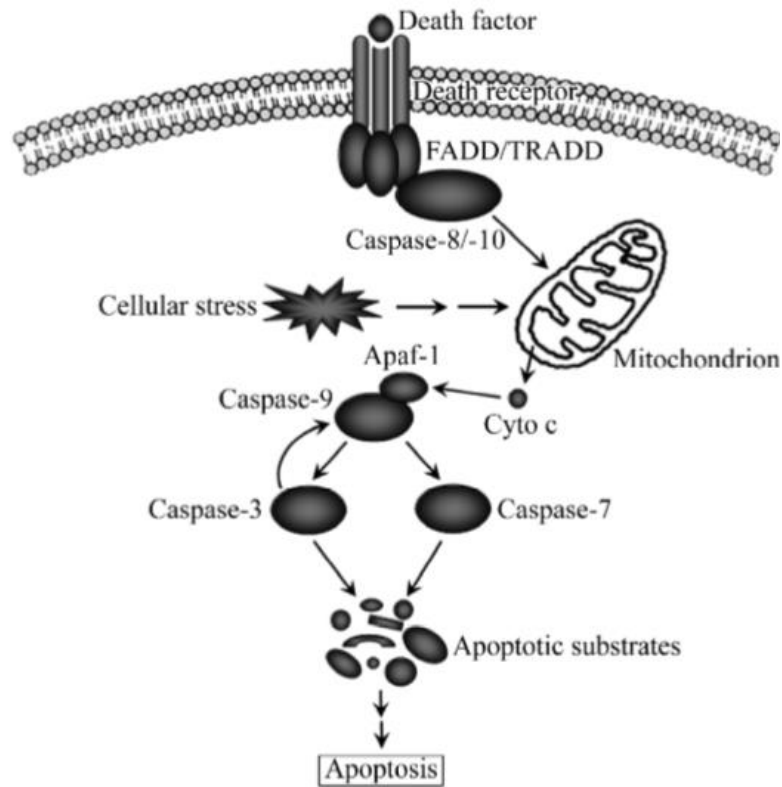


Figura 8: tipica via dipendente dalle caspasi e mediata dai mitocondri (fonte: Fan T. et al 2005)

Tra gli stimoli pro-apoptotici rientrano anche i ROS; la loro importanza dal punto di vista funzionale nell'attivare i meccanismi apoptotici sono stati dimostrati da studi inibitori attraverso l'uso di sostanze antiossidanti o enzimi (Simon et al. 2000). Ad esempio, l'N-acetilcisteina blocca l'apoptosi indotta da TNF in alcuni sistemi ipotizzando un ruolo dei ROS durante questo processo (Talley et al. 1995). Inoltre i ROS prodotti dai mitocondri potrebbero essere responsabili degli eventi mitocondriali tardivi che portano alla piena attivazione della cascata delle caspasi. In aggiunta, l'ossidazione dei pori

mitocondriali da parte dei ROS potrebbe contribuire al rilascio del citocromo c in seguito alla distruzione del potenziale di membrana mitocondriale (Zamzami et al. 1995).

Diversi studi hanno dimostrato che i ROS conducono in misura maggiore all'apoptosi della cellula quando ci si trova in condizioni di stress ossidativo. Ad esempio le lipoproteine a bassa densità e gli idroperossidi lipidici possono indurre apoptosi.

Anche i ROS che vengono prodotti dal sito dell'ubichinone della catena respiratoria mitocondriale vengono implicati come mediatori dell'apoptosi indotta dalla ceramide. Si è infatti visto che i meccanismi biochimici che possono essere attivati dai ROS durante l'induzione dell'apoptosi possono coinvolgere questi ultimi in due modi diversi: primo, come segnale facoltativo durante la fase dell'induzione e secondo come una comune conseguenza della permeabilità mitocondriale che porta alla distruzione finale della cellula.

L'apoptosi gioca un ruolo importante in condizioni patologiche anche a livello intestinale e ciò potrebbe essere legato sia ad un aumento che ad una diminuzione della quantità di cellule morte. Ad esempio la perdita di cellule epiteliali nella colite ulcerosa attiva avviene in seguito ad apoptosi nelle cripte delle aree adiacenti non coinvolte, mediata probabilmente da interazioni autocrine o paracrine tra Fas e Fas ligand. L'apoptosi delle cellule epiteliali

mediate da FasL, sempre nelle coliti ulcerative, potrebbe portare alla perdita della funzione della barriera epiteliale, facilitando l'invasione di microrganismi patogeni. Inoltre anche il fenomeno ischemia-riperfusion è un induttore dell'apoptosi nel tratto gastrointestinale.

Nel controllare le risposte allo stress cellulare gioca un ruolo importante p53, in quanto induce a seconda del contesto o l'arresto del ciclo cellulare per promuovere il riparo del DNA e la sopravvivenza della cellula stessa o la morte cellulare per apoptosi (Yoshida K, et al. 2011). Inoltre la regolazione redox dell'attività delle caspasi sembra essere coinvolta nelle modifiche post-traduzionali del loro sito catalitico a livello dei residui di cisteina. Le cisteine del sito catalitico della maggior parte delle caspasi sono suscettibili all'ossidazione, mentre le procaspasi-9, le procaspasi-3 e le caspasi 3 sono suscettibili all'S-glutatio-lazione (Circu et al. 2012). Inoltre, mentre le caspasi possono essere attivate da ossidanti come l' H_2O_2 , gli ossidanti possono essere inattivati irreversibilmente della loro attività enzimatica. È il caso delle caspasi 3, 8 e 9 (Pallepati et al. 2010).

1.5 Sistemi di difesa antiossidanti nel tratto gastrointestinale

In condizioni fisiologiche, una concentrazione basale di ROS/RNS viene però bilanciata dai meccanismi di difesa antiossidante presenti all'interno della cellula che includono enzimi quali la catalasi, la superossido dismutasi e la glutazione perossidasi; tra i meccanismi non enzimatici vi sono, ad esempio, il glutatione di origine endogena e i polifenoli di origine esogena. Essi lavorano sinergicamente in combinazione con altri sistemi di protezione cellulare contro il danno ossidativo come si osserva nella figura 9 (Piechota-Polanczyk 2014):

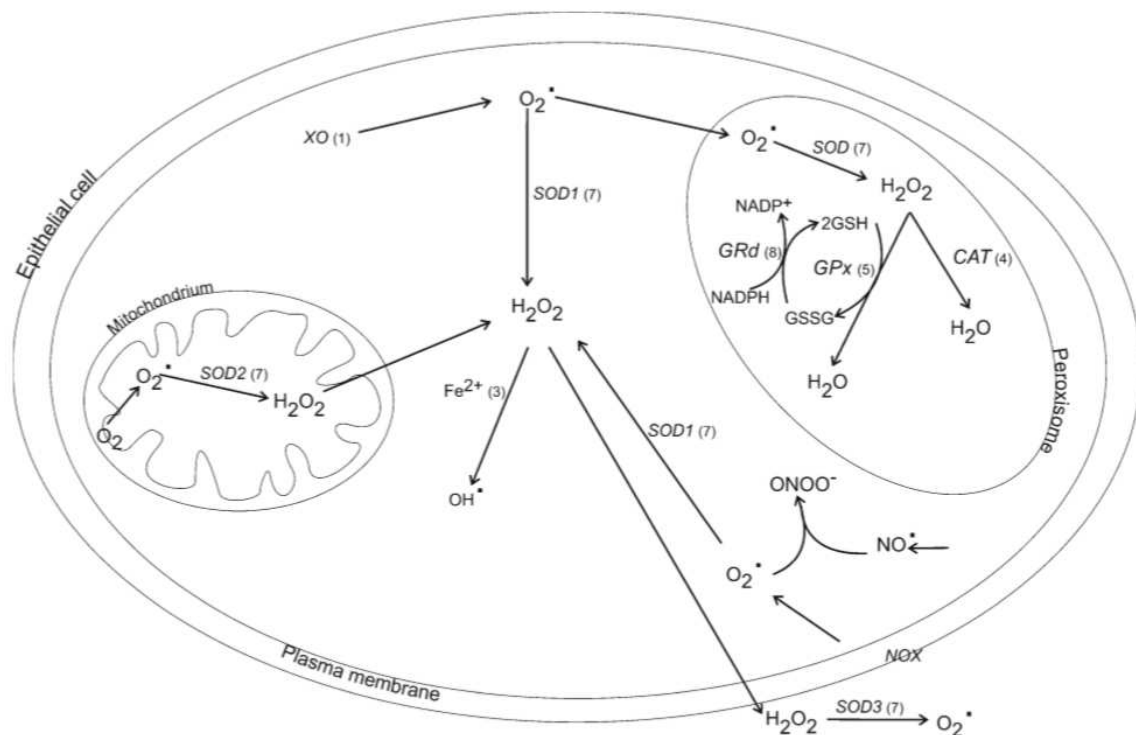


Figura 9: formazione di ROS e sistema di difesa antiossidante nelle cellule epiteliali intestinali

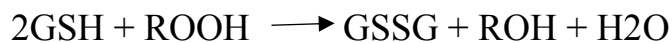
(fonte Piechota-Polanczyk 2014)

Nei mammiferi la **superossido dismutasi (SOD)** è un enzima appartenente alla famiglia delle metalloproteine che si presenta in tre isoforme: la SOD1 è distribuita nel citoplasma e contiene rame/zinco nel suo centro di reazione, la SOD2 è presente nei mitocondri e contiene nel suo centro di reazione il manganese, mentre la SOD3 localizzata a livello extracellulare contiene rame e zinco come ioni nel sito attivo. La reazione che catalizza questo enzima porta alla detossificazione dell'anione superossido riducendolo ad H_2O_2 . La SOD1, la più espressa, converte anche il perossido di idrogeno in presenza degli ioni rame formando lo ione idrossido. I tessuti intestinali dei pazienti con IBD hanno aumentati livelli di tutte e tre le isoforme, soprattutto a livello dell'epitelio (Kruidenier et al. 2003).

L' H_2O_2 viene poi convertita in H_2O dalla **catalasi**, altro enzima antiossidante. La catalasi è anch'essa una metalloproteina, ampiamente espressa nel citoplasma e nei perossisomi, il cui gruppo prostetico è rappresentato dal ferro (Izawa et al., 1996). Questi enzimi proteggono i tessuti dai perossidi e decompongono l' H_2O_2 in H_2O ed O_2 . A livello intestinale la catalasi è maggiormente espressa nell'epitelio e nella lamina propria del colon e si attiva soprattutto in presenza di processi infiammatori.

Un altro enzima antiossidante è la **glutazione perossidasi (GPx)**, di cui ne esistono cinque isoforme. La funzione di questo enzima è quella di ridurre i

perossidi. La GPx agisce in associazione con il glutatione, una molecola presente ad alte concentrazioni nelle cellule e che usa come substrato l'H₂O₂ o un perossido organico (ROOH), catalizzando la conversione dei perossidi ad acqua o alcol e contemporaneamente ossidando il glutatione (Valko et al., 2006; Rahman, 2007), secondo queste reazioni sotto riportate:



È un enzima importante anche nel prevenire la perossidazione lipidica e quindi per mantenere la struttura e la funzione delle membrane biologiche (McCord, 2000).

A livello intestinale le varie isoforme sono importanti nelle difese antiossidanti intracellulari ma sono espresse in misura maggiore in strati differenti dell'intestino: in particolare GPx1 è espressa prevalentemente nel tessuto linfatico del colon e nella lamina propria, sottomucosa e sierosa ma non a livello dell'epitelio intestinale dove invece è maggiormente espressa GPx2. GPx3 invece contribuisce alle difese antiossidanti extracellulari della mucosa intestinale e viene secreta dalle cellule epiteliali intestinali (Esworthy et al. 1998). GPx4 è stata rilevata nei tessuti del colon e dell'ileo e si è visto essere capace di riparare il danno al DNA ossidato; in aggiunta rimuove gli

idroperossidi fosfolipidici reprimendo la perossidazione lipidica (Florian et al. 2010; Seiler et al, 2008).

La glutatione perossidasi richiede nello svolgere la sua attività il glutatione come donatore di protoni. Il GSH nella sua forma ridotta è uno degli antiossidanti non enzimatici tiolici più importanti. Viene prodotto a livello intracellulare ed è un tripeptide idrosolubile composto da glutammina, cisteina e glicina che contiene al suo interno un gruppo tiolo (SH) derivato dalla cisteina. Questo gruppo tiolico determina la capacità antiossidante di questa molecola, in quanto l'atomo di zolfo può favorire la perdita di un singolo elettrone. La specie radicalica così generata (GS \cdot) può dimezzare per formare il prodotto non radicalico (GSSG).

Da vari studi si è dimostrato che una concentrazione sufficiente di GSH nelle cellule epiteliali del digiuno e del colon previene la degradazione tissutale eliminando i perossidi dannosi (Aw et al, 2005).

Il glutatione ossidato si accumula all'interno delle cellule e il rapporto GSH/GSSG è un buon indice di stress ossidativo di un organismo (Valko et al., 2006). La perdita, invece, del bilancio redox di GSH/GSSG contribuisce all'infiammazione mucosale e ad instaurare i sintomi delle coliti (Tsunada et al, 2003).

Sempre tra gli antiossidanti non enzimatici vi è la **vitamina C** o acido ascorbico, una molecola idrosolubile che può essere presente in due forme: una ridotta (acido ascorbico) ed una ossidata (acido deidroascorbico) tra loro convertibili. Essa è importante sia nel plasma che nelle cellule con la funzione di scavenger e per la rigenerazione della vitamina E.

La **vitamina E** è un altro potente antiossidante però liposolubile, il cui ruolo più importante è quello di proteggere le membrane lipidiche dalla perossidazione, prevenendo l'ossidazione degli acidi grassi insaturi.

I polifenoli sono antiossidanti sempre non enzimatici che vanno ad inibire vari enzimi come la cicloossigenasi, la lipoossigenasi e il NADPH ossidasi, proteggendo l'organismo dallo stress ossidativo.

Sono considerati antiossidanti enzimatici anche le **paraoxonasi**, identificate relativamente da poco, che consistono di tre membri, definiti PON1, PON2 e PON3, localizzate sul braccio lungo del cromosoma 7 (7q21.3-q22.1) (Primo-Parmo 1996).

La PON1 è sintetizzata per lo più a livello del fegato ed è associata alle lipoproteine HDL presenti nel circolo sanguigno, con lo scopo di proteggere l'ossidazione delle LDL e lo sviluppo dell'aterosclerosi (Shih 2000). PON3 è simile a PON1 sia per funzione che localizzazione. PON2 è invece espressa in

tutti i tessuti umani e non è associata alle HDL nel circolo sanguigno (Liu Y 2008). Essendo una forma intracellulare, la rende un buon candidato per prevenire lo stress ossidativo localmente all'interno della cellula (Horke S. 2007).

Esse sono state identificate anche nel tratto digestivo dell'uomo. Si è notato che lo stress ossidativo e l'infiammazione influenzano selettivamente l'espressione delle PON, suggerendo il loro potenziale coinvolgimento nelle IBD (Precourt LP et al. 2009). È stato osservato anche che alcuni polimorfismi della PON2 vanno a proteggere l'organismo dallo sviluppo delle IBD (Sanchez R 2006).

La PON2 ha scarsa attività paraoxonastica ed esterasica rispetto alla PON1 mentre ha una spiccata capacità di idrolizzare lattoni ciclici e aromatici.

La PON2 ha dimostrato inoltre di esercitare un effetto antiossidante che si esplica prevalentemente in ambito intracellulare. Essa è espressa nella maggior parte dei tessuti e studi di localizzazione subcellulare suggeriscono una preponderanza dell'enzima a livello della membrana mitocondriale. In particolare, l'enzima PON2 si trova a livello della membrana interna mitocondriale (IMM), associata al complesso III della catena respiratoria. A livello della IMM c'è un'elevata produzione di specie reattive dell'ossigeno in grado di causare danni a livello del mitocondrio e ad altri compartimenti cellulari (Devarajan et al., 2011). Studi condotti su cellule endoteliali umane hanno

confermato che PON2 riduce il rilascio di superossido dalla membrana mitocondriale interna (Altenhofer et al., 2010).

Poiché i mitocondri sono una notevole fonte di stress ossidativo, come mostrato precedentemente, la predominante localizzazione di PON2 nei mitocondri supporta un ruolo di prevenzione verso il danno ossidativo. In particolare alcuni autori hanno dimostrato che la PON2 interagisce con il coenzima Q10 associato al complesso III nei mitocondri, probabilmente con ruolo di scavenging delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte fisiologicamente durante la fosforilazione ossidativa. A rimarcare il ruolo della PON2 nella normale fisiologia mitocondriale, studi su modelli murini knockout per la PON2 dimostrano che tale deficit conduce a gravi disfunzioni mitocondriali (Devarajan et al. 2011).

La maggior parte degli studi riguardo l'induzione dell'espressione della PON2 si sono concentrati sugli effetti dello stress ossidativo per via del ruolo di antiossidante intracellulare che essa svolge. Ad esempio, si è visto perdere nelle cellule Caco2/15 knockdown per la PON2 il bilancio ossidativo con un aumento dell'attività della SOD e una perdita dell'attività della catalasi; queste cellule sono quindi più suscettibili allo stress ossidativo, dimostrato anche dal concomitante aumento dei livelli di MDA e del ridotto rapporto tra GSH-GSSG. La risposta infiammatoria è esacerbata in queste cellule, in quanto

l'espressione di TNF- α , IL-6 e MCP-1 è aumentata dopo l'induzione dello stress ossidativo. Anche il fattore di trascrizione pro-infiammatorio Nf- κ B è molto attivo (Précourt 2012). Quest'aumentata espressione dei geni pro-infiammatori è coinvolta nelle risposte a fase acuta e nella capacità di indurre una reazione infiammatoria nelle IBD.

Studi condotti su modelli cellulari intestinali umani e murini, suggeriscono che PON2 possa svolgere anche un ruolo significativo nel neutralizzare gli effetti di un eccesso di perossidanti a livello intestinale (Levy et al., 2007). Questo ruolo svolto da PON2 è particolarmente importante in quanto la parete intestinale, in particolare l'ileo essendo coinvolto nell'assorbimento degli acidi grassi, è continuamente esposta ad agenti perossidanti e lipidi perossidati introdotti con la dieta. PON2 sembra inoltre esercitare effetti anti-infiammatori nel tratto gastrointestinale contrastando i processi ossidativi e infiammatori che potrebbero apportare danni alla mucosa intestinale compromettendone l'integrità (Levy et al., 2007).

Nella tabella successiva sono riassunti gli enzimi antiossidanti principali maggiormente espressi a livello intestinale:

Enzimi	Reazione	Sito di azione
Catalasi	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$	Citoplasma e perossisomi dell'epitelio e della lamina propria; leucociti
Glutazione perossidasi (GPx)	$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$	Gpx1 nei perossisomi del tessuto linfatico del colon, della lamina propria, sottomucosa, mucosa e muscolare Gpx2 nei perossisomi dell'epitelio luminale Gpx3 secreto dalle cellule epiteliali intestinali Gpx4 nei perossisomi dei tessuti ileali e del colon
Paraonasi 2	riduzione della formazione di ROS a livello mitocondriale	Membrana mitocondriale interna
Superossido dismutasi	$2\text{H}^+ + 2 \text{O}_2^- \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	SOD-1 nel citoplasma e piccole quantità nel nucleo SOD-2 nei mitocondri SOD-3 nel plasma
Glutazione reduttasi	$\text{GSSG} + \text{NADPH} \rightarrow \text{GSH} + \text{NADP}^+$	Come la GPx

Tabella 2: enzimi antiossidanti a livello intestinale

1.6 Le malattie infiammatorie intestinali

Dal punto di vista clinico, negli Stati Uniti, il secondo disordine infiammatorio più comune è rappresentato dalle malattie infiammatorie intestinali, in inglese IBD (inflammatory bowel disease), con una manifestazione tra i 15 e i 30 anni (V. Loftus et al. 2002) e ad oggi la loro incidenza e prevalenza sta aumentando notevolmente in tutto il mondo.

Esse sono dei disordini infiammatori cronici del tratto gastrointestinale che portano a conseguenze negative sulla qualità della vita. Le IBD oltre ad essere

croniche sono anche recidivanti, in quanto si presentano in modo ciclico con l'alternarsi di episodi acuti seguiti da successiva remissione clinica; da vari studi si è notata anche una forte correlazione tra le IBD e l'insorgenza del cancro al colon-retto. Tra i sintomi più comuni di questo gruppo di malattie a livello intestinale ci sono la diarrea, i dolori addominali e la perdita di peso (Greco et al., 2011; Indriolo et al., 2011; Rigoli and Caruso, 2014).

Le principali forme di IBD sono il morbo di Crohn e le coliti ulcerose.

Il morbo di Crohn è caratterizzato da un'inflammatione transmurale, localizzata quindi in tutti gli strati dell'intestino, che può manifestarsi in ogni regione del tratto gastrointestinale (Indriolo et al., 2011). In clinica questa malattia può portare allo sviluppo di granulomi intestinali, stenosi e fistole.

La colite ulcerosa invece colpisce le regioni del colon e del retto ma l'inflammatione è localizzata solo a livello della mucosa (Persson et al., 1994; Canavan et al., 2006; Grivennikov, 2013).

In figura 10 è rappresentata la differenza tra le due IBD più comuni:

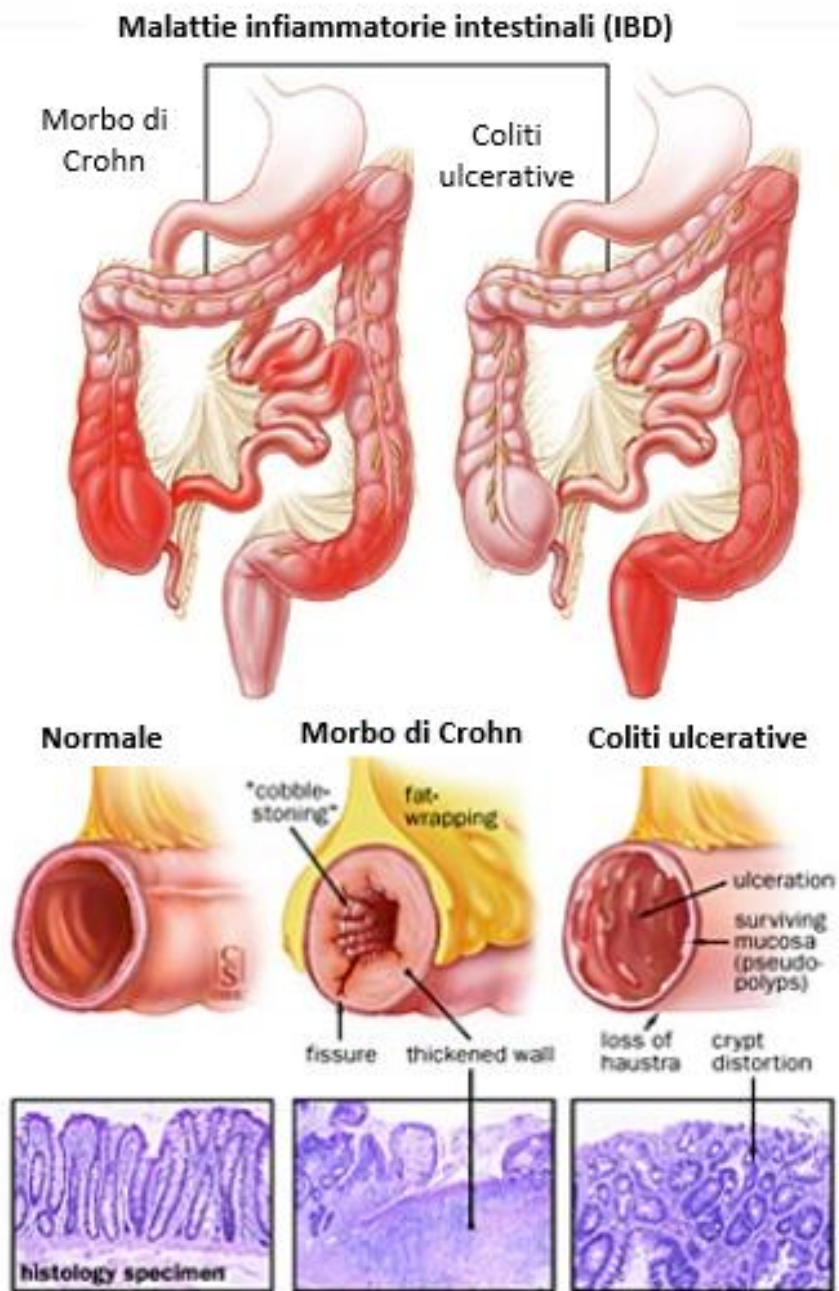


Figura 10: differenze tra morbo di Crohn e coliti ulcerative (tratto da <http://www.enterologia.it>)

Sebbene sia ampiamente riconosciuto che le IBD siano patologie ad eziologia multifattoriale, i meccanismi attraverso cui si instaurano rimangono ancora un tema di discussione. Sicuramente sono fattori la predisposizione genetica, la disregolazione del sistema immunitario, lo stress ossidativo e vari fattori ambientali.

È stato infatti osservato sia un'inappropriata risposta immunitaria ai cambiamenti ambientali sia una suscettibilità maggiore del microbiota intestinale.

Per quanto riguarda i fattori genetici, la predisposizione genetica è complessa in quanto probabilmente entrano in gioco diversi geni ma si è notato che il rischio di sviluppare IBD è estremamente alto nei figli con genitori che presentano già questa patologia (Bennett et al., 1991).

I fattori ambientali invece sono associati all'esposizione agli antibiotici, ai farmaci anti-infiammatori, a disbiosi e a stress (Loftus, 2004; Bernstein et al., 2006; Bernstein, 2008; Molodecky and Kaplan, 2010).

Le ricerche hanno inoltre dimostrato che questo gruppo di malattie sono più comuni in nazioni sviluppate piuttosto che nei paesi non sviluppati, suggerendo quindi che molti fattori sono associati anche ad uno stile di vita "occidentalizzato" come la dieta, l'eccessiva esposizione agli inquinanti e a

sostanze chimiche industriali (Hanauer, S. B. 2006). Tra l'altro questi fattori contribuiscono alla patogenesi della maggior parte delle malattie che causano mortalità nel mondo occidentale (Rossin et al. 2017).

Negli anni si sono anche accumulati dati, provenienti sia da studi sperimentali che da studi clinici, che vanno a sottolineare l'importanza dello stress ossidativo come meccanismo coinvolto nello sviluppo delle IBD sotto diversi punti di vista.

Nell'insieme questi fattori vanno a minare la struttura della barriera intestinale e poiché l'integrità delle giunzioni epiteliali sono energia-dipendenti, ciò suggerisce che la funzione mitocondriale giochi un ruolo importante nel preservare la funzione della barriera epiteliale.

1.7 Disfunzione mitocondriale nelle IBD

I mitocondri sono organelli legati a membrane che, nonostante la capacità limitata di codifica del DNA mitocondriale, regolano le funzioni cellulari vitali attraverso la produzione di energia tramite la fosforilazione ossidativa, la generazione di ROS (reactive oxygen species) e di RNS (reactive nitrogen species), l'induzione dell'apoptosi e la trasduzione di segnali di stress e metabolici (Galluzzi et al., 2012; Tait and Green, 2012).

In condizioni fisiologiche, NADH e FADH₂ prodotti dal ciclo di Krebs vengono trasferiti al mitocondrio, dove fungono da donatori di elettroni ai complessi redox enzimatici associati alla membrana mitocondriale. Gli elettroni vengono trasferiti attraverso i complessi delle ossido-riduttasi I, II, III e IV (citocromo c), fino a donarlo all'ossigeno formando acqua. Il trasferimento di elettroni in questi complessi generano un gradiente protonico nella membrana mitocondriale esterna, che a sua volta si traduce in un potenziale tra la membrana interna ed esterna, che guida alla sintesi dell'ATP in quanto permette di far funzionare il complesso dell'ATP sintetasi. Dal momento in cui gli elettroni vengono trasferiti dal complesso II e III, i ROS vengono formati come sotto-prodotti. I livelli di ROS prodotti durante la fosforilazione è di circa l'1-3% e vengono neutralizzati dagli antiossidanti cellulari come spiegato precedentemente.

In una cellula sana, in particolare, è importante la forma dei mitocondri in quanto strettamente connessa con le funzioni che svolgono. Ci sono diverse funzioni primarie del mitocondrio che sono essenziali per mantenere la sua forma e di conseguenza per garantire l'omeostasi cellulare. In primo luogo, la biogenesi mitocondriale regola la popolazione mitocondriale stessa a seconda delle richieste energetiche della cellula (Archer, 2013). In secondo luogo, le cellule attraverso il processo di mitofagia eliminano i mitocondri danneggiati e

depolarizzati attraverso i vacuoli lisosomiali. La mitofagia è facilitata sia dal processo di fissione, che isola i mitocondri depolarizzati e sopprime i mediatori della fusione, sia dall'inibizione della riorganizzazione dei mitocondri danneggiati (Archer, 2013). Inoltre i mitocondri sono organelli mobili che instaurano una rete dinamica di dineina e chinesina all'interno del citosol; in particolare anche la dineina regola il processo di fissione mitocondriale (Wang et al., 2011). Infine, essi sono collegati al reticolo endoplasmatico attraverso membrane associate ai mitocondri, consentendo a questi due organelli di comunicare attraverso i segnali di calcio che influenzano il metabolismo ossidativo e l'apoptosi (Patergnani S. 2011).

Un'alterazione della struttura mitocondriale o della sua funzione possono portare a disfunzione mitocondriale con effetti deleteri per la cellula.

Per supportare l'importanza della forma e della funzione mitocondriale, sono stati isolati da pazienti con IBD gli enterociti ed è stato osservato che al loro interno i mitocondri aumentano di dimensioni e presentano creste irregolari, come si può osservare nella figura 11 (A) (Nazli A., 2004).

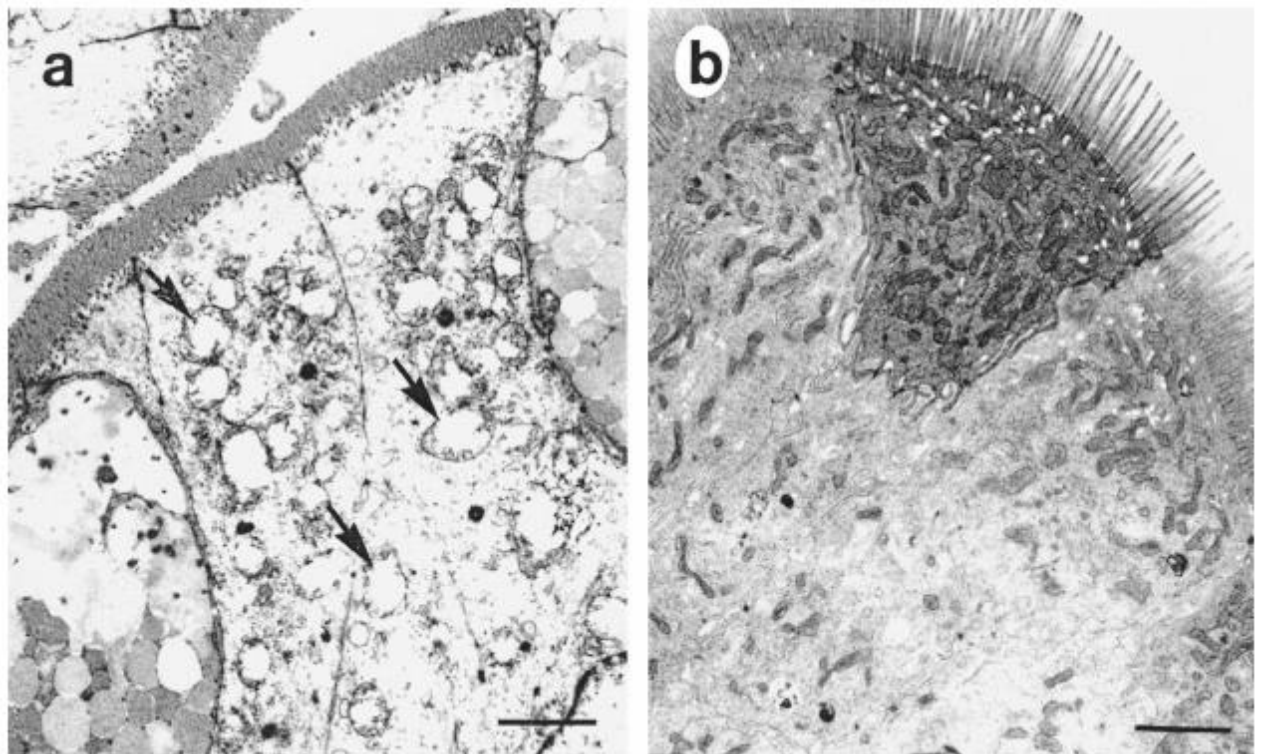


Figura 11: mitocondri nel paziente con morbo di Crohn a livello dell'ileo (a); mitocondri in pazienti con cancro nella stessa regione (b) (fonte Nazli A., 2004)

Ciò va a supportare anche il fatto che pazienti con IBD hanno ridotti livelli di ATP a livello della mucosa causando uno stato di deficit di energia per la cellula (Kameyama 1984). Questa energia è a sua volta necessaria per il costante turnover dell'epitelio intestinale che si rigenera ogni 4-5 giorni.

È da capire però se questi cambiamenti della struttura mitocondriale giocano un ruolo nella patogenesi dell'infiammazione o ne sono una conseguenza. Sicuramente il danno ricorrente all'epitelio intestinale porta alla distruzione della funzione della barriera intestinale (Salim and Söderholm, 2011). In

aggiunta, la non regolare differenziazione delle cellule epiteliali intestinali ha degli effetti sulla patogenesi delle IBD e su diversi geni, che a causa dell'inflammatione, sono espressi in modo alterato (Ahn et al. 2008). Infatti, la deplezione del muco e delle cellule mucose è una caratteristica dei pazienti con coliti ulcerose (Danese S. et al. 2011).

Al mantenimento dell'integrità della barriera intestinale contribuiscono anche le giunzioni strette. Ci sono studi che hanno dimostrato come ci sia una stretta correlazione tra lo sviluppo delle IBD e l'alterata espressione e modificazione delle giunzioni strette (Zeissig et al. 2007), come mostrato nella figura seguente:

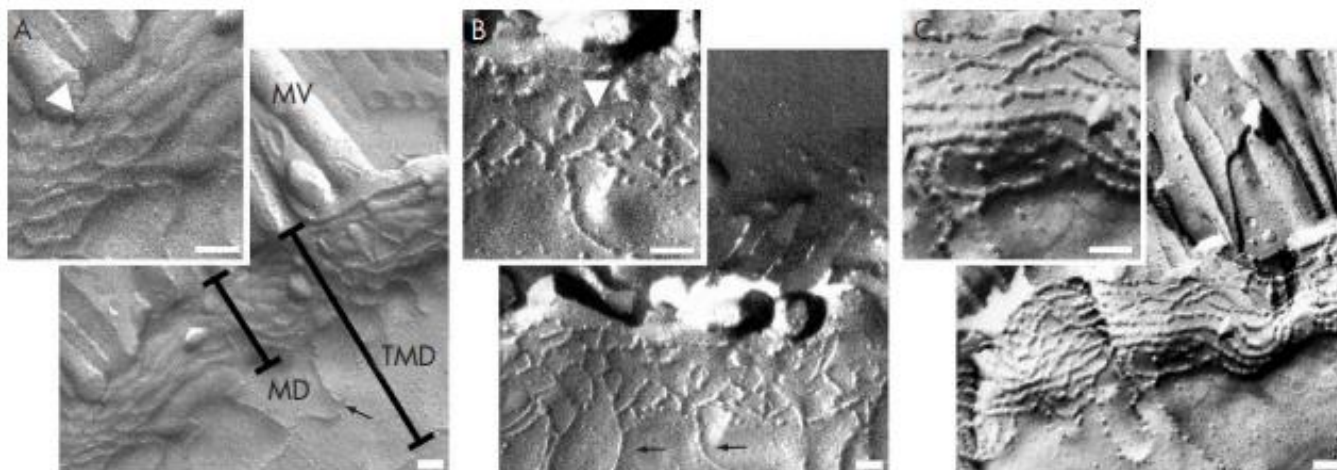


Figura 12: fig. A, filamenti continui delle giunzioni strette (controllo); fig. B e C, riduzione del numero di filamenti nella malattia di Crohn nello stato lieve (con frequenti rotture del filamento) e nel livello moderato (con discontinuità evidenti) (fonte Zeissig et al. 2007)

Il mantenimento dell'integrità di queste giunzioni è energia-dipendente e risulta ovvio che i mitocondri danneggiati possono contribuire alla distruzione della barriera (Dickman K. et al. 2000). Ad esempio Nazli et al. hanno dimostrato che il trattamento di cellule con dinitrofenolo (un disaccoppiante della fosforilazione ossidativa) porta all'internalizzazione cellulare di un ceppo non invasivo di E.Coli. Da ciò, gli autori hanno ipotizzato che sotto stress metabolico risultante dalla disfunzione mitocondriale, l'epitelio enterico perde la sua capacità di distinguere tra commensali e patogeni, portando ad una esacerbata risposta infiammatoria intestinale.

I cambiamenti morfologici nei mitocondri portano anche a deficienze nella beta-ossidazione di acidi grassi a corta catena (Halestrap 1986). Diversi studi dimostrano come il metabolismo del butirrato nella mucosa intestinale dei pazienti con IBD (soprattutto nelle coliti ulcerose) sia alterato (Chapman et al. 1994). Ciò comporta, soprattutto a livello del colon, un deficit di energia e quindi un'alterazione della mucosa in quanto i colonociti hanno come fonte principale di energia gli acidi grassi a corta catena (SCFA). Ad esempio, Santhanam et al. (2007) hanno mostrato che l'acetoacetyl coA tiolasi mitocondriale, che catalizza l'ultimo passaggio dell'ossidazione del butirrato, è significativamente alterato nella mucosa del colon di pazienti con coliti ulcerative.

A giocare un ruolo nella disfunzione mitocondriale e di conseguenza nella patogenesi dell'infiammazione intestinale è anche lo stress ossidativo (Grisham,1994; Elson et al.,1995).

Un eccessivo stress ossidativo, infatti, può provocare un danno cellulare attraverso l'ossidazione di proteine, lipidi e DNA, alterando così le loro funzioni biologiche, come mostrato precedentemente e inducendo morte cellulare (Andersen, 2004).

Molti studi hanno dimostrato infatti che vi sono aumentati livelli di ROS/RNS all'interno dell'epitelio intestinale di pazienti con IBD e nei modelli murini di coliti sperimentali (Kruidenier, L. 2002).

1.8 Stress ossidativo e IBD

Il tratto gastrointestinale è infatti incline all'attacco da parte dei ROS a causa sia di fattori nutrizionali che della flora microbica presente.

Le due reazioni enzimatiche principali che avvengono nel tratto GI sono quelle catalizzate dalla xantina ossidasi e dal sistema della NADPH ossidasi. Qui infatti si ha la più alta concentrazione di xantina ossidasi combinata con una grande quantità di anione superossido prodotto grazie alle numerose cellule fagocitiche presenti.

Come detto precedentemente, i ROS sono stati collegati con vari disordini del tratto GI.

L'associazione dei ROS con le IBD è evidente dall'osservazione che un aumento di ROS e una diminuzione di antiossidanti contribuisce a meccanismi patologici nelle IBD. I ROS potenziano anche le reazioni immunitarie tramite i leucociti. L'anione superossido, il perossido di idrogeno e il radicale idrossile secreti dai fagociti si accumulano nel sito infiammatorio portando alla perossidazione lipidica.

Per quanto riguarda le coliti ulcerative, difetti nella difesa antiossidante, come ad esempio una riduzione del glutatione, contribuiscono a peggiorarle.

Inoltre, la severità delle coliti ulcerative nei topi è stata correlata in diversi studi con la SOD. Il destrano solfato di sodio è stato usato, ad esempio, per indurre la risposta infiammatoria e si è notata un'aumentata attività della via NF-KB e di generazione di ROS, che hanno attivato così la risposta infiammatoria.

I ROS e NOS così come le citochine pro-infiammatorie sono perciò implicati nell'eziologia e nella progressione delle coliti ulcerative (Seril et al. 2003).

Sempre nei pazienti con coliti ulcerose, una significativa infiltrazione dei neutrofili e un aumento dei livelli di MPO sono stati osservati nella lamina propria infiammata (Kruidenier et al. 2003), mentre iNOS è stato considerato

essere responsabile dell'aumentata produzione di NO nell'epitelio e nei centri di infiammazione in associazione con la nitrotirosina (Singer et al. 1996).

L'ossido nitrico che deriva da iNOS stimola inoltre la produzione del TNF- α nel colon centrale e distale promuovendo l'infiltrazione di neutrofili tramite, ad esempio, la stimolazione della sintesi di molecole di adesione intracellulare (ICAM) e della P-selectina portando di conseguenza al danno tissutale (Yasukawa et al. 2012).

In particolare l'aumento della risposta infiammatoria e del danno tissutale, causato dal reclutamento dei neutrofili avviene grazie all'attivazione dei pathway di signalling come il fattore nucleare-kappa B (NF- κ B) (Brennan et al. 1995). Quando attivato, NF- κ B trasloca nel nucleo e si lega al DNA, attivando così l'espressione genica. I geni attivati coinvolti nell'infiammazione della mucosa includono ad esempio IL-6, IL-8, TNF- α , ICAM (Yasukawa et al. 2012).

L'eccesso di reazioni infiammatorie e l'alterazione della funzione dello strato della mucosa conduce ad una esagerata produzione di perossido di idrogeno, anione superossido, radicale idrossile e acido ipocloroso e di mediatori infiammatori da parte delle cellule infiammatorie, favorendo anche la cancerogenesi del colon.

Il morbo di Crohn (CD), invece, è caratterizzato da un ridotto numero di cellule T naive ma aumentato di cellule T della memoria e da un'aumentata espressione delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II nei colonociti e nelle cellule dell'epitelio ileale (Ebert et al. 2005). In vari studi si è dimostrato che le cellule periferiche immuni nei pazienti con CD attivo hanno un'attività maggiore di SOD e producono più H_2O_2 , hanno un'aumentata perossidazione lipidica, un'inibizione della funzione mitocondriale e una diminuzione dell'attività CAT; inoltre si è visto che questi cambiamenti sono reversibili durante il periodo di remissione della malattia, tranne che per l'attività della catalasi, dimostrando così un ruolo importante dei mitocondri e dello stress ossidativo nello sviluppo del morbo di Crohn (Beltran et al. 2010). Inoltre questi pazienti hanno un contenuto più basso di composti anti-ossidanti, inclusa la GSH tissutale che come detto precedentemente partecipa alla riduzione della GPx catalizzata da H_2O_2 , così come si ha una riduzione di acido ascorbico nel plasma, di α - e β -carotene, licopene e di β -criptoxantina.

In particolare il contenuto nel siero di questi enzimi anti-ossidanti sembra dipendere dallo stadio della malattia; durante il periodo di remissione del morbo di Crohn l'attività ad esempio della GPx è stabile o più bassa, mentre cresce in CD attivo (Maor 2008, Wendland 2001).

Come nelle coliti ulcerative, varie citochine giocano un ruolo importante anche nel morbo di Crohn, quali IL-4, TNF- α , IL-6 e IL-8. Il rilascio di queste citochine è indotto sia dai ROS che dagli RNS. Esse mediano poi la loro azione attraverso i pathways di NF- κ B e di MAPK (mitogen-activated protein kinase); l'attivazione aberrante di NF- κ B è coinvolto nello sviluppo della patologia (Schreiber et al. 1998) (figura 13):

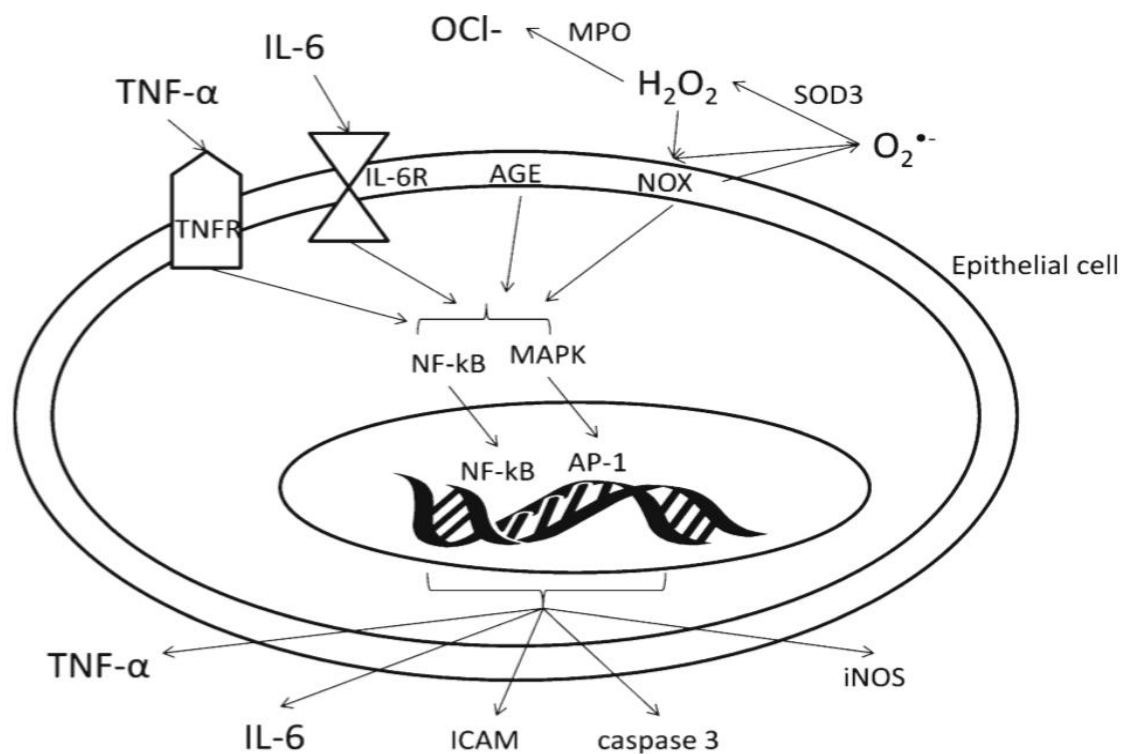


Figura 13: l'influenza dei ROS e delle citochine sulle vie di segnale nelle cellule intestinali epiteliali (Piechota A. et al 2014):

Come si può osservare dalla figura precedente, l'anione superossido viene prodotto dagli enzimi NOX, viene poi convertito in perossido di idrogeno dalla

SOD3 oppure aumenta a causa dei prodotti finali di glicazione (AGEs) contenuti nella membrana plasmatica delle cellule epiteliali. Sia gli AGEs che i NOX attivano il segnale NF-kB portando ad un aumento dell'espressione della caspasi 3, del TFN- α , dei geni che codificano per l'IL-6 o inducono l'iNOS o le ICAM.

1.9 Dieta e IBD

Sebbene l'eziopatogenesi delle IBD non sia molto conosciuta, si è ampiamente pensato che la dieta possa giocare un ruolo cruciale nello sviluppo e nella progressione delle IBD.

Diversi studi hanno già analizzato lo stile di vita associandolo a varie patologie, quali ad esempio l'obesità e l'ipertensione. Per quanto riguarda la correlazione tra l'insorgenza delle IBD e la dieta occidentale non ci sono molti studi, ma poiché la dieta occidentale promuove l'infiammazione intestinale attraverso vari meccanismi, i nutrienti contenuti in essa saranno capaci sicuramente di innescare effetti pro-infiammatori sia diretti che indiretti a livello intestinale. In particolare questi nutrienti possono agire su uno dei tre componenti coinvolti nella fisiologia intestinale: il sistema immunitario, il microbiota o la barriera intestinale.

Tra i fattori che sviluppano il morbo di Crohn e le coliti ulcerose, è stato ipotizzato che anche lo stile di vita occidentalizzato possa contribuire all'incidenza della malattia stessa.

La dieta gioca, infatti, un ruolo importante nel definire la composizione del microbiota e di conseguenza i metaboliti microbici prodotti (Albenberg et al. 2014); in secondo luogo, i nutrienti associati ad una dieta occidentale, caratterizzata da un alto intake di carne rossa, dolci, cibi ad alto contenuto di grassi e cereali raffinati sono stati collegati ad un aumento dell'inflammatione della mucosa. Infine anche studi su animali hanno dimostrato che la composizione della dieta regola la funzione della barriera mucosa, un fattore cruciale nella patogenesi delle IBD (Stenman et al. 2013) (figura 14).

Da ulteriori studi è emerso che pazienti che effettuano una dieta ad alto contenuto di zuccheri e soft drinks ma un consumo di verdure, legumi e frutta più bassi rispetto alla media hanno un aumentato rischio di sviluppare coliti ulcerative (Racine A et al. 2016).

Inoltre si è dimostrato che a causa di un elevato consumo di carboidrati, una parte di essi non viene assorbita ma potrebbe essere fermentata promuovendo inflammatione e disbiosi, causando di conseguenza anche un dismetabolismo di altri nutrienti come i grassi (Rizzello F et al. 2019).

Inoltre si è osservato come pazienti che consumano un alto contenuto di zuccheri raffinati abbiano maggiori probabilità di sviluppare le IBD (Thornton et al. 1979). Ciò è accentuato anche dal fatto che la dieta occidentale contiene una bassa concentrazione di nutrienti e micronutrienti con proprietà anti-infiammatorie e anti-ossidanti, come si può notare nella figura 15.

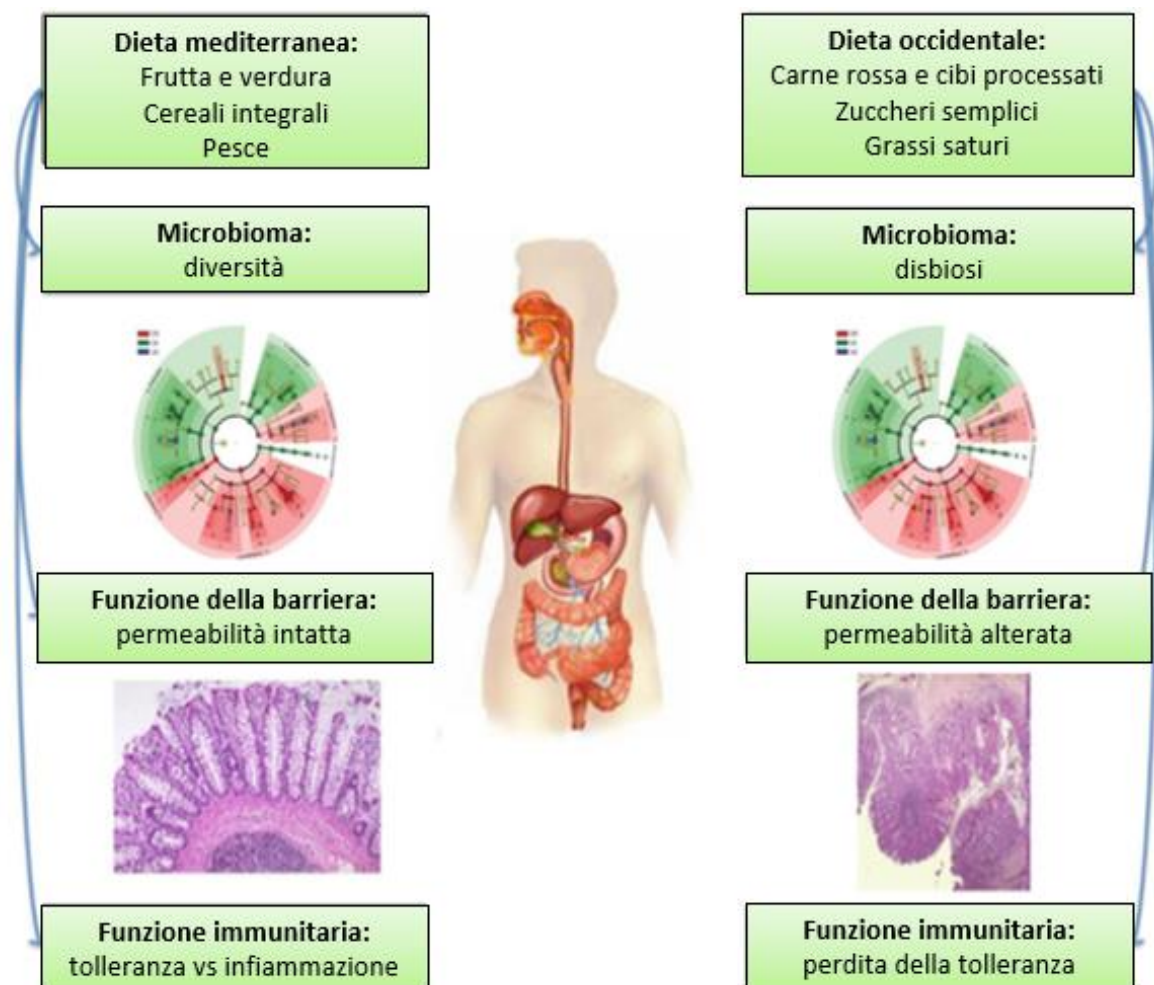


Figura 14: potenziali meccanismi che correlano la dieta alle IBD (Rizzello F, et al 2019)

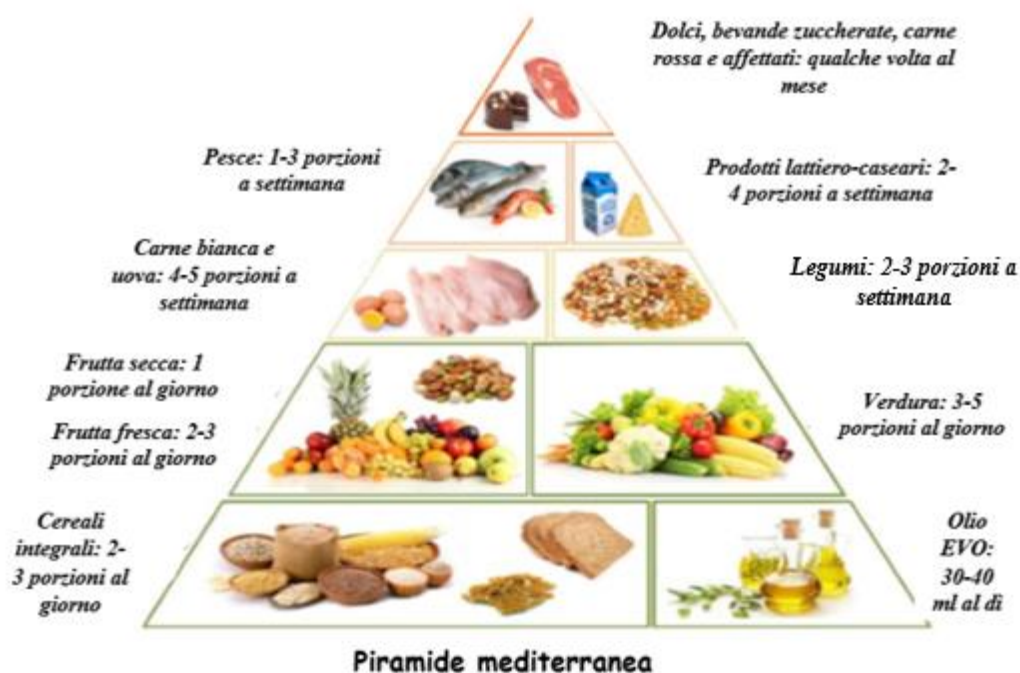


Figura 15: differenze tra la dieta mediterranea e quella occidentale (Rizzello F, et al 2019)

2 IPERGLICEMIA: UN FATTORE DI STRESS OSSIDATIVO

Tra i vari fattori nutrizionali che incidono nello sviluppo di patologie vi è sicuramente l'elevata assunzione di alimenti contenenti zuccheri semplici, che vanno di conseguenza ad aumentare la glicemia.

Vari studi hanno dimostrato che nello sviluppo di patologie associate all'iperglicemia, lo stress ossidativo gioca un ruolo importante, ipotizzando così un collegamento stretto fra questi due fattori come nel caso del diabete.

In particolare l'iperglicemia può promuovere l'accumulo di ROS in modi diversi: una modalità è aumentando il flusso di glucosio attraverso la via dei polioli. In condizioni di iperglicemia intracellulare, infatti, il glucosio attraverso la via dei polioli viene convertito in un polialcol, il sorbitolo, che a sua volta va a ridurre le concentrazioni intracellulari degli agenti antiossidanti NADPH e GSH e inducendo di conseguenza un'alta produzione di anione superossido. L'accumulo di ROS inibisce la glucosio 6-fosfato deidrogenasi, un enzima antiossidante, amplificando così lo stress ossidativo. In più il sorbitolo viene metabolizzato in fruttosio dalla sorbitolo deidrogenasi, aumentando di conseguenza il rapporto intracellulare NADH/NAD⁺, che porta all'inibizione della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi elevando così i livelli di trioso fosfato. Quest'ultimi a loro volta promuovono sia la formazione di metilgliosale che di diacilglicerolo (Brownlee M. 2001).

Un altro modo prevede l'attivazione delle isoforme della fosfochinasi C (PKC); un terzo è legato invece alla sovraespressione della via dell'esosammina che porta ad una diminuzione delle difese antiossidanti; l'ultima modalità è dovuta invece ad un aumento della formazione degli AGEs con l'attivazione di recettori specifici come mostrato nella figura 16:

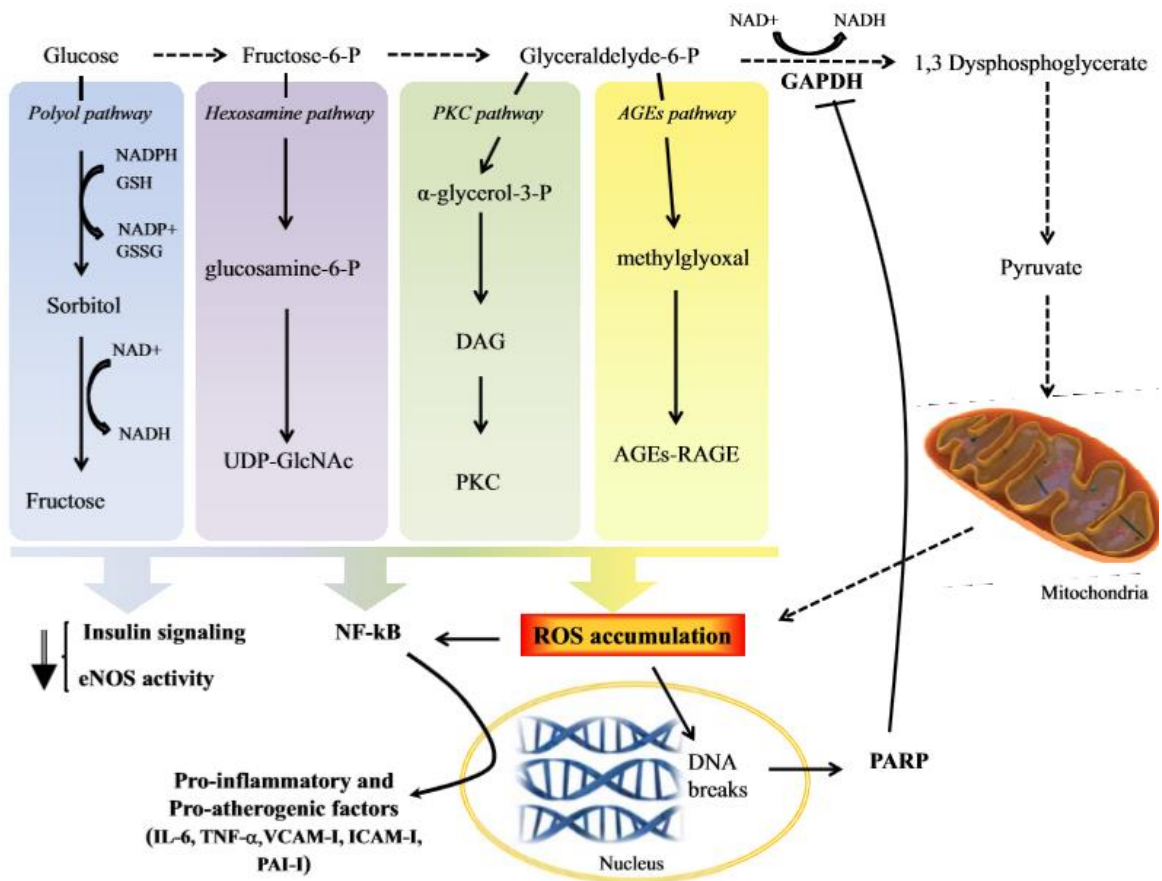


Figura 16: modi attraverso cui l'iperglicemia può portare all'accumulo di ROS (fonte: Fiorentino et al. 2013)

2.1 Reazione di Maillard

Infatti il legame degli AGEs ai loro recettori (RAGE) può essere mediato da un'eccessiva produzione di ROS indotta da concentrazioni di glucosio più elevate a livello intracellulare che portano all'auto-ossidazione del glucosio in gliosale, alla frammentazione della gliceraldeide-3-fosfato e del diidrossiacetone fosfato a metilgliosale; queste molecole reagiscono con gli amino-gruppi liberi delle proteine intra ed extracellulari formando gli AGEs. Più in dettaglio, gli AGEs derivano da un processo di glicazione non enzimatica che ha origine dalla reazione tra la forma aperta aldeidica di uno zucchero (glucosio, fruttosio, ribosio) ed un aminoacido (di solito lisina, idrossilisina o valina) di una proteina o un lipide. Poiché la reazione non richiede la presenza di enzimi, la velocità di questa reazione dipende oltre che da molti fattori ambientali anche dalla quantità di glucosio nel sangue, dalla quantità di proteine, dalla permeabilità delle cellule al glucosio e dai gruppi amminici liberi; per quanto riguarda gli aminoacidi liberi sono invece importanti la basicità del gruppo amminico, l'accessibilità sterica e il pH.

Il processo di glicazione non enzimatica delle proteine procede in tre fasi. Si formano dapprima le basi di Schiff, prodotti estremamente instabili e reversibili. In seguito compaiono gli addotti di Amadori (più stabili) ed infine

i prodotti di glicazione avanzata (AGEs), chimicamente stabili e non degradabili enzimaticamente.

In particolare, nella fase iniziale, uno zucchero riducente (glucosio, fruttosio, galattosio, mannosio, xilulosio), reagisce con un gruppo amminico libero, appartenente a molecole diverse come le proteine, gli acidi nucleici e i lipidi, formando un composto instabile: la base di Schiff. La base di Schiff è un composto con gruppo funzionale contenente un doppio legame carbonio-azoto, con l'azoto a sua volta legato a un gruppo arilico o alchilico. Attraverso dei riarrangiamenti, la base si trasforma in una chetoammina stabile o prodotto di Amadori che può essere degradata in una varietà di altri composti carbonilici altamente reattivi (Vlassara et al., 1994). Nella fase intermedia, i prodotti di Amadori, attraverso reazioni di ossidazione e deidratazione, sono degradati in differenti composti carbonilici che, essendo molto più reattivi dello zucchero di partenza si comportano da propagatori della reazione, in quanto possono reagire nuovamente con i gruppi amminici liberi delle proteine. Tra questi composti carbonilici reattivi c'è il metilgliosale ($C_3H_4O_2$), un α -oxoaldeide, contenente un gruppo aldeidico e uno chetonico, dove il gruppo aldeidico è molto più reattivo di quello chetonico (Thornalley et al, 1996). Nell'ultima fase, i composti carbonilici reattivi reagiscono con i gruppi amminici liberi e, attraverso reazioni di ossidazione, deidratazione e ciclizzazione, formano

composti di colore giallo-bruno, spesso fluorescenti, insolubili ed irreversibili detti composti di glicazione avanzata o AGEs. Tra i primi composti AGEs ad essere identificati ci sono i derivati dell'imidazolo (FFI), l'N-carbossimetil-lisina (CML), l'N-carbossi-etil-lisina (CEL) che deriva dalla reazione tra il metilgliosale e la lisina, il dimero gliossal-lisina (GOLD) e il dimero metilgliossal-lisina (MOLD), che si formano per reazione del gliosale e del metilgliosale con i residui di lisina.

La glicazione non enzimatica delle proteine e la formazione di AGEs avviene anche *in vivo* (Vlassara et al., 2013). Gli AGEs *in vivo* si accumulano continuamente e in special modo in condizioni di iperglicemia sia nell'ambiente extracellulare che all'interno della cellula. È stato osservato che un incremento transitorio della glicemia può produrre la formazione di una notevole quantità di aldimmine, reazione comunque reversibile con la normalizzazione dei valori glicemici.

La persistenza di iperglicemia, tuttavia, rende tale reazione irreversibile. Infatti un'aumentata formazione di AGEs è stata osservata nel diabete, ma anche in tutte le patologie associate al danno ossidativo (Vlassara et al., 2013). Con l'invecchiamento la capacità di smaltimento delle molecole alterate si riduce e l'accumulo delle proteine modificate da reazioni non enzimatiche aumenta

(Simm et al., 2015). Tale reazione ha rilevanza clinica in quanto la glicazione non enzimatica causa modifiche strutturali alle principali macromolecole, che si riflettono in alterazione delle loro funzione.

La glico-ossidazione, quindi, rappresenta un comune pathway che porta non solo alle complicazioni del diabete, ma anche ad una serie di molteplici patologie cronic-degenerative come l'obesità, le patologie cardiovascolari e l'invecchiamento (Ahmed, 2005; Stitt, 2005; Forbes et al, 2004) in cui si verifica questa correlazione tra lo stress ossidativo e la formazione di AGEs.

Come già accennato, il legame degli AGEs ai recettori RAGE induce la generazione di ROS intracellulari e la conseguente attivazione del fattore di trascrizione redox sensibile NF- κ B, il quale modula l'espressione di vari geni associati all'infiammazione, come citato sopra TNF α , l'IL-6, ICAM-1, VCAM-5 e altri. In più gli AGEs che sono presenti nella matrice extracellulare diminuiscono la disponibilità di ossido nitrico, riducendo la vasodilatazione.

Una volta attivato l'NF- κ B aumentano a loro volta il TNF α , l'IL-6, l'IL-1 che conducono ad aumentare lo stress ossidativo; d'altra parte l'aumento delle ICAM-1, VCAM1 e altre molecole conducono all'infiammazione degli organi e porta allo sviluppo di condizioni croniche, come mostrato nella figura sottostante:

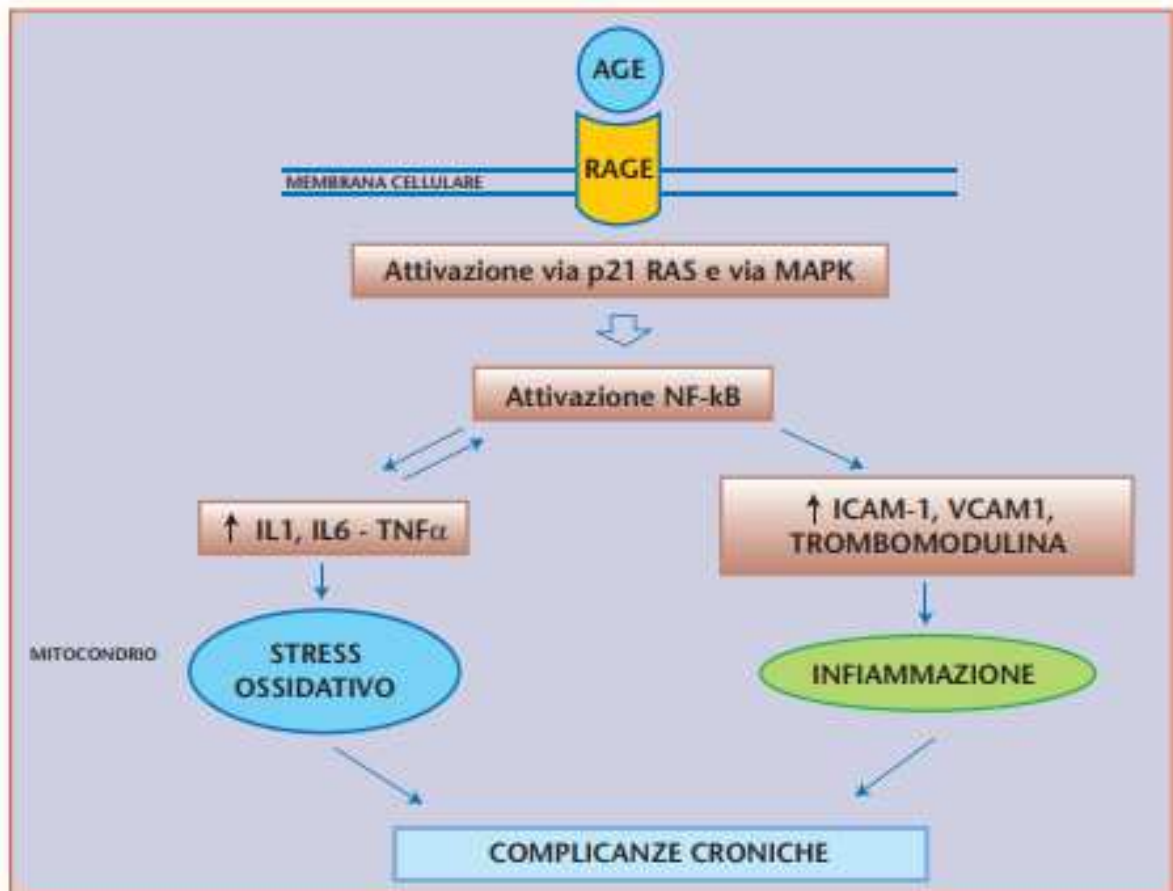


Figura 17: Signalling intracellulare innescato dall'interazione degli AGEs con il recettore transmembrana RAGE. (Fonte Chilelli et al.2016)

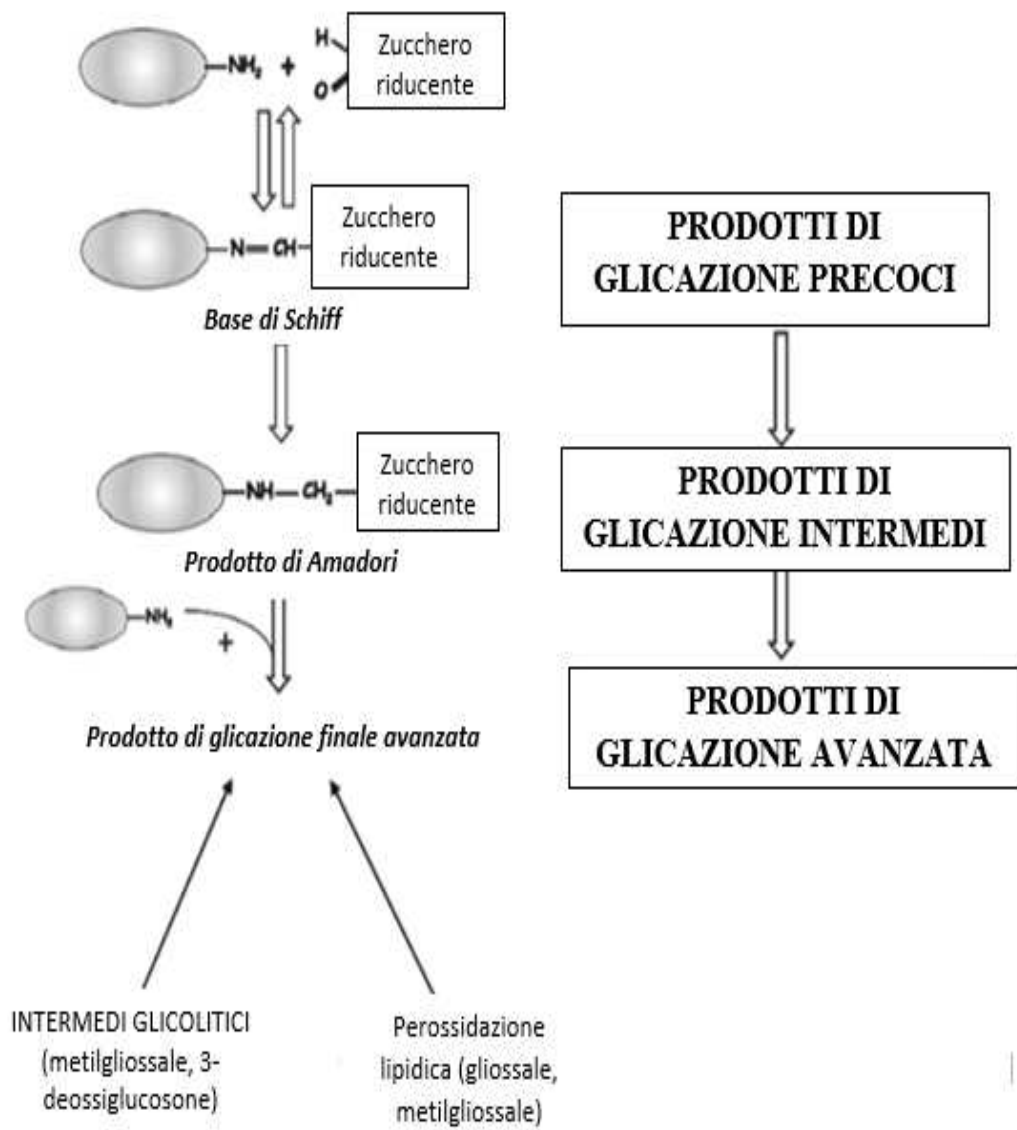


Figura 18: passaggi principali nella formazione degli AGEs (Stinghen et al. 2016)

2.2 Disfunzione mitocondriale e stress ossidativo indotto dall'iperglicemia

L'iperglicemia promuove così anche la disfunzione mitocondriale, contribuendo alla sintesi dei ROS. Infatti in queste condizioni gli alti livelli di glucosio portano ad un aumento del piruvato, aumentando il flusso di NADH e FADH₂ nella catena di trasporto mitocondriale e di conseguenza aumentando il voltaggio del gradiente lungo la membrana mitocondriale. A questo punto, il trasferimento degli elettroni nel complesso III è bloccato, causando il ritorno degli elettroni al coenzima Q₁₀ che dona gli elettroni alla molecola di ossigeno, generando anione superossido. La produzione di ROS viene normalizzata attraverso la proteina disaccoppiante 1 (UCP-1) o tramite la SOD, prevenendo l'accumulo di ROS indotto dall'iperglicemia (Anabela P. 2006; Trumpower et al. 1990) (Figura 18).

In più aumentati livelli dei metaboliti glicolitici a monte della gliceraldeide-3-fosfato legati alla sintesi del metilgliosale, attivano la via degli AGEs. Infatti la gliceraldeide-3-fosfato viene convertita in modo non enzimatico in metilgliosale, il principale precursore AGEs intracellulare che può indurre l'espressione del RAGE.

L'iperglicemia attraverso il pathway di accumulo di AGEs induce stress ossidativo e promuove lo scorretto ripiegamento delle proteine nel reticolo endoplasmatico e quindi la disfunzione del reticolo stesso. Quest'ultima causa

una deplezione di GSH, una perdita di calcio dal lume del ER nel citosol e una deplezione di ATP che può compromettere l'integrità strutturale e funzionale del mitocondrio, stimolando la produzione di ROS. A loro volta i ROS possono alterare il ripiegamento delle proteine, inducendo un accumulo di proteine non ripiegate nel ER e attivando così tutta una serie di vie che conducono all'infiammazione. Tra queste si ha l'attivazione del NF- κ B, l'espressione dei chaperoni, e l'attivazione delle caspasi (figura 19).

L'iperglicemia, aumentando lo stress ossidativo scatena attraverso le vie spiegate precedentemente danni ossidativi a livello cellulare, creando disfunzioni a livello di diversi organi quale il pancreas, cuore, vasi sanguigni, reni, cervello e retina. Le disfunzioni sono elencate nella figura 20.

Diversi studi hanno valutato la correlazione tra l'aumento dei ROS in condizioni di iperglicemia e l'infiammazione; tra questi si elencano nella tabella 3 oltre agli studi anche i modelli cellulari presi in considerazione e i ROS che sono stati analizzati.

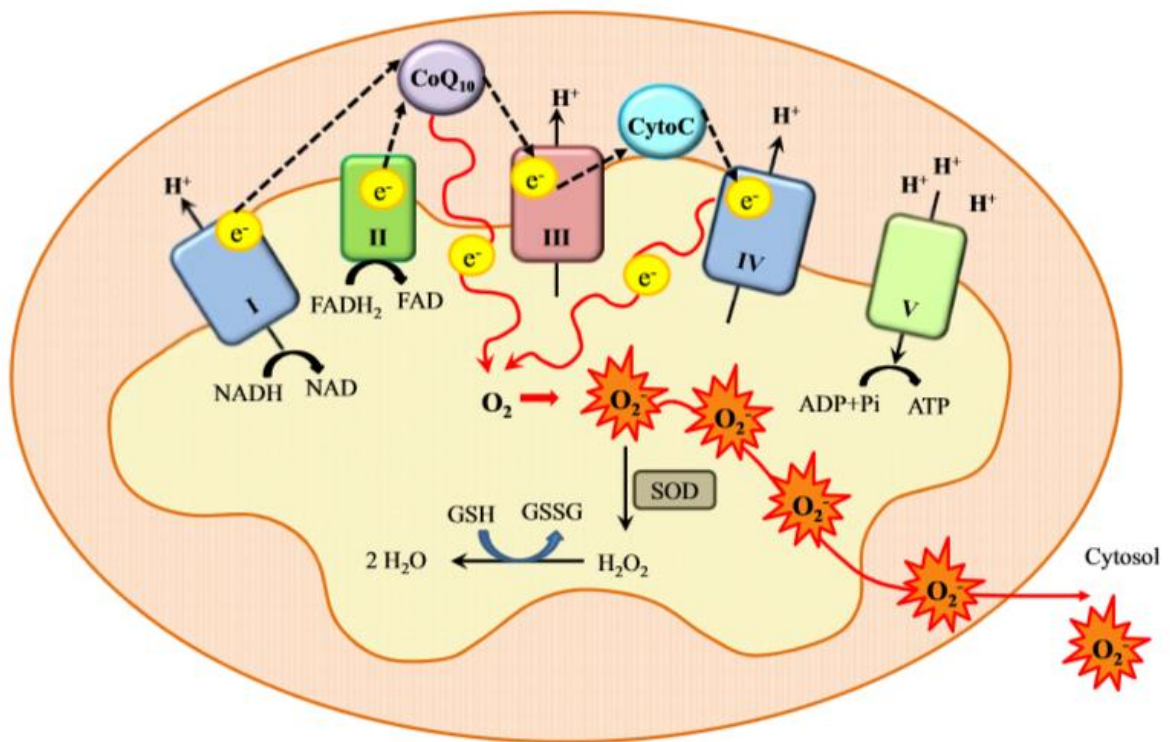


Figura 19: catena di trasporto mitocondriale in condizioni iperglicemiche (fonte: Fiorentino et al.

2013)

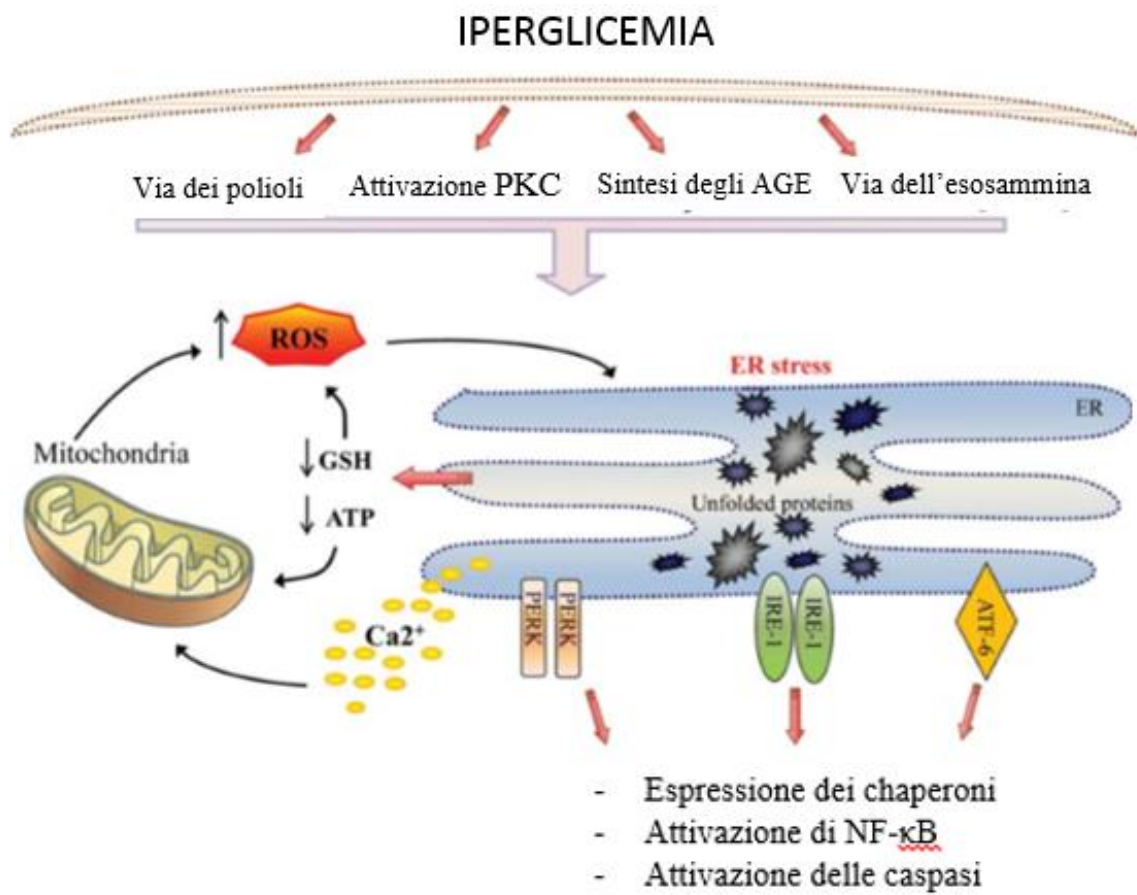


Figura 20: effetto dell'iperglicemia a livello del reticolo endoplasmatico e del mitocondrio (fonte Fiorentino et al 2013)

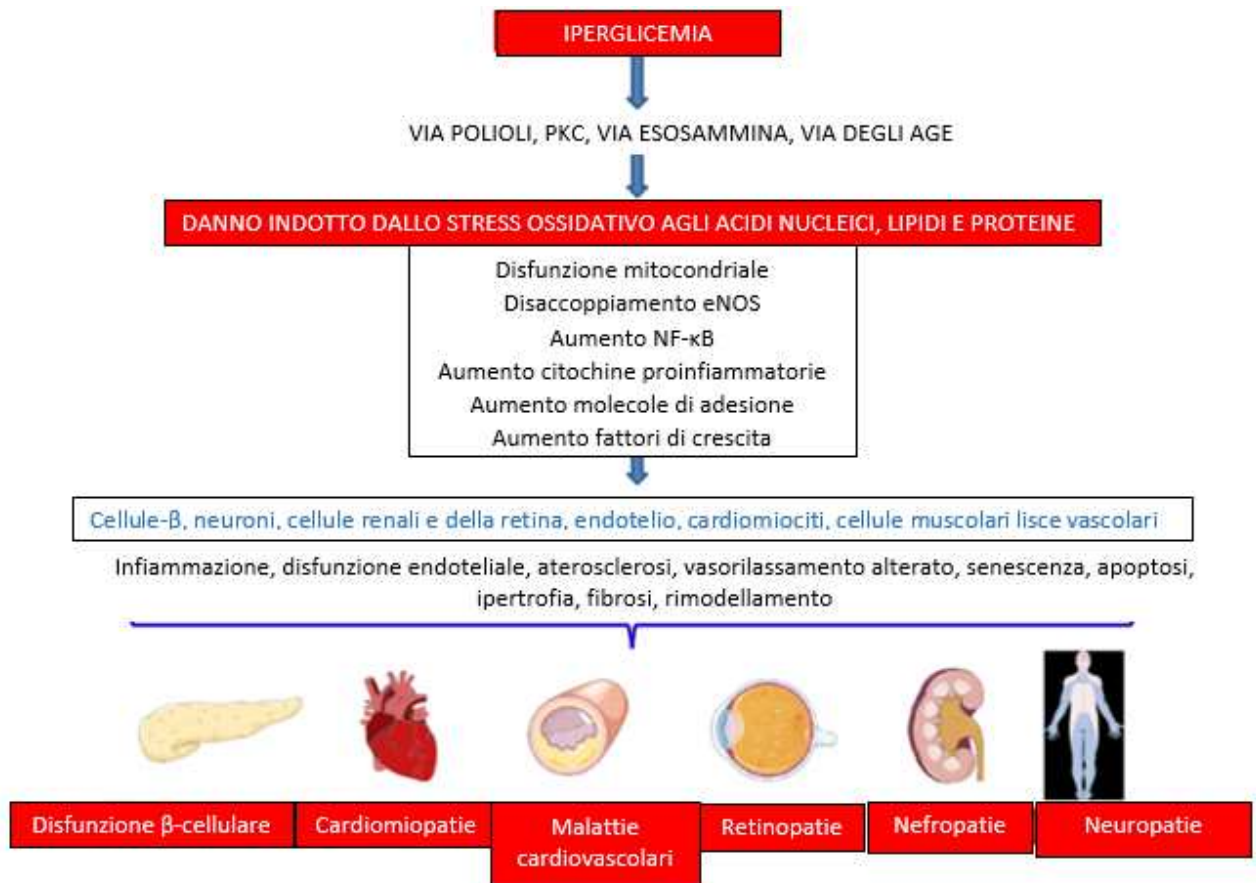


Figura 21: correlazione tra iperglicemia, stress ossidativo e sviluppo di patologie

(fonte: Bigagli et al. 2019)

MODELLO	TRATTAMENTO	ROS	STUDIO
ARPE-19 (Adult Retinal Pigment Epithelial cell line-19)	Ctrl 5.5 mmol/l D-glucosio Glucosio 25 mmol/l D-glucosio	ROS totali Livelli di malondialdeide (MDA) Attività della SOD	CTRP3 inhibits high glucose-induced oxidative stress and apoptosis in retinal pigment epithelial cells (Jian Zhang, 2019)
HRPE (human retinal pigment epithelial cell) HMC (human Müller cells)	5, 15,20 e 25 mmol/l di glucosio	ROS totali ROS a emivita molto breve Produzione mitocondriale di superossido	Hyperglycemia-Induced Reactive Oxygen Species Toxicity to Endothelial Cells Is Dependent on Paracrine Mediators (Busik et al. 2008)
hBMSC (Bone Mesenchymal Stromal Cells)	25 mM di glucosio	Perossido di idrogeno/perossidasi	High glucose level impairs human mature bone marrow adipocyte function through increased ROS production (Rharass et al, 2019)
MDA-MB-231 (breast cancer-derived cells)	Ctrl 5.6 mmol/L di glucosio Glucosio 30 mmol/L glucosio	ROS totali	High glucose and insulin enhance uPA expression, ROS formation and invasiveness in breast cancer-derived cells (López et al 2016)
DRG neurons	20 mM glucosio	SOD Catalasi GSH	Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons (Vincent AM et al 2005)
Isolotti pancreatici umani isolati	Ctrl 5.6 mmol/L di glucosio Glucosio 30 mM glucosio	Livelli di perossidi intracellulari	β-Cell Glucose Toxicity, Lipotoxicity, and Chronic Oxidative Stress in Type 2 Diabetes (Robertson et al. 2004)
HepG2 (cellule epatiche)	Ctrl 5 mM glucosio Glucosio 50 mM D-glucosio	ROS totali Perossidazione lipidica Glutazione	Nanoceria Attenuated High Glucose-Induced Oxidative Damage in HepG2 Cells Shokrzadeh et al. 2016)

Tabella 3: studi che dimostrano una correlazione tra lo stress ossidativo e l'iperglicemia

Lo studio dell'iperglicemia a livello intestinale non è invece stato approfondito da questo punto di vista, ma ci sono studi come quello di Andrade et al. (2018), in cui hanno valutato l'effetto dello stress ossidativo sui trasportatori intestinali degli zuccheri, in particolare quelli del GLUT2, GLUT5 e SGLT1, dimostrando che questi tre trasportatori presentano sensibilità differenti nei confronti dello stress ossidativo. Ad esempio, SGLT1 (co-trasportatore sodio-glucosio) è il più sensibile, mentre GLUT5 (trasportatore di glucosio facilitato) è quello meno sensibile. Inoltre si è notato da altri studi che le alte concentrazioni di glucosio alterano i livelli di espressione dell'mRNA di geni coinvolti nella regolazione dei geni, in particolare quelli che codificano per questi trasportatori (GLUT2, GLUT5 e di SGLT1), osservando che in questo controllo dell'assorbimento intestinale di glucosio è presente l'influenza di specifici meccanismi molecolari e geni (Botztepe e Gulec 2018).

Si è anche dimostrato che la glucosio 6-fosfatasi è espressa negli esseri umani anche a livello intestinale e può quindi contribuire al rilascio di glucosio endogeno in circolo, ipotizzando un ulteriore aumento di esso in condizioni di iperglicemia in pazienti affetti ad esempio da diabete (Rajas et al 1999).

Altri autori hanno invece determinato che il glucosio agisce direttamente sulle cellule epiteliali intestinali influenzando la funzione della barriera, utilizzando il sistema di colture cellulari Caco-2 esponendole a diverse concentrazioni di

glucosio. Ciò che si è osservato è che l'integrità delle giunzioni strette è alterata in maniera dose e tempo-dipendente causando delle alterazioni morfologiche (Thaiss et al. 2019). Sempre dagli stessi autori si è visto che l'iperglicemia interferisce con l'integrità omeostatica epiteliale, portando a influssi anormali di prodotti microbici immuno-stimolatori e ad una maggiore propensione alla diffusione sistemica di patogeni enterici. Inoltre l'iperglicemia causa un trasporto retrogrado di glucosio nelle cellule epiteliali intestinali attraverso GLUT2, seguito da alterazioni nel metabolismo del glucosio intracellulare e riprogrammazione trascrizionale (Thaiss et al. 2019).

Quindi, poiché diversi studi hanno mostrato un'associazione tra lo stress ossidativo e l'iperglicemia ma pochi hanno associato questi due fattori con i modelli cellulari intestinali, lo scopo di questa tesi è quella di andare a valutare gli effetti dell'iperglicemia nelle cellule intestinali dal punto di vista glicossidativo.

PARTE

SPERIMENTALE

3 MATERIALI E METODI

3.1 Modello sperimentale: linea cellulare CaCo-2

Per lo studio è stata utilizzata una linea cellulare umana denominata CaCo-2 (CArcinoma COlorectal cells). La linea cellulare Caco-2 umana intestinale rappresenta il miglior modello *in vitro* di enterociti assorbitivi nonostante la sua origine da un adenocarcinoma del colon. In coltura si avvia un processo spontaneo di differenziazione che porta alla formazione, dopo due o tre settimane, di uno monostrato di cellule polarizzate accoppiato a giunzioni strette che esprime molte delle caratteristiche morfologiche e funzionali degli enterociti del piccolo intestino.

Il terreno usato per la differenziazione di queste cellule contiene un supplemento di FBS (siero bovino fetale) sia per la crescita del compartimento apicale che basale (Ferruzza et al. 2012).

Le cellule vengono fatte crescere in fiasche T25 e T75 fino a raggiungere la formazione di un monostrato con giunzioni strette funzionali e microvilli a livello apicale (orletto a spazzola). Il monostrato cellulare fornisce una barriera fisica e biochimica al passaggio di ioni e piccole molecole; esso, inoltre, separa il modello in due comparti ben distinti come accennato brevemente sopra: quello apicale che svolge la funzione assorbitiva in quanto rivolto verso il lume

intestinale *in vivo* e ai trattamenti *in vitro* e quello basolaterale che è in stretta associazione con la circolazione sanguigna e linfatica dell'organismo sempre *in vivo*.

In questo modello sono stati trovati valori di permeabilità che si correlano bene con i dati umani di assorbimento *in vivo* per farmaci, sostanze chimiche e piccole molecole come il glucosio.

Dal punto di vista operativo, queste cellule sono state fatte crescere in adesione e mantenute in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenente L-glutamina, supplementato con il 10% di FBS "Fetal Bovine Serum" (scomplementato per 30' a 56° C, necessario in quanto fornisce alla cellula fattori per la crescita), 5mM di L-glutamina, 10 mM di amminoacidi non essenziali e 100 U/ml di penicillina/streptomina. Le CaCo-2 vengono poi mantenute in termostato a 37°C con 5% CO₂ e 95% di aria atmosferica in ambiente umidificato. Il cambio del terreno viene effettuato ogni 2 giorni e le cellule vengono utilizzate per gli esperimenti dopo 14 giorni dalla semina. I tempi di crescita per raggiungere la confluenza al 100% sono di circa una settimana in condizioni ottimali. (Figura 21)

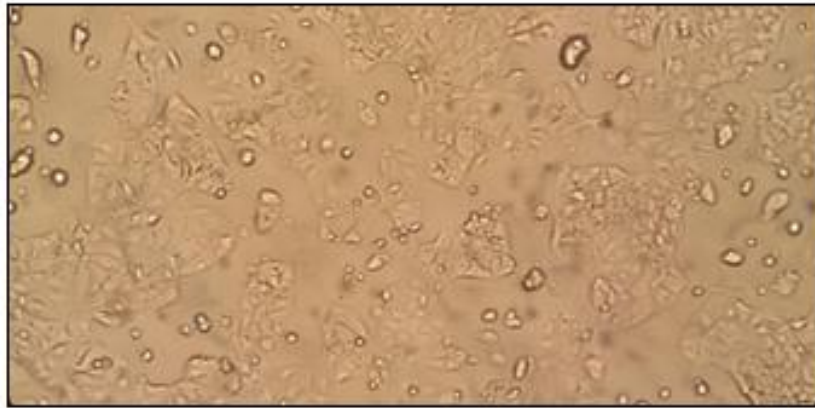


Figura 22: Caco-2

3.2 Trattamento delle cellule con il glucosio

Per questo tipo di trattamento le cellule Caco-2 sono state coltivate in DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium) come spiegato precedentemente, a cui sono stati aggiunti 25 mM di glucosio per simulare la condizione di iperglicemia in vitro, facendo analisi poi ad una settimana. Nell'arco di essa il terreno è stato cambiato due volte.

La scelta di una concentrazione di glucosio pari a 8g/l, corrispondenti a 50mM usati nei nostri esperimenti, deriva da studi precedenti, in cui sono state documentate le alterazioni della morfologia e dei processi cellulari in seguito all'esposizione cronica al glucosio che sono stati trattati nel capitolo precedente (Thaiss et al. 2019).

Le cellule Caco-2 coltivate ad alta concentrazione di glucosio, infatti, promuovono da una parte la crescita rapida e differenziale ma dall'altra induce anche dei cambiamenti significativi nei processi cellulari. (Briske-Anderson 1997; Bestwick 2001).

3.3 Estrazione proteica totale e determinazione della concentrazione proteica mediante saggio di Bradford

Per quanto riguarda le tecniche usate di base, si ha l'estrazione proteica totale seguita dalla sua quantificazione utilizzando il metodo di Bradford. Per ottenere l'estratto proteico, da ogni fiasca si deve prima ottenere il pellet cellulare tramite una serie di lavaggi in PBS seguito poi dallo stacco per azione della tripsina (5 minuti a 37 °C con 5% CO₂). La tripsina è l'enzima più frequentemente impiegato per la disgregazione delle giunzioni cellulari perché è ben tollerata da molti tessuti e viene facilmente neutralizzata con il siero presente nel terreno. Successivamente i terreni contenenti le cellule staccate vengono centrifugati a 1200g per 10 minuti. Se non utilizzati vengono stoccati a -20°C.

I pellet ottenuti vengono poi lavati due volte con PBS freddo (soluzione salina acquosa contenente cloruro di sodio, fosfato di sodio e in alcune formulazioni

cloruro di potassio). Poi essi si risospendono utilizzando un tampone di estrazione costituito da un tampone sodio-fosfato 10 mM a pH 6.8, un mix di inibitori di proteasi (aprotinina e pepsatina) e NP40 0,5% o con tamponi presenti in commercio come il Ripa Buffer. A seconda del tampone si utilizzano degli inibitori di proteasi con specifiche proprietà inibitorie. Ad esempio l'aprotinina inibisce le serina proteasi, tra cui tripsina, chimotripsina e plasmina, mentre la pepsatina inibisce le proteasi acide. Le cellule risospese vengono mantenute per 40 minuti in ghiaccio, poi centrifugate a massima velocità per 15 minuti a 4 °C. I surnatanti vengono recuperati e il contenuto proteico è stato determinato mediante spettrofotometro con il metodo di Bradford (Bradford, 1976) con proteina BSA come standard. Per questo saggio è stato utilizzato il reattivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) costituito da una soluzione acquosa di Blu Brillante di Comassie (BBC) G-250, metanolo e acido fosforico. La formazione del legame tra il colorante (BBC) presente nel reattivo di Bradford e le proteine del campione da saggiare determinano uno spostamento del massimo di assorbimento della soluzione da 465 a 595 nm, lunghezza d'onda alla quale viene effettuata la lettura dei campioni. Allestendo una curva di taratura utilizzando una proteina standard (BSA) a concentrazione nota è possibile ricavare per interpolazione il titolo proteico relativo ai campioni di interesse.

3.4 Western blot

Per l'analisi dell'espressione delle proteine, quantizzate seguendo il metodo precedente, viene effettuato il Western Blot.

Un quantitativo di estratto proteico pari a 50 µg per ciascun campione, calcolato grazie a delle equazioni che permettono di quantizzare la proteina dalla retta di taratura, è stato assoggettato ad elettroforesi in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), impiegando un running gel ad una concentrazione di poliacrilammide pari al 12%. Ogni campione caricato contiene 15 µL di campione + H₂O (per portare a volume in caso di un volume piccolo) + 5 µL di sample buffer 4X. Nella stessa corsa viene caricato a parte il marker. La corsa viene effettuata per un tempo di circa 1h e 30 minuti a 200V costante. La corsa elettroforetica in queste condizioni porta alla separazione per dimensioni della proteina. Terminata la corsa elettroforetica è stato effettuato il trasferimento delle proteine dal gel ad una membrana di PVDF. Questa membrana, essendo altamente idrofobica, è stata attivata in metanolo al 100% e poi in acqua per 2-3 minuti mentre il gel è stato immerso nel tampone di trasferimento freddo. Successivamente si è assemblato il sistema di trasferimento su un supporto costituito da due lastre di plastica, disponendo in successione uno sull'altro una spugnetta e un pezzo di carta da filtro (Whatman) imbevuti di tampone di trasferimento. Di seguito si aggiungono il gel, la membrana di PVDF (delle

stesse dimensioni del gel), un altro pezzo di carta da filtro e un'altra spugnetta (sempre precedentemente imbevuti di tampone di trasferimento). Il sistema così assemblato viene posto 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. Le proteine, cariche negativamente, migrano verso il polo positivo passando dal gel alla membrana. Il trasferimento viene protratto overnight a 48 mA in frigorifero. Dopodiché la membrana, su cui sono state trasferite le proteine relative agli estratti proteici, è stata sottoposta ad una procedura di bloccaggio mediante incubazione per due ore a temperatura ambiente con TBS tween (Tris HCl 20 mM a pH 7,6, NaCl 140 Mm, Tween 20 allo 0,1%) e latte al 5%. Successivamente sono stati effettuati diversi lavaggi dai 5 ai 10 minuti ciascuno in un tampone (es. TBS o PBS-tween1X), a cui è seguita un'incubazione per 2 ore e 30 minuti a temperatura ambiente con gli anticorpi specifici anti-proteina che si vuole identificare e quantizzare, contenente BSA all'1%. Vengono eseguiti poi altri lavaggi da 5-10 minuti ciascuno con le soluzioni di prima (TBS o PBS tween a seconda del protocollo) e si procede così all'incubazione di circa 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente con anticorpo secondario coniugato con un substrato che permetta poi la rivelazione della proteina di interesse. Successivamente vengono svolti altrettanti lavaggi da 5-10 minuti ciascuno.

Per finire si rivela la proteina utilizzando l'enzima che reagisce con il substrato presente sull'anticorpo secondario. L'acquisizione delle immagini relative ai filtri ha previsto l'impiego del Gel/Chemidoc (Biorad), strumento in grado di acquisire il segnale chemioluminescente della/e banda/e di interesse.

L'uso del western blot è stato utilizzato, seppur con delle piccole varianti del protocollo, per analizzare l'espressione della PON2, degli AGEs e quella della caspasi 9. Gli anticorpi utilizzati sono: anticorpi policlonali anti-rabbit anti-PON2 e anti-caspasi 9; per la caspasi 8 sono stati usati anticorpi anti-mouse monoclonali mentre sono stati utilizzati anticorpi policlonali anti-goat anti-AGEs. Come secondari sono stati utilizzati anticorpi anti-rabbit coniugati con la perossidasi e anti-goat per gli AGEs coniugati con la fosfatasi.

3.5 Valutazione della produzione di ROS

I livelli intracellulari di ROS sempre nella linea cellulare Caco-2, trattate nelle diverse condizioni sperimentali, sono stati rilevati mediante saggio di fluorescenza su piastra da 96 pozzetti. Sono state piastrate 25.000 cellule per pozzetto e fatte aderire overnight. Rimosso il terreno, viene poi aggiunto il tampone 1X. Una volta rimosso anche il buffer è stata aggiunta la DCFDA (2',7'-diclorofluorescina diacetato) disciolta in DMSO (25µM) alle cellule e

lasciate incubare per 45 minuti a 37°C al buio. In questo periodo di tempo, la DCFDA penetra all'interno delle membrane cellulari, poi tramite le esterasi cellulari il diacetato viene rimosso e poi può reagire con i ROS trasformandosi in un composto fluorescente (Figura 23).

Dopo l'incubazione, la soluzione di DCFDA è stata rimossa e sono stati aggiunti 100µL di PBS e subito dopo segue la lettura nel lettore automatico a piastre, impostando la lunghezza d'onda di eccitazione a 485 nm e la lunghezza d'onda di emissione a 535 nm.

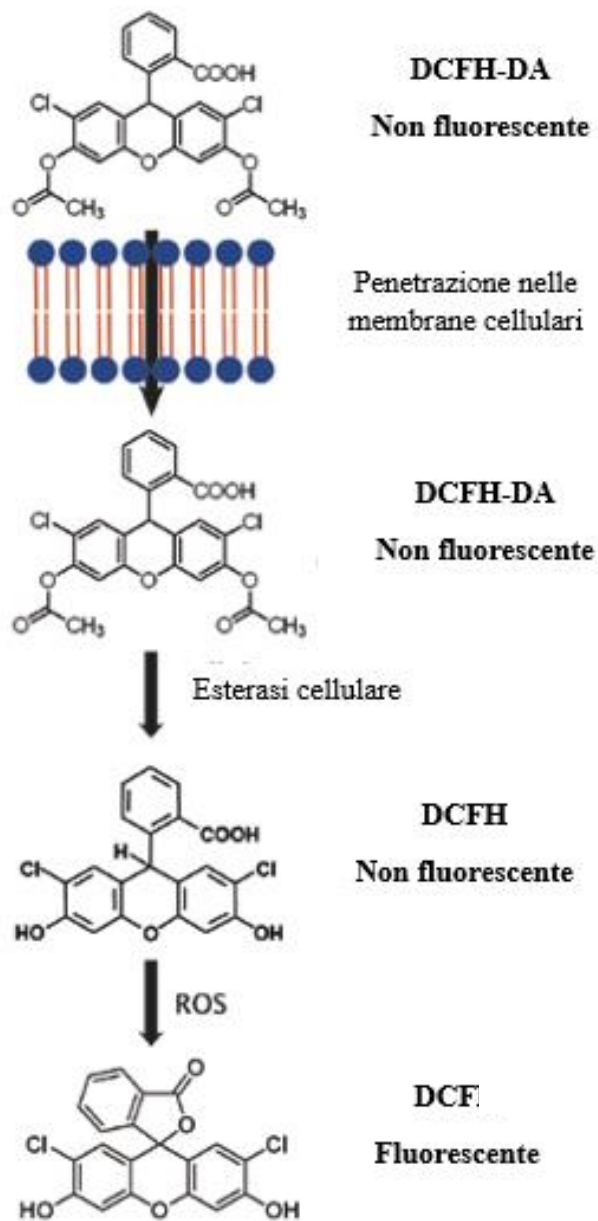


Fig 23: Meccanismo di attivazione della Carbossi-H₂DCFDA

3.6 Valutazione della perossidazione lipidica

Gli agenti ossidanti possono alterare la struttura lipidica in quanto formano perossidi lipidici che provocano la formazione di malondialdeide (MDA), la quale può essere misurata con dei substrati definiti TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) (Tsikas, 2017).

Nel saggio, in presenza di calore e acido, l'MDA reagisce con TBA per produrre un prodotto finale colorato che assorbe la luce a 530-540 nm. L'intensità del colore a 532 nm corrisponde al livello di perossidazione lipidica nel campione.

Per effettuare l'analisi sono state preparate due soluzioni: quella con l'acido tricloroacetico (TCA) al 20% e quella con l'acido tiobarbiturico (TBA) allo 0,67%. Si pone 1 ml di entrambe le soluzioni nei campioni e successivamente si mettono al calore a 37°C per 1 ora.

Dopo il raffreddamento si aggiungono 2 ml di butanolo per separare le due fasi e si pongono i campioni in centrifuga a 4.400g per 10 min.

Una volta centrifugati viene recuperato il surnatante e viene effettuata la lettura allo spettrofotometro $\lambda=532\text{nm}$ confrontando i risultati con la curva standard del TMP (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) (Figura 24) (Linden A. et al, 2008).

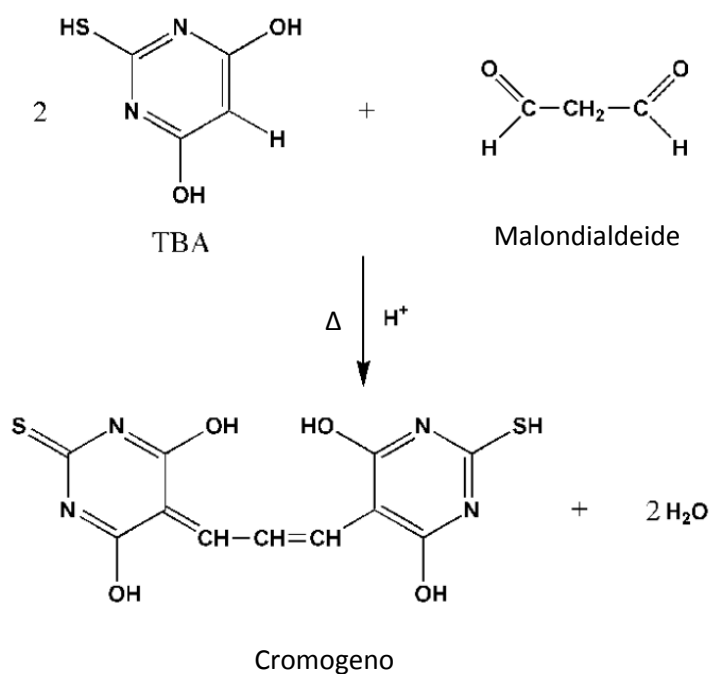


Figura 24: Schema della reazione tra TBA (acido Tiobarbiturico) e MDA(malondialdeide). In presenza di acidi e di calore due molecole di acido 2-tiobarbiturico (TBA) reagiscono con MDA per produrre un prodotto finale colorato che può essere facilmente quantificabile

3.7 Valutazione dei composti di glicazione (AGEs)

Per andare a verificare la glicazione all'interno delle cellule Caco-2 in condizioni di iperglicemia sono stati utilizzati due metodi. Un primo metodo utilizzato ha lo scopo di misurare la maggior parte degli AGEs fluorescenti, i quali emettono una fluorescenza intrinseca con un'eccitazione massima a 370 nm e di emissione intorno a 445 nm rilevabile tramite fluorescenza.

In particolare, il glucosio quando reagisce con le proteine innesca la reazione di Maillard portando alla formazione di composti di glicazione primari (prodotti di Amadori) e successivamente a composti altamente reattivi come metilgliosale, gliosale e glicolaldeide (GA). Questi reagendo con le proteine determinano la formazione dei composti di glicazione avanzata (AGEs) tra cui le GA-modified proteins e gli AGEs fluorescenti.

Dall'estratto proteico della linea cellulare CaCo-2 sono state prelevate delle aliquote di campione tali da ottenere 100 µg di proteine totali.

Successivamente è stato settato lo strumento in modo tale da avere una λ di eccitazione pari a 350 nm e una λ di emissione tra 315 nm e 500 nm con lo scopo di confrontare gli spettri d'emissione di fluorescenza dei composti di glicazione avanzata nei due campioni (controllo e glucosio).

La lettura è stata effettuata in una cuvetta di quarzo. Prima di ogni prova si è azzerato lo strumento con acqua deionizzata e successivamente si è passato alla lettura dei campioni (Figura 25).

Un secondo metodo ha previsto l'uso del western blot per andare a valutare i livelli di AGEs derivanti dalla glicolaldeide (GA) (GA-modified proteins). Per evidenziare questi composti si è utilizzato l'anticorpo anti-goat anti-GA come primario e l'anticorpo anti-goat coniugato con la fosfatasi acida come secondario.

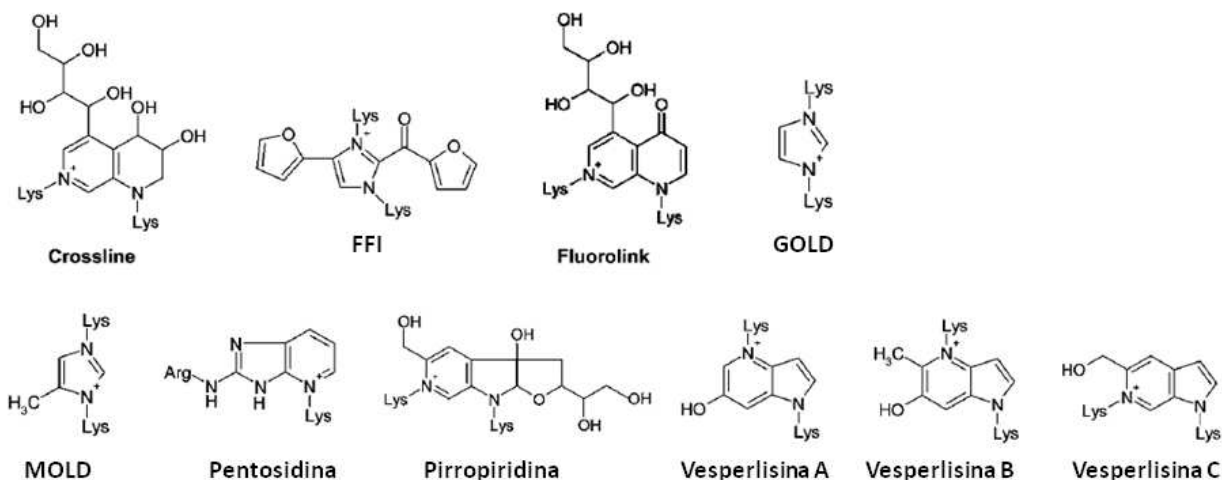


Figura 25: Composti fluorescenti AGEs che possono essere presenti all'interno del pattern di glicazione

3.8 Saggio MTT

La funzionalità mitocondriale è stata valutata mediante il saggio biochimico dell'MTT. Le cellule CaCo-2 sono state seminate in una piastra da 12-well (250.000 cellule per pozzetto) e dopo 24 ore di incubazione sono state trattate per una settimana con il glucosio 25mM o meno e mantenute in termostato a 37° C in atmosfera al 5% di CO₂.

Dopo una settimana di trattamenti e incubazione è stato eseguito il test dell'MTT. Tale saggio è un test di citotossicità cellulare che valuta l'attività catalitica della succinato-deidrogenasi mitocondriale, in grado di scindere l'anello tetrazolico del composto MTT [3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] aggiunto al terreno di coltura, convertendolo in un sale di formazano dal colore blu scuro-violetto che si accumula all'interno della cellula vitale. Trattando le cellule con un opportuno reagente si ottengono dei lisati aventi una colorazione la cui intensità è direttamente proporzionale alla quantità di formazano prodotta e di conseguenza al numero di cellule vitali. Un volume pari a 10 µl di MTT (5 mg/ml in PBS) è stato depositato all'interno di ciascun pozzetto. Dopo un'incubazione di 2 ore a 37 °C il terreno è stato rimosso e sono stati aggiunti 300 µl di DMSO. Dopo 30 minuti è stata letta l'assorbanza dei lisati ad una lunghezza d'onda di 540 nm, utilizzando un lettore automatico per piastre ELISA.

3.9 Livelli e attività delle caspasi

Per meglio comprendere la funzionalità cellulare nelle diverse condizioni sperimentali, sono stati valutati anche i livelli e le attività delle caspasi.

L'espressione di questi enzimi è stata valutata usando il metodo del western blot. In particolare sono stati usati gli anticorpi policlonali anti-rabbit anti-caspasi 9 e anticorpi monoclonali anti-mouse come primari, mentre come secondari sono stati utilizzati anticorpi anti-goat.

L'attività della caspasi 3 e della caspasi 8 è stata valutata per mezzo di un kit seguendo le istruzioni del produttore. $1-5 \times 10^6$ cellule sono state lisate per mezzo di un tampone di lisi cellulare specifico. L'estratto citosolico è stato poi centrifugato a $10.000 \times g$ per un minuto a 4°C e il surnatante poi è stato raccolto per stimare le proteine usando il metodo Bradford.

Poi sono stati aggiunti $200 \mu\text{g}$ di proteina a $50 \mu\text{l}$ di reaction buffer ad ogni campione con 10 mM di MTT e $200 \mu\text{l}$ di substrato. Nel caso della caspasi 8 il substrato è IETD-pNA, mentre per la caspasi 3 è il DVED-pNA. Si lascia poi incubare per 1 ora a 37°C . I campioni poi sono stati letti in un lettore per piastre automatico a 405 nm .

3.10 Valutazione dell'apoptosi

Essendo le caspasi dei regolatori primari dell'apoptosi si è valutata anche l'apoptosi, utilizzando un tipo di protocollo denominato FITC Annexin V Apoptosis Detection. Questa analisi sfrutta l'annexina V, un membro della famiglia dell'annexina, che è una proteina intracellulare che si lega alla fosfatidilserina in modo calcio dipendente. In condizioni di buona salute per le cellule, la fosfatidilserina si trova nella parte più interna della membrana cellulare, mentre durante l'apoptosi precoce l'asimmetria della membrana viene persa e la fosfatidilserina viene esposta anche esternamente. Il fluorocromo legato all'annexina V può essere quindi usato per andare a legare e identificare le cellule apoptotiche.

Anche qui le cellule sono state tripsinizzate per staccarle dalla fiasca T75, lavate con PBS due volte e risospese ad una concentrazione di 10^6 cellule/ml in 1X Binding Annexin V-FITC (0.25 $\mu\text{g/ml}$) e di ioduro di propidio (1 $\mu\text{g/ml}$) e incubato al buio per 10 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono poi stati analizzati al citofluorimetro. Per ogni campione sono stati acquisiti 5000 eventi. Annexin V-FITC emette fluorescenza sul verde mentre lo ioduro di propidio emette una fluorescenza sul rosso.

Si ottiene così l'identificazione e la distinzione dal punto di vista sia qualitativo che quantitativo delle cellule che sono in buono stato di salute, quelle che sono

in apoptosi precoce (Annexin V+/PI-), quelle in apoptosi tardiva (Annexin V+/PI+) e le cellule in necrosi (Annexin V-/PI+).

3.11 Valutazione delle attività degli enzimi antiossidanti

3.11.1 Determinazione dell'espressione e dell'attività lattonasica della PON2

Tra gli enzimi antiossidanti, un enzima particolarmente studiato è stato la paraoxonasi 2, di cui si è andata a valutare sia l'espressione che l'attività.

Per valutare l'espressione di esso si è usata la metodica precedentemente descritta del western blot. In particolare sono stati usati anticorpi policlonali di coniglio anti-PON2 come primario e anticorpi anti-rabbit come secondario.

L'attività lattonasica della PON2 nei campioni cellulari relativi alle CaCo2. Il substrato utilizzato è il lattone sintetico tiobutil- γ -butirrico (TBBL). Come mostrato nella Figura 25, il TBBL viene idrolizzato ad opera dell'enzima PON2 formando un intermedio instabile che va incontro ad una rapida e spontanea rottura. Il tio-alcol che ne deriva, riducendo l'acido ditio-nitrobenzoico (DNTB) produce una molecola di acido nitrobenzoico che assorbe a 412 nm (Khersonsky et al., 2006). La metodica è stata modificata per adeguarla alle nostre condizioni sperimentali. Ciascun pellet cellulare è stato lavato e risospeso in un buffer di lisi RIPA 10X con l'aggiunta di un cocktail di inibitori

delle proteasi e sottoposti a rottura meccanica. I campioni sono stati successivamente centrifugati per 10 minuti a 13000 g a 4° C. Il surnatante ottenuto è stato utilizzato per saggiare l'attività lattonasica. La miscela di reazione è stata preparata aggiungendo al campione cellulare (~50 µg di proteine) un tampone Tris-HCl (22 mM) contenente CaCl₂ (1 mM) e DTNB (0,5 mM). Dopo incubazione per 5 minuti a 37°C, alla miscela è stato aggiunto il substrato TBBL (0,2 mM). Ciascuna miscela di reazione è stata allestita in un volume pari a 400 µL. Il bianco è stato allestito mettendo 50 µL di RYPA buffer 10X al posto del campione. L'idrolisi del substrato ad opera dell'attività lattonasica della PON2 è stata valutata mediante la determinazione dell'assorbanza a 412 nm. Per la PON2 l'unità di attività enzimatica è definita come la quantità di enzima che catalizza la reazione di formazione di 1 µmole di TBBL idrolizzata in 1 minuto per ml. I valori dell'attività della PON2 sono stati espressi in termini di attività specifica (U/mg), parametro che si ottiene dal rapporto tra l'attività enzimatica (U/ml) e la concentrazione proteica (mg/ml) (Giordano et al., 2013). I risultati sono stati normalizzati per i mg di proteina presenti per ogni campione.

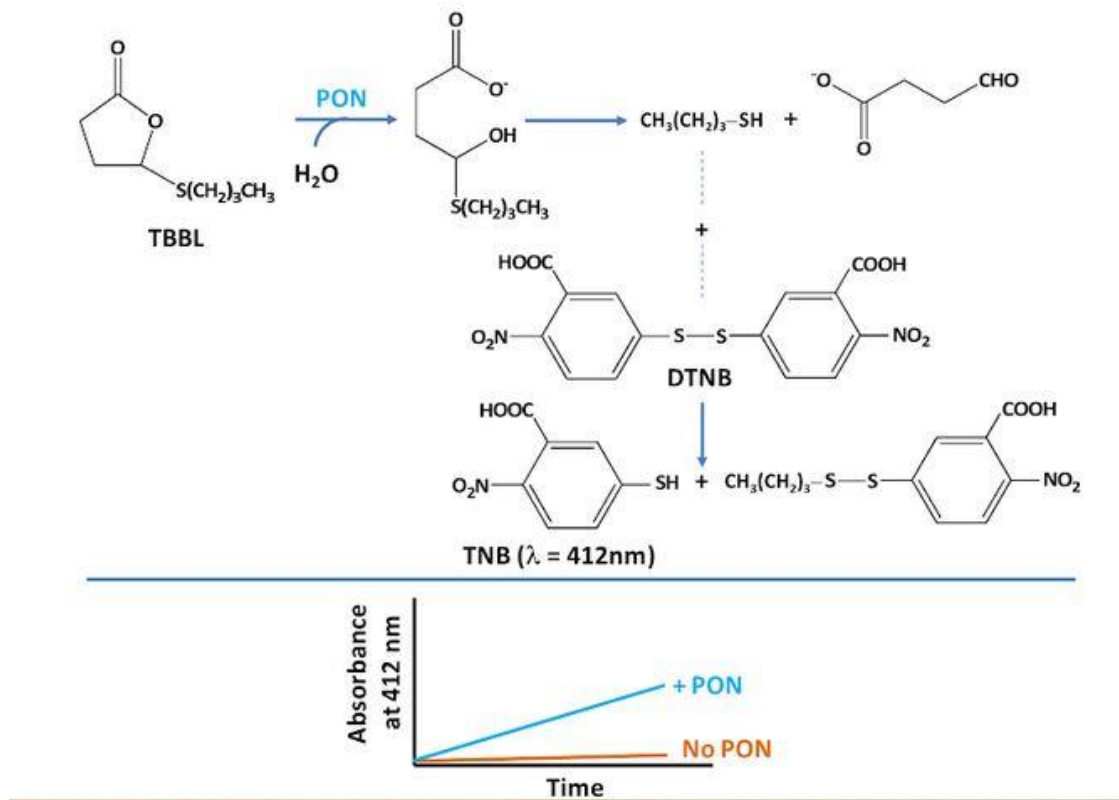


Figura 26: Reazione enzimatica del substrato sintetico TBBL

3.11.2 Determinazione dell'attività della glutazione reduttasi

Le attività relative alla glutatione S-transferasi (GST), alla glutatione reduttasi (GR) e alla glutatione perossidasi sono state misurate tramite dei saggi enzimatici. Per quanto riguarda l'attività della glutatione reduttasi, questa è stata analizzata tramite il metodo descritto da Carlberg e Mannerwik, in cui si misura la diminuzione dell'assorbanza a 340 nm in seguito all'ossidazione del NADPH durante la riduzione del GSSH. Il saggio prevede l'uso di 100mM di sodio fosfato a pH 7.0, 100 μ M di NADPH e 1 mM di GSSH (glutatione ossidato); l'attività della glutatione reduttasi è stato calcolato misurando il coefficiente di estinzione (ϵ mM) per il NADPH pari a $-6.22 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}$ ed espressa come μmol di NADP^+ per min per mg di proteine.

3.11.3 Determinazione dell'attività della glutatione S-transferasi

L'attività della glutatione S-transferasi è stata invece analizzata usando l'1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) come substrato e misurando l'assorbanza dei prodotti risultanti a 340 nm, secondo il metodo di Habig e at. (1974). In particolare, il saggio colorimetrico si basa sulla reazione tra il GSH e il CDNB che è catalizzato da un ampio range di isoizimi GST, inclusi l'alfa, il mu e il pi. Il saggio è stato eseguito in sodio fosfato 100 mM a pH 6.5 con 1 mM di CDNB

e 1 mM di GSH. L'attività della glutatione transferasi definita come la quantità di enzima che produce 1 μmol di CDNB coniugato con il GSH al minuto nelle condizioni definite dal protocollo, è stato calcolato usando il coefficiente di estinzione (ϵ_{mM}) per il CDNB pari a 9.6 mM^{-1} ed espressa come μmol di CDNB coniugato al GSH per minuto per mg di proteina.

3.11.4 Determinazione dell'attività della glutatione perossidasi

Per quanto riguarda l'attività della glutatione perossidasi (GPx), essa è stata misurata usando il perossido di idrogeno come substrato. L'attività è stata saggiata in un sistema enzimatico accoppiato dove il NADPH viene consumato dalla glutatione reduttasi per convertire il GSSH formato nella sua forma ridotta (GSH). Generalmente si utilizzano differenti substrati per discriminare le diverse GPx; il cumene viene utilizzato per le GPx totali comprendenti sia le forme selenio-dipendenti che selenio-indipendenti, mentre il perossido di idrogeno (H_2O_2) misura solo le forme selenio-dipendenti. Poiché le selenio dipendenti sono quelle più espresse, sono state misurate solo le attività con il perossido di idrogeno. La diminuzione di assorbanza del NADPH è stata monitorata a 340 nm ($\epsilon_{\text{mM}} = -6.22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) usando 0.8 mM di perossido di idrogeno in 100 mM di sodio fosfato a pH 7,5 con 1 mM di EDTA, 2 mM di

GSH, 0.15 mM di NADPH e 1 mM di NaN_3 , in quanto quest'ultimo maschera l'attività della catalasi e 1 unità di glutatione reduttasi (GR).

3.11.5 Determinazione dell'attività della catalasi

Un altro enzima antiossidante utilizzato è la catalasi, un enzima che detossifica il perossido di idrogeno in acqua e ossigeno. Una volta effettuata la quantificazione delle proteine, si è valutata l'attività enzimatica su estratto cellulare. Essa è stata svolta utilizzando tampone fosfato 100 mM a pH 7, con aggiunta del substrato, cioè l' H_2O_2 e 10 μL di tampone. L'attività poi è stata misurata ad una lunghezza d'onda pari a 240 nm, mantenendo la reazione per 20-30 secondi, in modo tale da risultare lineare.

L'attività della catalasi è stato calcolato usando il coefficiente di estinzione (ϵ_{mM}) dell' H_2O_2 pari a $-0.04 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}$ ed è stata espressa come $\mu\text{mol}/\text{min}$ per mg di proteina.

3.12 Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state condotte mediante l'utilizzo del software GraphPad Prism versione 6.00 per Windows e il livello di significatività (p) fissato è pari a 0,05. I dati ottenuti dalle analisi sono stati elaborati mediante il test di Kruskal-Wallis al fine di esplorare la presenza di differenze statisticamente significative tra le cellule trattate nelle diverse condizioni sperimentali e le cellule non trattate (CTRL).

4 RISULTATI

4.1 Effetto del trattamento ad alte concentrazioni di glucosio sulla formazione di ROS intracellulari e perossidazione lipidica

La formazione dei ROS nelle cellule CaCo-2 trattate con 25 mM o 50 mM di glucosio è stata valutata mediante lo studio della fluorescenza della sonda DCF (diclorofluorescina) tramite l'analisi della fluorescenza su lettore di piastre automatico.

Come mostrato nella Figura 27, *l'esposizione cronica ad elevate concentrazioni di glucosio provoca un aumento significativo dei livelli intracellulari di ROS rispetto al controllo*. In particolare, i livelli di ROS nei campioni trattati con il glucosio 50mM (2.041 ± 0.100 unità arbitraria) sono circa due volte superiori rispetto al controllo (1.0 ± 0.1 unità arbitraria) ($p < 0,001$).

Per investigare se l'incremento del livello di ROS nelle cellule trattate con elevate concentrazioni di glucosio fosse associato ad un aumento della perossidazione lipidica sono stati valutati i livelli di malondialdeide (MDA) nelle cellule nelle diverse condizioni sperimentali. MDA è un prodotto

terminale dell'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi ed è considerato un marker biologico di danno ossidativo a carico dei lipidi (Tsikas et al. 2017).

Come mostrato nella figura 28 *cellule esposte ad elevate concentrazioni di glucosio mostrano un aumento significativo dei livelli di MDA rispetto al rispetto al controllo*. Le cellule CaCo-2 trattate con glucosio ($5,40 \pm 0,23$ nmol/mg proteina) mostrano livelli di MDA circa 5 volte più elevati rispetto alla condizione di controllo ($1,0 \pm 0,5$ nmol/mg proteina) ($p < 0,002$).

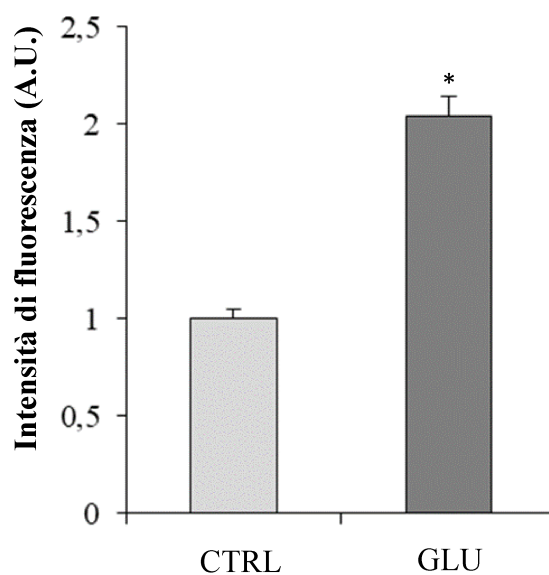
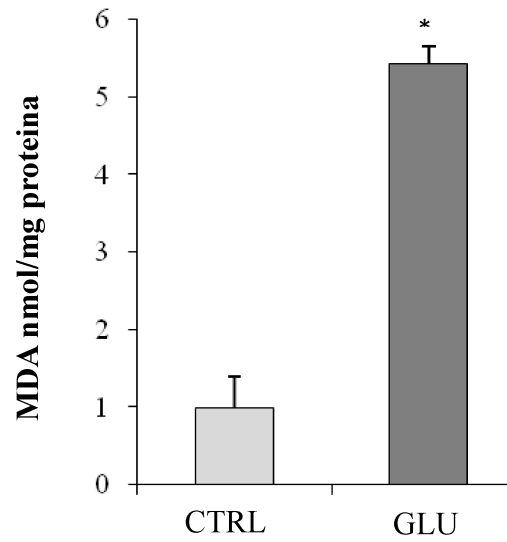


Figura 27: Livelli di ROS intracellulari valutati mediante la sonda DCF in cellule esposte a concentrazioni elevate di glucosio (50mM) per una settimana e in cellule controllo (glucosio 25mM). I valori sono espressi come intensità di fluorescenza (unità arbitraria).

** $p < 0.001$ vs controllo*



*Fig 28: Livelli di malondialdeide (MDA) in cellule esposte a concentrazioni elevate di glucosio (50mM) per una settimana e in cellule controllo (glucosio 25mM). I valori sono espressi come nmoli di MDA per mg di proteina. * $p < 0.002$ vs controllo*

4.2 Effetto del trattamento ad alte concentrazioni di glucosio sulla formazione di composti di glicazione (AGEs)

Come descritto nella parte introduttiva della tesi, l'iperglicemia è associata alla glicazione non enzimatica delle proteine e alla conseguente formazione di composti di glicazione avanzata (AGEs).

La formazione degli AGEs nelle cellule Caco-2 trattate nelle diverse condizioni sperimentali è stata valutata mediante lo studio della fluorescenza intrinseca dei composti di glicazione avanzata. Inoltre mediante analisi western Blot abbiamo valutato i livelli di AGEs derivanti dalla glicolaldeide (GA) (GA-modified proteins) (Figura 29).

Come mostrato nella Figura 30, l'incubazione con glucosio 50 mM per una settimana induce *un significativo aumento dei livelli di composti AGEs fluorescenti rispetto al controllo*. In particolare, nelle cellule incubate con elevate concentrazioni di glucosio si osservano livelli di glicazione circa tre volte più elevati ($3,00 \pm 0,17$) rispetto alla condizione di controllo ($p < 0.05$).

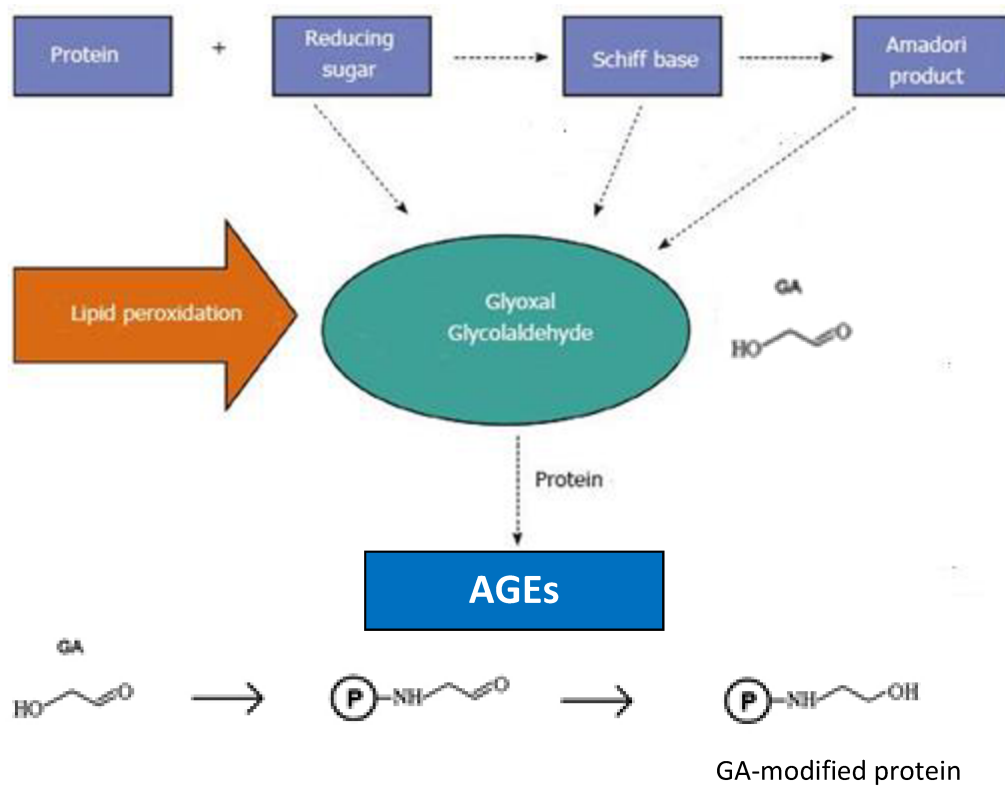
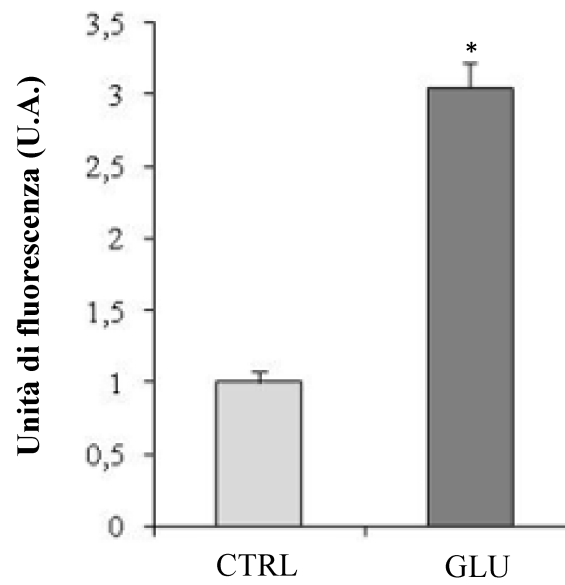


Fig.29: Glicazione non enzimatica delle proteine e formazione di AGEs. Il glucosio reagisce con le proteine con conseguente reazione di Maillard portando alla formazione di composti di glicazione primari (prodotti di Amadori) e successivamente a composti altamente reattivi come metilgliossale, gliossale e glicolaldeide (GA). Questi reagendo con le proteine portano alla formazione dei composti di glicazione avanzata (AGEs) tra cui le GA-modified proteins e AGEs fluorescenti.



*Fig. 30: Livelli di AGEs fluorescenti in cellule esposte a concentrazioni elevate di glucosio (50mM) per una settimana e in cellule controllo (glucosio 25mM). * $p < 0.05$ vs controllo*

Nella figura 31 sono mostrati i pattern proteici ottenuti mediante western blot utilizzando come anticorpi anti-GA modified protein. Dall'immagine si evidenzia *una maggiore presenza di GA-modified proteins nelle cellule esposte ad elevate concentrazioni di glucosio rispetto alle cellule di controllo*. Questi dati suggeriscono che, nelle nostre condizioni sperimentali, il trattamento con elevate concentrazioni di glucosio induce stress glico-ossidativo nelle cellule intestinali.

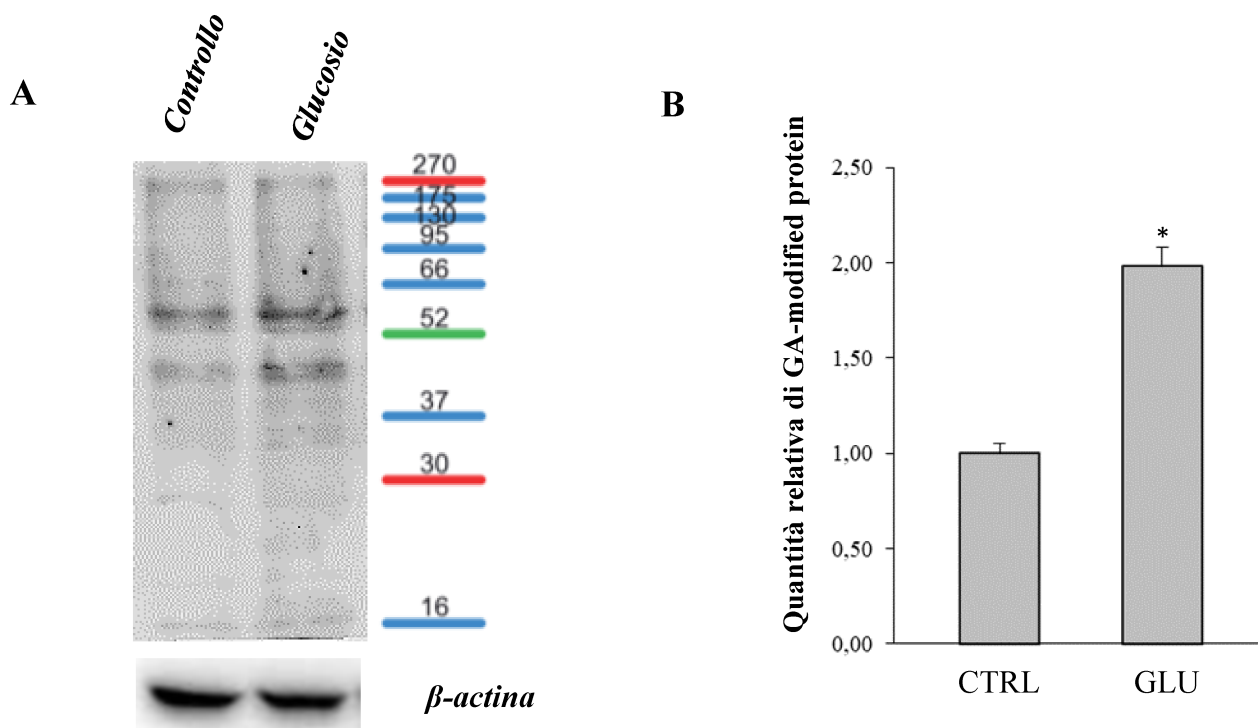
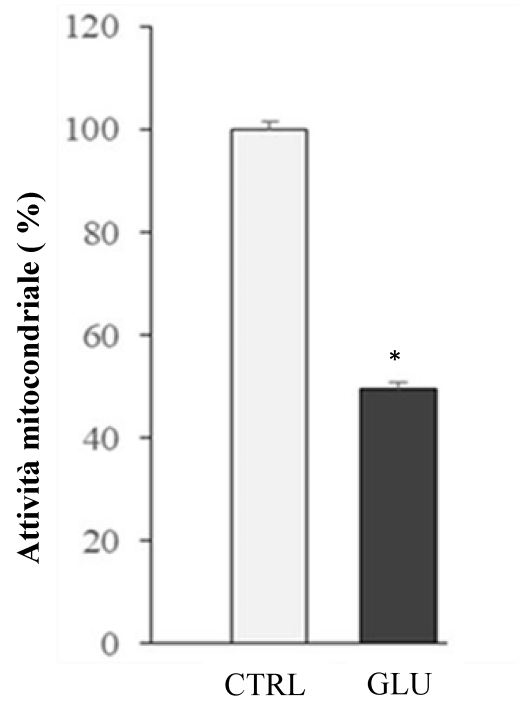


Fig. 31: Livelli di GA-modified proteins in cellule esposte a concentrazioni elevate di glucosio (50mM) per una settimana e in cellule controllo (glucosio 25mM). I patterns proteici sono stati ottenuti mediante western blot utilizzando anticorpi contro GA-modified proteins (A). In figura B è mostrata la quantificazione del pattern nelle diverse condizioni sperimentali.

4.3 Effetto del trattamento ad alte concentrazioni di glucosio su MTT

Il saggio MTT è stato effettuato per valutare la vitalità cellulare e l'attività mitocondriale nelle cellule incubate nelle diverse condizioni sperimentali. Infatti il saggio valuta l'attività della succinato-deidrogenasi mitocondriale, un enzima che in cellule vitali converte il reagente MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) in cristalli di formazano.

Come mostrato in Figura 32, l'esposizione cronica ad elevate concentrazioni di glucosio provocava una riduzione di circa il 50% della formazione del complesso MTT-formazano ($p < 0.001$). Questi dati suggeriscono che lo stress glicco-ossidativo *indotto dal trattamento con elevate concentrazioni di glucosio induce una riduzione dell'attività mitocondriale.*



*Figura 32: Formazione del complesso MTT-formazano in cellule esposte a concentrazioni elevate di glucosio (50mM) per una settimana e in cellule controllo (glucosio 25mM) . * $p < 0.001$ vs CTRL*

4.4 Effetto del trattamento ad alte concentrazioni di glucosio sui livelli e attività delle caspasi

Per confermare la rilevanza fisio-patologica dello stress-glico-ossidativo nelle cellule intestinali, abbiamo investigato se il trattamento con concentrazioni elevate di glucosio era associato all'attivazione della cascata delle caspasi.

A tale scopo mediante western blot è stata analizzata l'espressione delle caspasi 8 (coinvolta nella via apoptotica estrinseca) e 9 (coinvolta nella via apoptotica intrinseca) e della caspasi 3 (Figura 33).

La figura 34 invece *mostra come il trattamento con elevate concentrazioni di glucosio porti ad un aumento dell'espressione di ciascuna di queste caspasi.*

Dalla quantificazione delle bande normalizzate per l'espressione osservata nelle cellule controllo si osserva che la caspasi 9 in condizioni di alte concentrazione di glucosio ha un'espressione pari a $1,25 \pm 0,78$; un maggiore aumento si osserva per la caspasi 8 ($3,46 \pm 0,10$) e per la caspasi 3 ($7,05 \pm 0,64$) (Figura 34B).

Al fine di confermare questi dati abbiamo valutato l'attività delle caspasi 3 e 8. Come mostrato nella figura 35, sia l'attività delle caspasi 8 che delle caspasi 3 risultano essere significativamente maggiori nelle cellule trattate con elevate concentrazioni di glucosio rispetto al controllo ($p < 0.05$).

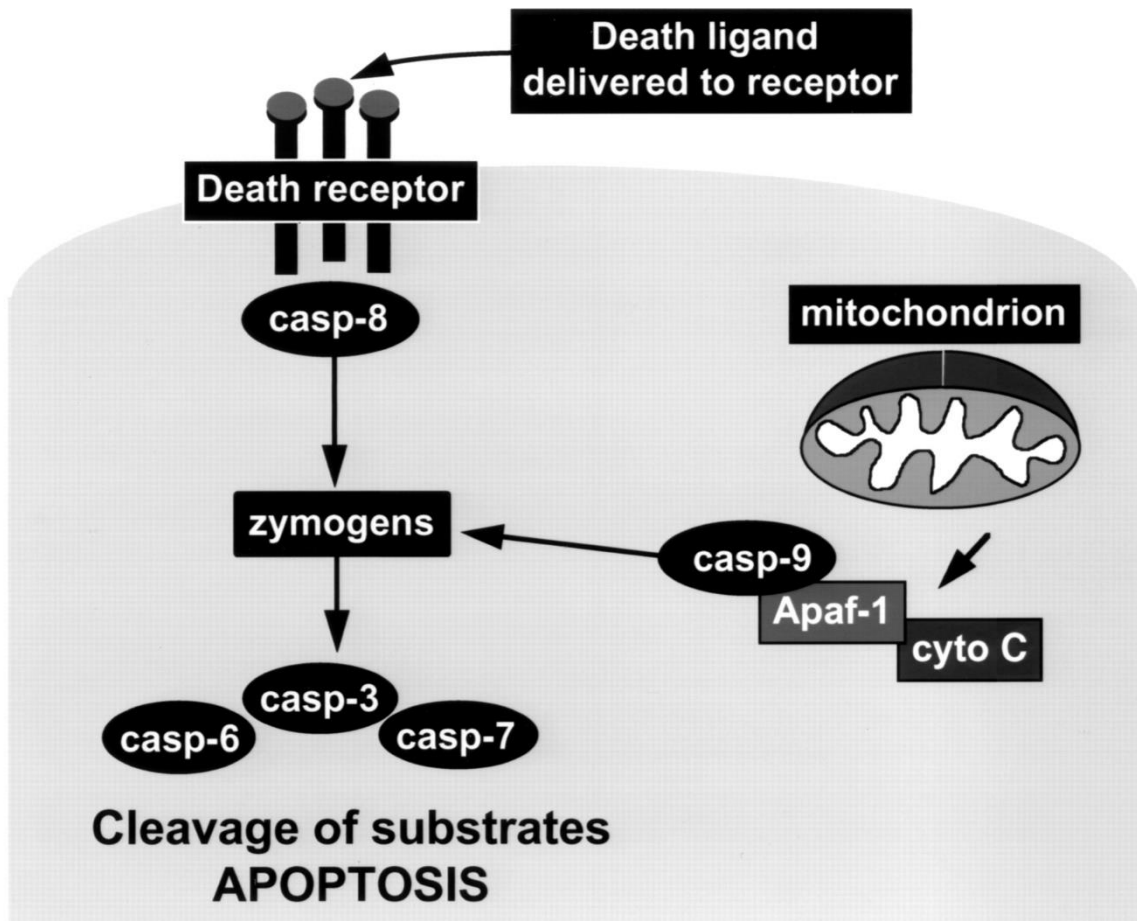
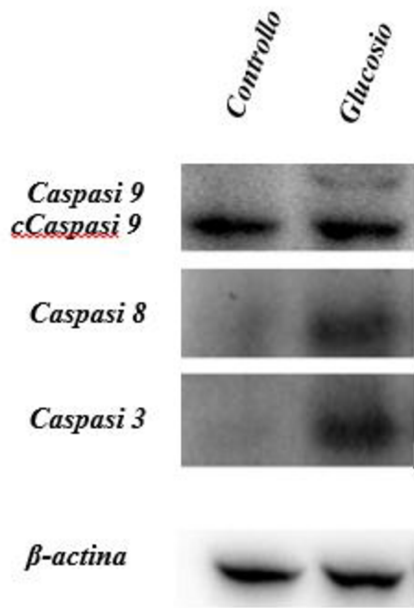


Figura 33: cascata di attivazione delle caspasi

A)



B)

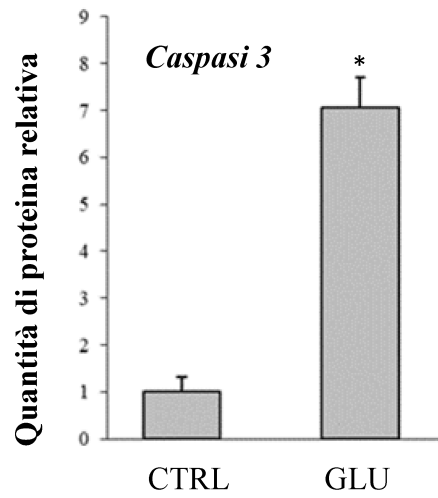
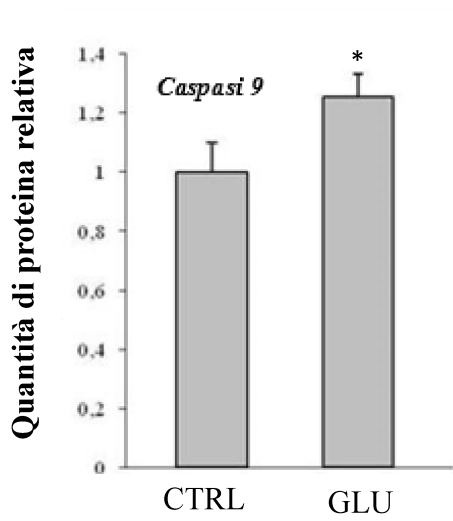
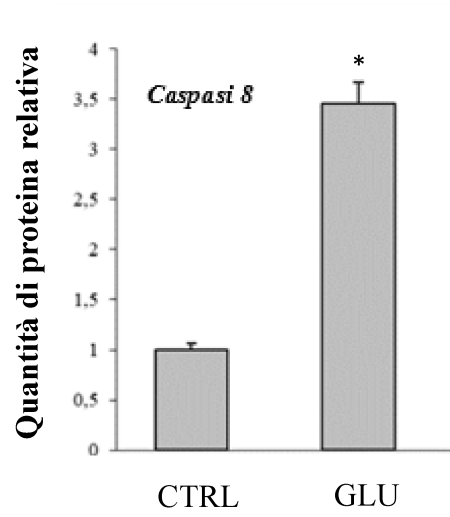


Fig. 34: Livelli di caspasi 9,8 e 3 in cellule esposte a concentrazioni elevate di glucosio (50mM) per una settimana e in cellule controllo (glucosio 25mM) (A). I dati sono ottenuti tramite densitometria delle bande del Western blot (B). * $p < 0.05$ vs CTRL

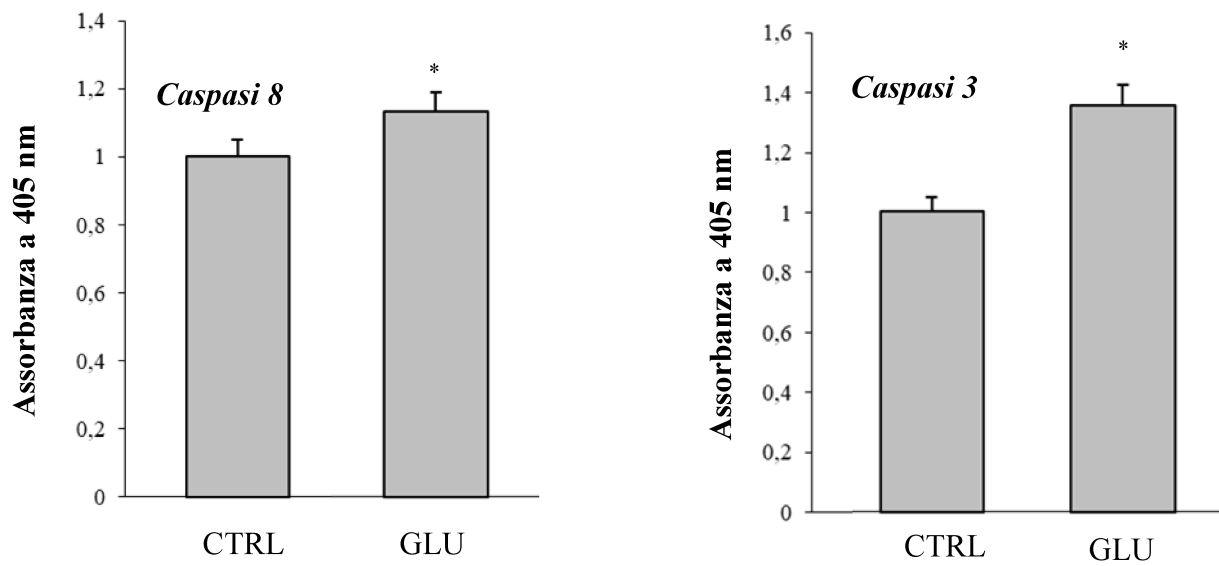


Fig. 35: Attività delle caspasi 8 e 3 in cellule esposte a concentrazioni elevate di glucosio (50mM) per una settimana e in cellule controllo (glucosio 25mM). * $p < 0.05$ vs controllo

4.5 Effetto del trattamento ad alte concentrazioni di glucosio sull'apoptosi

Al fine di investigare se l'attivazione delle caspasi indotta dallo stress glicossidativo nel nostro modello sperimentale induceva apoptosi cellulare abbiamo utilizzato il protocollo denominato FITC Annexin V Apoptosis Detection. Questo saggio effettuato in citofluorimetria permette anche di valutare le percentuali di cellule in apoptosi e in necrosi.

Come riportato nei citogrammi (figura 36A) *le cellule trattate con elevate concentrazioni di glucosio mostrano un'aumentata apoptosi sia in fase precoce che tardiva rispetto alle cellule non trattate.* Non si osservano differenze significative per quanto riguarda il numero di cellule in necrosi.

Questi dati sono confermati dalla quantificazione percentuale delle cellule apoptotiche e in necrosi nelle diverse condizioni sperimentali. Come mostrato nella figura 36B nelle cellule controllo il numero di cellule apoptotiche è pari a 4,60%, la percentuale di cellule apoptotiche sale 56,3% nelle cellule CaCo-2 trattate con elevate concentrazioni di glucosio.

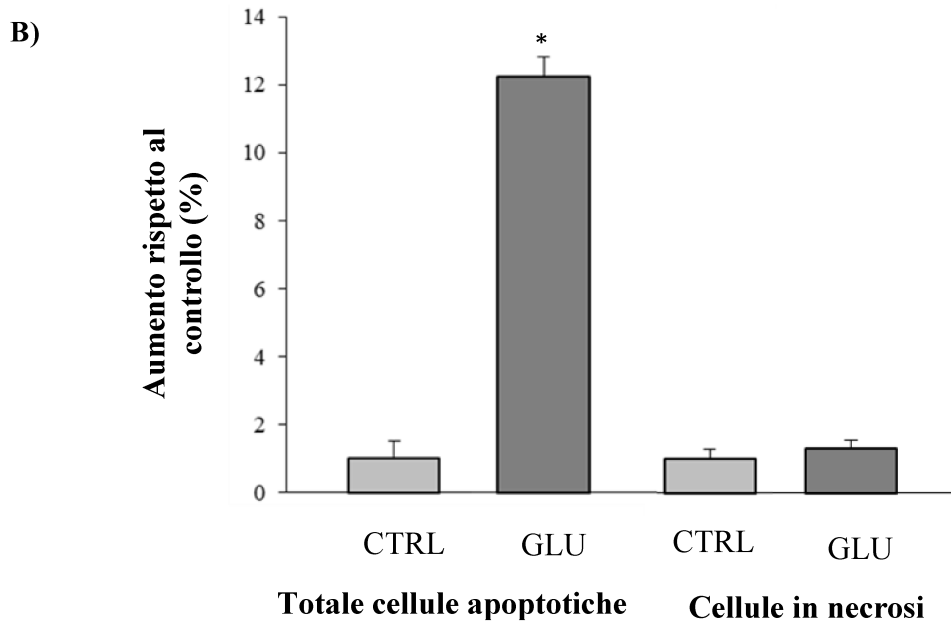
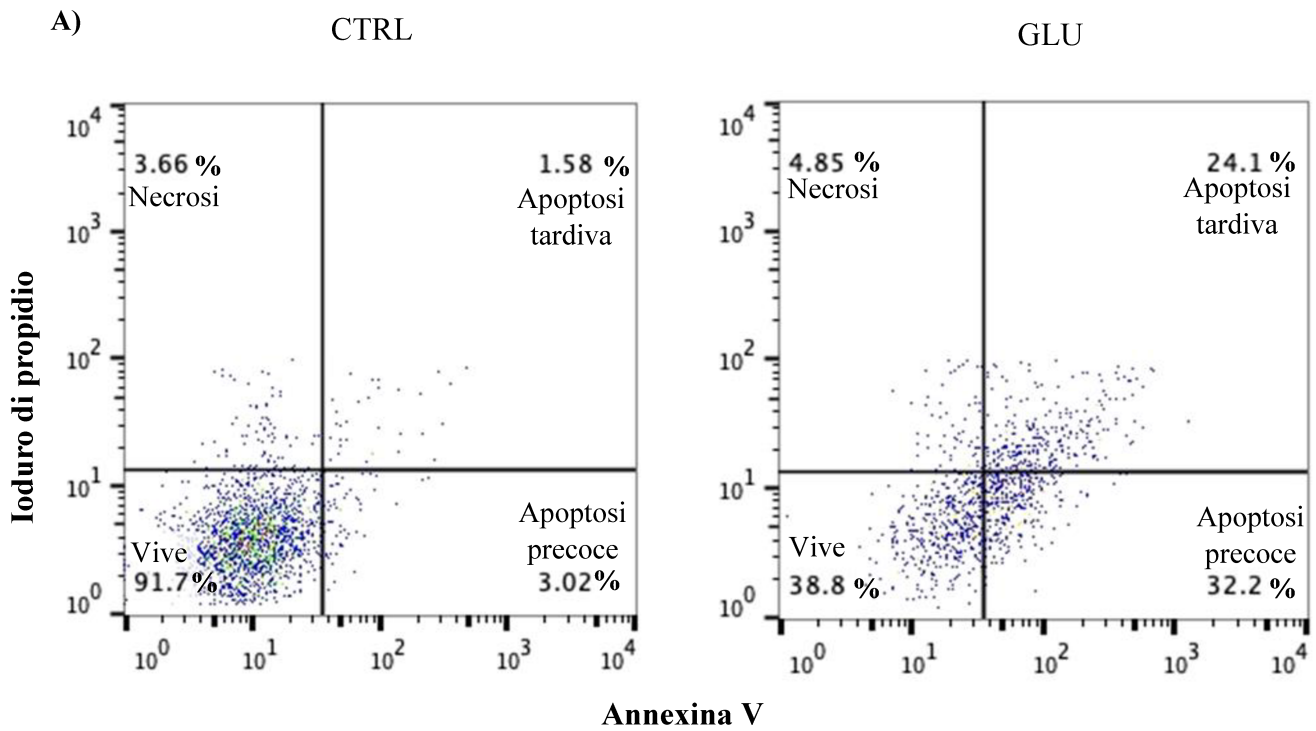


Fig. 36: Effetto del trattamento ad alte concentrazioni di glucosio sull'apoptosi (A); citogrammi relativi a 3 esperimenti (B) e quantificazione delle cellule in apoptosi e in necrosi in % $p < 0.001$ vs

CTRL

4.6 Effetto del trattamento ad alte concentrazioni di glucosio sull'espressione e attività di enzimi cellulari antiossidanti

Come descritto nella parte introduttiva della tesi le cellule intestinali dispongono un sistema di difesa antiossidante finalizzato a proteggere la cellula dallo stress ossidativo e a contrastare la formazione dei ROS e i potenziali effetti citotossici. Pertanto è risultato interessante indagare gli effetti del trattamento cronico ad elevate concentrazioni di glucosio sui principali enzimi antiossidanti cellulari: glutazione perossidasi (GPx), glutazione reduttasi (GR), glutazione S-transferasi (GST) e catalasi (CAT). Particolare attenzione abbiamo dedicato all'enzima paraoxonasi-2 (PON2) che come descritto nella parte introduttiva della tesi è localizzata a livello della membrana interna mitocondriale modulando la formazione di O_2^- mitocondriale.

Nella figura 37A, le cellule trattate in presenza di elevate concentrazioni di glucosio mostrano *una significativa riduzione dei livelli di PON2 intracellulare*. L'analisi densitometrica (figura 37B) mostra, infatti, una riduzione pari al 62%. Utilizzando come substrato il lattone sintetico Tiobutil- γ -butirrolattone (TBBL), i risultati sono in linea con i dati ottenuti dall'analisi Western Blot, in quanto si è *evidenziata una significativa riduzione dell'attività lattonasica di PON2 nelle cellule trattate con elevate concentrazioni di glucosio* ($p < 0.05$) (Figura 38).

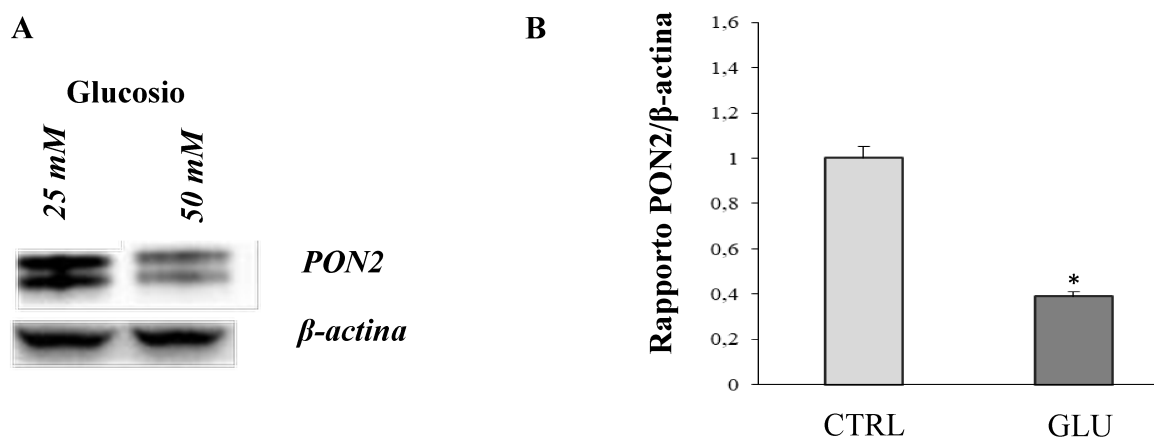


Fig. 37: Livelli di PON2 in cellule esposte a concentrazioni elevate di glucosio (50mM) per una settimana e in cellule controllo (glucosio 25mM). Nella figura si mostrano i dati ottenuti mediante wstern blot, nella figura B tramite analisi densitometrica delle banda. * $p < 0.05$ vs controllo

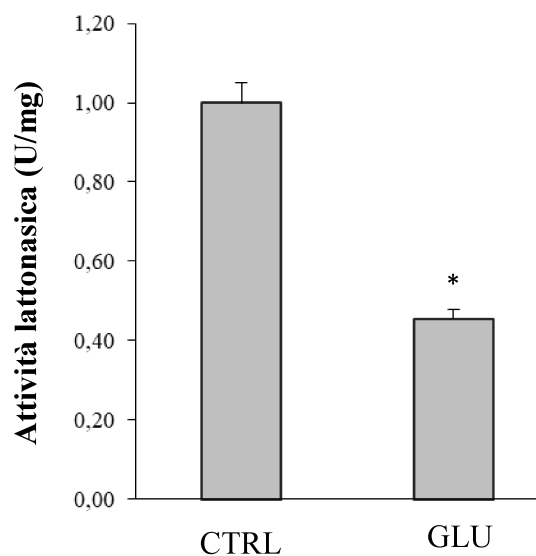


Fig. 38: Valutazione dell'attività lattonasica della PON2 in cellule esposte a concentrazioni elevate di glucosio (50mM) per una settimana e in cellule controllo (glucosio 25mM) * $p < 0.05$ vs controllo

Per quanto riguarda gli altri enzimi antiossidanti sono state valutate le attività enzimatiche nelle diverse condizioni sperimentali.

Come mostrato nella figura 39 *una significativa riduzione sia dell'attività dell'enzima GST che della GR si osservano nelle cellule esposte a concentrazioni elevate di glucosio, rispetto al controllo (GST $0,06 \pm 0,001$) (GR $0,08 \pm 0,02$) ($p < 0.05$). Al contrario non si osservano significative modifiche dell'attività Gpx valutata utilizzando perossido di idrogeno come substrato ($0,03 \pm 0,01$).*

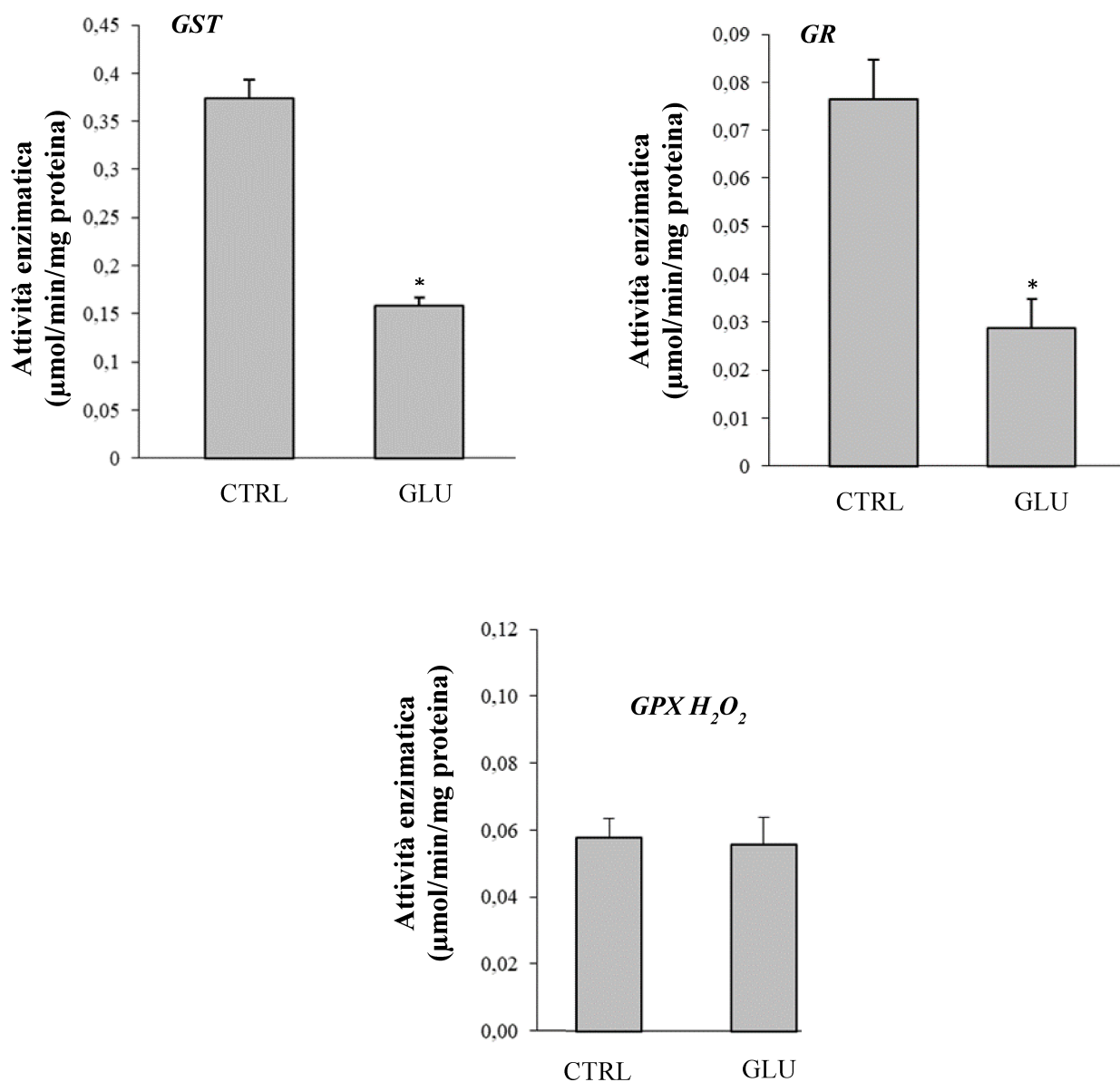


Figura 39: Attività degli enzimi antiossidanti glutatione S-transferasi (GST), glutatione reduttasi (GR) e glutatione perossidasi (GPX), riduttasi in cellule esposte a concentrazioni elevate di glucosio (50mM) per una settimana e in cellule controllo (glucosio 25mM). * $p < 0,05$ vs controllo

Un altro enzima antiossidante valutato nelle diverse condizioni sperimentali è stata anche l'attività della catalasi, il principale enzima che detossifica il perossido di idrogeno.

Come si può osservare nella figura 40 si ha *un significativo aumento dell'attività dell'enzima catalasi nelle cellule esposte a concentrazioni elevate di glucosio, rispetto al controllo* ($46.8 \pm 2,6$).

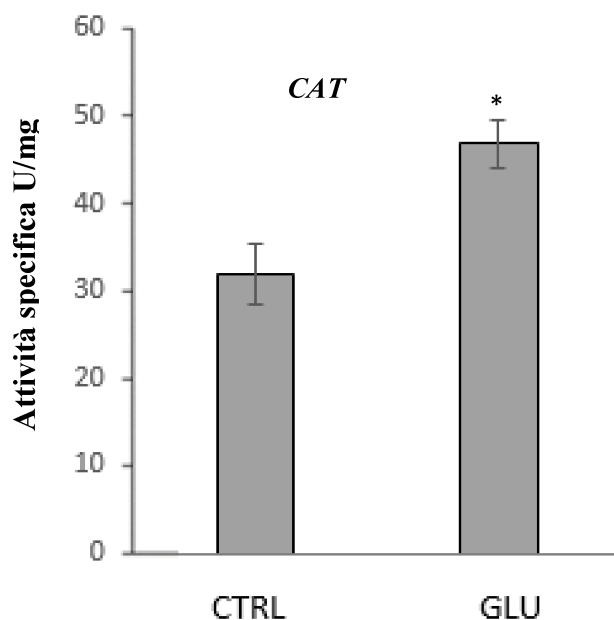


Figura 40: Attività dell'enzima antiossidante catalasi in cellule esposte a concentrazioni elevate di glucosio (50mM) per una settimana e in cellule controllo (glucosio 25mM). * $p < 0,05$ vs controllo

5 DISCUSSIONE

Scopo dello studio condotto in questa tesi è stato quello di investigare l'effetto dell'esposizione cronica di glucosio sullo stress ossidativo in cellule intestinali. A tale scopo abbiamo utilizzato come modello cellulare le CaCo-2 (carcinoma colorectal cells) che mostrano caratteristiche funzionali e morfologiche simili agli enterociti maturi (Sambuy et al, 2005).

I risultati hanno dimostrato un significativo aumento della formazione di ROS intracellulare e un aumento di markers biochimici di perossidazione lipidica nelle cellule trattate con alte concentrazioni di glucosio (50 mM). Inoltre, con lo stesso trattamento le cellule hanno mostrato un aumento significativo degli AGEs, come dimostrato dall'aumento degli AGEs fluorescenti e delle proteine modificate con glicolaldeide (GA-modified protein). Questi risultati dimostrano quindi che un'esposizione cronica ad elevate concentrazioni di glucosio induce uno stress glico-ossidativo nel nostro modello sperimentale.

Come descritto nella parte introduttiva della tesi esiste una stretta relazione tra elevati livelli di glucosio, stress ossidativo e formazione di composti di glicazione avanzata (AGEs). Numerosi studi, condotti utilizzando diversi modelli cellulari, hanno dimostrato che una condizione di iperglicemia causa un aumento dello stress ossidativo (Anabela P. et al. 2006). Diversi meccanismi molecolari sono stati proposti per spiegare l'incremento della

formazione di ROS in condizioni iperglicemiche. Un meccanismo proposto è l'autossidazione del glucosio. Infatti, ad alte concentrazioni il glucosio può iniziare reazioni di ossidazione anche in assenza di metalli di transizione e altri sistemi esogeni in grado di generare radicali liberi. Attraverso questo processo può iniziare una reazione ossidativa con riduzione dell'ossigeno e produzione di intermedi come anione superossido, perossido di idrogeno e alfa-chetoaldeidi (Edeas M. et al. 2009). Lo stress ossidativo in condizioni di iperglicemia può essere associato ad una diminuzione delle difese antiossidanti endogene. Al fine di verificare l'effetto del trattamento con elevate concentrazioni di glucosio sulle difese antiossidanti nelle cellule intestinali, abbiamo investigato l'attività degli enzimi antiossidanti in cellule trattate nelle diverse condizioni sperimentali. In particolare, abbiamo focalizzato l'attenzione sugli enzimi altamente espressi nelle cellule intestinali coinvolti sia nella detossificazione dei ROS, tra cui la glutatione perossidasi, la glutatione reduttasi, la glutatione S-transferasi e la catalasi, sia nella prevenzione della formazione di ROS come l'enzima paraoxonasi-2 (PON2).

I risultati mostrano una riduzione dell'attività dell'enzima glutatione reduttasi (GR) e della glutatione-S-transferasi (GST) a seguito del trattamento ad alte concentrazioni di glucosio rispetto al controllo. La glutatione reduttasi (GR) è un enzima che catalizza la riduzione del glutatione ossidato (GSSG) a

glutathione ridotto (GSH) pertanto consente alla cellula di mantenere livelli cellulari adeguati di GSH. Una riduzione dei livelli di GSH potrebbe avere ricadute negative nel mantenimento dello stato redox della cellula o nel mantenimento dell'attività di enzimi che richiedono GSH come cofattore, come ad esempio l'enzima glutathione-S-transferasi. I risultati hanno dimostrato una significativa riduzione dell'attività dell'enzima glutathione S-transferasi nelle cellule trattate con elevate concentrazioni di glucosio rispetto al controllo. Al contrario non si osservano significative modifiche dell'attività dell'enzima Gpx. L'enzima catalasi (CAT) mostra al contrario un significativo aumento nelle cellule incubate in presenza di elevate concentrazioni glucosio, probabilmente come meccanismo di compensazione dell'aumentata produzione di ROS in queste condizioni sperimentali (Patel et al. 2013).

Questi dati suggeriscono che l'esposizione cronica ad elevate concentrazioni di glucosio causa un'alterazione del sistema di difesa antiossidante che può contribuire all'aumento dello stress ossidativo, già osservato in queste condizioni.

Particolare attenzione abbiamo dedicato all'enzima paraoxonasi-2 (PON2) che come descritto nella parte introduttiva della tesi è localizzata a livello della membrana interna mitocondriale ed è ampiamente espressa nelle cellule intestinali. I risultati, ottenuti nella presente tesi, hanno evidenziato una

riduzione dell'attività e dei livelli di PON2 nelle cellule trattate con elevate concentrazioni di glucosio. Questi dati sono in accordo con altri studi su cellule Caco-2 ossidate in diverse condizioni sperimentali. Infatti è stata osservata una diminuzione di PON2 nelle cellule di Caco-2 ossidate da ferro-ascorbato (Precourt L.P. et al, 2012). Una riduzione dei livelli di PON2 in condizioni iperglicemiche è supportato da precedenti studi su macrofagi e monociti (Yehuda, I. et al., 2011).

L'effetto protettivo contro la formazione di ROS intracellulari e la perossidazione lipidica esercitata da PON2 è stato confermato in diversi modelli sperimentali e in cellule di Caco-2 in coltura (Precourt, L.P et al 2012; Shamir, R et al 2005). Il silenziamento della PON2 predispone alla perossidazione lipidica e allo sviluppo di una risposta infiammatoria esacerbata nelle cellule epiteliali intestinali (Precourt, L.P et al. 2012). Al contrario, l'aggiunta di PON2 purificata in cellule Caco-2 intestinali permeabilizzate riduce la perossidazione lipidica dopo induzione di stress ossidativo (Levy, E. et al 2007). A livello molecolare, gli effetti protettivi di PON2 sono, in parte, mediati dal ruolo di questo enzima nella funzione mitocondriale. In dettaglio, PON2 si trova associato al complesso respiratorio III e si lega direttamente al coenzima Q10, un componente essenziale delle catene di trasferimento di elettroni (ETC), in modo calcio-dipendente. Inoltre, essa previene la

formazione di superossido mitocondriale ($O_2 \cdot^-$) e ne riduce il rilascio sia dal complesso mitocondriale I che dal complesso III sulla membrana mitocondriale interna (Altenhofer, S. et al. 2010).

Il test MTT condotto sulle cellule trattate nelle diverse condizioni sperimentali ha dimostrato inoltre una riduzione di circa il 40% della formazione di MTT-formazano nelle cellule trattate con elevate concentrazioni di glucosio. La reazione è catalizzata dalla succinato deidrogenasi mitocondriale, quindi il dosaggio MTT dipende dalla respirazione mitocondriale e serve indirettamente per valutare l'attività mitocondriale. In un quadro generale, questo risultato insieme alla riduzione di PON2 suggeriscono un'alterata funzionalità mitocondriale nelle cellule intestinali sottoposte a stress glico-ossidativo.

Poiché dal mitocondrio partono anche molti stimoli pro-apoptotici abbiamo ritenuto interessante verificare se il trattamento cronico ad elevate concentrazioni di glucosio fosse associato all'attivazione di pathways pro-apoptotici. I risultati ottenuti utilizzando l'Annexina V, una proteina intracellulare che si lega alla fosfatidilserina in modo calcio dipendente, la quale quest'ultima in condizioni di buona salute cellulare è localizzata nella parte più interna della membrana cellulare, mentre durante l'apoptosi precoce, quando l'asimmetria della membrana viene persa, viene esposta esternamente, hanno dimostrato che la condizione di iperglicemia promuove l'apoptosi sia

precoce che tardiva ma non la necrosi che rimane invariata dal punto di vista quantitativo.

A conferma di questi risultati, i dati ottenuti hanno dimostrato un aumento dell'espressione e dell'attività della caspasi coinvolte nei processi di attivazione dell'apoptosi. In particolare, si è osservato un aumento della caspasi della caspasi 8 e 9 e della caspasi 3 (effettrice).

In conclusione, i dati ottenuti dimostrano che l'esposizione cronica ad elevate concentrazioni di glucosio inducono nelle cellule intestinali uno stress glicossidativo con alterazione delle difese antiossidanti e conseguente attivazione di pathways pro-apototici. Inoltre, studi precedenti, hanno dimostrato che l'esposizione cronica ad alti livelli di glucosio modula l'espressione di geni che codificano per proteine coinvolte nel metabolismo energetico e l'assorbimento di glucosio intestinale. In particolare, Botztepe et al. hanno dimostrato come le alte concentrazioni di glucosio nella linea cellulare Caco-2 abbiano portato ad una perdita dell'integrità della barriera intestinale a livello delle giunzioni strette; hanno inoltre notato come i livelli di espressione dell'mRNA di geni che codificano per i trasportatori del glucosio e del fruttosio (GLUT2, GLUT5 e SGLT1) siano diminuiti a causa dell'eccessiva esposizione a queste molecole.

Per quanto riguarda la rilevanza fisio-patologica dei risultati ottenuti, complicazioni gastro-intestinali sono state osservate in soggetti affetti da diabete mellito (Zawada, A.E. et al. 2018).

È noto inoltre che la mucosa intestinale è costantemente esposta a condizioni di iperglicemia, ROS e AGEs derivanti dalla dieta, i quali possono innescare lo stress glico-ossidativo, minare l'integrità della barriera causando infiammazione e generando di conseguenza condizioni croniche. Nell'insieme possono così porre le basi per lo sviluppo e la progressione di malattie croniche infiammatorie intestinali (IBD).

6 BIBLIOGRAFIA

- **Ahmed N:** Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.*; 67: 3-21. (2005).
- **Ahn, S. H., Shah, Y. M., Inoue, J., Morimura, K., Kim, I., Yim, S.,** Hepatocyte nuclear factor 4alpha in the intestinal epithelial cells protects against inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 908–920 (2008).
- **Albenberg LG & Wu GD** Diet and the intestinal microbiome: associations, functions, and implications for health and disease. *Gastroenterology* 146, 1564–72 (2014).
- **Altenhofer S, Witte I, Teiber JF, Wilgenbus P, Pautz A, Li H:** One enzyme, two functions. PON2 prevents mitochondrial superoxide formation and apoptosis independent from its lactonase activity. *J Biol Chem*; 285:24398–403. (2010).
- **Anabela P. Rolo and Carlos M. Palmeira** Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress *Toxicology and Applied Pharmacology* 212 167–178 (2006)
- **Anabela P. Rolo, Carlos M. Palmeira** Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 212(2): 167-78 (2006)
- **Andersen, J. K.** Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med.* 10 (Suppl.), S18–S25 (2004)
- **Andrea M. Vincent, Lisa L. Mclean, Carey Backus, and Eva L. Feldman** Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons *FJ Express Summaries* (2005)

- **Archer S.L.** Mitochondrial dynamics—mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N. Engl. J. Med.* 369, 2236–2251 (2013).
- **Aw TY** Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. *Toxicol Appl Pharmacol* 204:320–328 (2005)
- **Babbs, C. F.** Oxygen radicals in ulcerative colitis. *Free Radic. Biol. Med.* 13, 169–181 (1992).
- **Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT.** Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 52: 741–744, (1973).
- **Balmus IM, Ciobica, Trifan A, Stanciu C Saudi J.** The implications of oxidative stress and antioxidant therapies in Inflammatory Bowel Disease: Clinical aspects and animal models. *Gastroenterol.* 22(1):3-17 (2016);
- **Bao Q. and Shi Y.** Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death. Differ.* 14:56-65 (2007)
- **Beisner J., Stange E. F., and Wehkamp J.,** Innate antimicrobial immunity in inflammatory bowel diseases, *Expert Review of Clinical Immunology*, vol. 6, no. 5, pp. 809–818, (2010).
- **BeltranB, NosP, DasiF, IborraM, BastidaG, MartinezM, O'ConnorJE, Saez G, Moret I, Ponce J,** Mitochondrial dysfunction, persistent oxidative damage, and catalase inhibition in immune cells of naive and treated Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 16:76–86 (2010)
- **Bennett R.A., Rubin P.H. and Present D.H.** Frequency of inflammatory bowel disease in offspring of couples both presenting with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 100, 1638–1643(1991).

- **Bernstein, C. N., and Shanahan, F.** Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut* 57, 1185–1191 (2008).
- **Bernstein, C. N., Walker, J. R., and Graff, L. A.** On studying the connection between stress and IBD. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 782–785 (2006).
- **Bestwick CS, Milne L.** Alteration of culture regime modifies antioxidant defenses independent of intracellular reactive oxygen levels and resistance to severe oxidative stress within confluent Caco-2 "intestinal cells." *Dig Dis Sci.*; 417-423 (2001)
- **Bhattacharyya A., Chattopadhyay R., Mitra S., and Crow S.** Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases *Physiol Rev* 94: 329–354, (2014)
- **Bigagli E and Lodovici M.** Circulating Oxidative Stress Biomarkers in Clinical Studies on Type 2 Diabetes and Its Complications *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2019: 5953685
- **Binion DG, Rafiee P, Ramanujam KS, Fu S, Fisher PJ, Rivera MT, Johnson CP, Otterson MF, Telford GL, Wilson KT,** Deficient iNOS in inflammatory bowel disease intestinal microvascular endothelial cells results in increased leukocyte adhesion. *Free Radic Biol Med* 29:881–888 (2000)
- **Botztepe Tugce and Gulec Sukru** Investigation of the influence of high glucose on molecular and genetic responses: an *in vitro* study using a human intestine model *Genes and nutrition* 13:11 (2018)
- **Brennan FM, Maini RN, Feldmann M.,** Cytokine expression in chronic inflammatory disease. *Br Med Bull* 51:368–384 (1995)

- **Briske-Anderson MJ, Finley JW, Newman SM**, The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Exp Biol Med.*;214:248-257 (1997)
- **Brownlee M**. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*; 414: 813-20 (2001)
- **Busik J.V., Mohr S. and Grant M.B.** Hyperglycemia-Induced Reactive Oxygen Species Toxicity to Endothelial Cells Is Dependent on Paracrine Mediators *Diabetes* 57(7): 1952–1965. (2008)
- **Cai J, Jones DP**. Superoxide in apoptosis: mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 11 401-4
- **Canavan C., Abrams, K.R. and Mayberry J.**, Metanalysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn’s disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 23, 1097–1104 (2006)
- **Català A**. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptor and the chemiluminescence assay. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1482-1495 (2006)
- **Catala A**. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids* 157:1–11 (2009)
- **Chapman M.A., Grahn M.F., Boyle M.A., Hutton M., Rogers J. and Williams, N. S**. Butyrate oxidation is impaired in the colonic mucosa of sufferers of quiescent ulcerative colitis. *Gut* 35, 73–76 (1994)
- **Chilelli NC, Ragazzi E, Valentini R, Cosma C, Ferrareso S, Lapolla A, Sartore G**: Curcumin and *Boswellia serrata* Modulate the Glyco-Oxidative Status and Lipo-Oxidation in Master Athletes. *Nutrients*; 8(11):745. (2016)

- **Circu Tak M.L. and Aw Y.** Glutathione and modulation of cell apoptosis *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* Volume 1823, Issue 10, Pages 1767-1777 (2012)
- **Clemens MR, Ladner C, Ehninger G, Einsele H, Renn W, Buhler E, Waller HD, Gey KF.** Plasma vitamin E and beta-carotene concentrations during radio-chemotherapy preceding bone marrow transplantation. *Am J Clin Nutr* 51: 216–219, (1990)
- **Conner, E. M., Brand, S. J., Davis, J. M., Kang, D. Y., and Grisham, M. B.** Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease: toxins, mediators, and modulators of gene expression. *Inflamm. Bowel Dis.* 2, 133–147 (1996)
- **Coultas L. and Strasser A.** The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 13:115-123 (2003)
- **Danese S. and Fiocchi C.** Ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* 365, 1713–1725 (2011)
- **Devarajan A, Bourquard N, Hama S, Navab M, Grijalva VR, Morvardi S, Clarke CF, Vergnes L, Reue K, Teiber JF, Reddy ST.** Paraoxonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 14(3):341-51. (2011)
- **Dickman, K. G., Hempson, S. J., Anderson, J., Lippe, S., Zhao, L., Burakoff, R.,** Rotavirus alters paracellular permeability and energy metabolism in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G757–G766 (2000)
- **Draganov DI, La Du BN.** Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 369(1):78-88 (2004)

- **Dutta S, Rittinger K**, Regulation of NOXO1 activity through reversible interactions with p22 and NOXA1. *PLoS One* 5:e10478 (2010)
- **Ebert EC, Mehta V, Das KM** Activation antigens on colonic T cells in inflammatory bowel disease: effects of IL-10. *Clin Exp Immunol* 140:157–165 (2005)
- **Elson C.O., Sartor R.B., Tennyson G.S., and Riddell R.H.** Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109, 1344–1367. (1995).
- **Esworthy RS, Swiderek KM, Ho YS, Chu FF** Seleniumdependent glutathione peroxidase-GI is a major glutathione peroxidase activity in the mucosal epithelium of rodent intestine. *Biochim Biophys Acta* 1381:213–226 (1998)
- **Fan Ting-Jun, Han Li-Hui, Cong Ri-Shan, and Liang Jin** Caspase Family Proteases and Apoptosis *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11): 719–727 (2005)
- **Ferruzza S., Rossi C, Scarino ML Sambuy Y**, a protocol for differentiation of human intestinal Caco-2 cells in asymmetric serum-containing medium *Toxicology in Vitro*, 1252-1255 (2012)
- **Fiordaliso F, Bianchi R, Staszewsky L, Cuccovillo I, Doni M, Laragione T, Salio M, Savino C, Melucci S, Santangelo F, Scanziani E, Masson S, Ghezzi P, Latini R**: Antioxidant treatment attenuates hyperglycemia-induced cardiomyocyte death in rats. *J Mol Cell Cardiol*; 37(5):959-68. (2004).
- **Fiorentino T.V., Prioletta A., Pengou Zuo and Folli F.**, Hyperglycemia-induced Oxidative Stress and its Role in Diabetes Mellitus Related Cardiovascular Diseases *Current Pharmaceutical Design*, 19, 5695-5703 (2013)

- **Florian S, Krehl S, Loewinger M, Kipp A, Banning A, Esworthy S, Chu FF, Brigelius-Flohe R** Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis, and GPx1 expression in the intestine of mice. *Free Radic Biol Med* 49:1694–1702 (2010)
- **Forbes JM, Yee LT, Thallas V, Lassila M, Candido R, Jandeleit-Dahm KA, Thomas MC, Burns WC, Deemer EK, Thorpe SR, Cooper ME, Allen TJ.:** Advanced glycation endproduct interventions reduce diabetes-accelerated atherosclerosis. *Diabetes*; 53:1813-1823. (2004)
- **Galluzzi L., Kepp O. and Kroemer G.** Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 780–788 (2012)
- **Geiszt M, Lekstrom K, Brenner S, Hewitt SM, Dana R, Malech HL, Leto TL** NAD(P)H oxidase 1, a product of differentiated colon epithelial cells, can partially replace glycoprotein 91phox in the regulated production of superoxide by phagocytes. *J Immunol* 171:299–306 (2003)
- **Giordano G, Tait L, Furlong CE, Cole TB, Kavanagh TJ, Costa LG:** Gender differences in brain susceptibility to oxidative stress are mediated by levels of paraoxonase-2 expression. *Free Radic Biol Med.*; 58:98-108. (2013).
- **Greco C.A., Maurer-Spurej E., Scott M.D., Kalab M. Nakane N. and Ramírez Arcos, S. M.** PEGylation prevents bacteria-induced platelet activation and biofilm formation in platelet concentrates. *Vox Sang.* 100, 336–339 (2011).
- **Grisham,** Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 344, 859–861 (1994)

- **Grivennikov, S. I.** Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin. Immunopathol.* 35, 229–244 (2013).
- **Halestrap, A. P., and Dunlop, J. L.** Intramitochondrial regulation of fatty acid beta-oxidation occurs between flavoprotein and ubiquinone. A role for changes in the matrix volume. *Biochem. J.* 239, 559–565 (1986)
- **Halliwell B, Zaho K, Whiteman M:** The gastrointestinal tract: A major site of antioxidant action? *J Free Radical Res.*; 33(6):819-830. (2000).
- **Hanauer, S. B.** Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm. Bowel Dis.* 12 (Suppl. 1), S3–S9 (2006)
- **Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou JC and James D** Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene* 23:2850-2860 (2004)
- **Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Kruger M, Strand D, Forstermann U.** Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation* 115: 2055–2064, (2007)
- **Indriolo A., Greco S., Ravelli P. and Faggioli S.** What can we learn about biofilm/host interactions from the study of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Periodontol.* 38 (Suppl. 11), 36–43 (2011)
- **Izawa S, Inoue Y, Kimura A.** Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* Nov 15; 320 (Pt 1):61-7 (1996).

- **Jian Zhang & Jing He** CTRP3 inhibits high glucose-induced oxidative stress and apoptosis in retinal pigment epithelial cells ISSN: 2169-1401 (Print) 2169-141X Journal homepage (2019)
- **Kameyama, J., Narui, H., Inui, M., and Sato, T.** Energy level in large intestinal mucosa in patients with ulcerative colitis. *Tohoku J. Exp. Med.* 143, 253–254 (1984).
- **Khersonsky O, Tawfik DS:** Chromogenic and fluorogenic assays for the lactonase activity of serum paraoxonase. *Chembiochem.*; 7(1):49-53. (2006).
- **Kiyotsugu Y., Yoshio M.,** The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage *Cancer Science* Volume 101, Issue 4 (2011)
- **Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB, Verspaget HW** Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semiquantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol* 201:28–36 (2003)
- **Kruidenier L, Kuiper I, van DW, Marklund SL, van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW.** Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 201: 7–16, (2003).

- **Kruidenier, L., and Verspaget, H. W.** Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—radicals or ridiculous? *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16, 1997–2015 (2002)
- **Kuhn H, Borchert A** Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic Biol Med* 33:154–172 (2002)
- **Levy E, Trudel K, Bendayan M, Seidman E, Delvin E, Elchebly M, Lavoie JC, Precourt LP, Amre D, Sinnett D.** Biological role, protein expression, subcellular localization, and oxidative stress response of paraoxonase 2 in the intestine of humans and rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G1252–G1261 (2007)
- **Li XC, Wang C, Mulchandani A, Ge X.** Engineering Soluble Human Paraoxonase 2 for Quorum Quenching. *ACS Chem Biol.* Nov 18;11 (11):3122-3131 (2016)
- **Linden A1, Gülden M, Martin HJ, Maser E, Seibert H.** Peroxide-induced cell death and lipid peroxidation in C6 glioma cells *Toxicol In Vitro.* (5):1371-6. (2008).
- **Liu Y, Mackness B, Mackness M.** Comparison of the ability of paraoxonases 1 and 3 to attenuate the in vitro oxidation of low-density

- lipoprotein and reduce macrophage oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 45: 743–748 (2008)
- **Loftus E.V. Jr. and Sandborn W.J.**, Epidemiology of inflammatory bowel disease, *Gastroenterology Clinics of North America*, vol. 31, no. 1, pp. 1–20 (2002).
 - **Loftus, E. V. Jr.** Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126, 1504–1517 (2004)
 - **López F., Hernández M., Rodríguez V., Díaz-Flores, Baiza-Gutman.** High glucose and insulin enhance uPA expression, ROS formation and invasiveness in breast cancer-derived cells. *Cell Oncol (Dordr)*. 39(4):365-78. Epub 2016
 - **M. Edeas, S. Mailfert and R. Joubet** Maillard Reaction, mitochondria and oxidative stress: Potential role of antioxidants *Pathologie Biologie* Volume 58, Issue 3, Pages 220-225 (2010)
 - **M. Vincent A., Mclean Lisa L., Backus C., and Feldman EL.** Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons *FJ Express Summaries* (2005)

- **M.J. Gunter, M.F. Leitzmann,** Obesity and colorectal cancer: epidemiology, mechanisms and candidate genes, *J. Nutr. Biochem* (2006)
- **Mackallan Neely A.** The interaction of homoserine lactones and paraoxonase 2 modulates cell death signaling and cell proliferation. *5-* (2017)
- **Maor I, Rainis T, Lanir A, Lavy A** Oxidative stress inflammation and neutrophil superoxide release in patients with Crohn's disease: distinction between active and non-active disease. *Dig Dis Sci* 53: 2208–2214 (2008)
- **Matheson PJ, Wilson MA, Garrison RN** Regulation of intestinal blood flow. *J Surg Res* 93:182–196 (2000)
- **McCord JM.** The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *AmJ Med.*;108:652–659 (2000)
- **Miller DM, Buettner GR, Aust SD** Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic Biol Med* 8:95–10 (1990)
- **Miruna Balmus I., Ciobica A., Trifan A. and Carol Stanciu,** The Implications of Oxidative Stress and Antioxidant Therapies in Inflammatory Bowel Disease: Clinical Aspects and Animal Models *Saudi J Gastroenterol.* 22(1): 3–17 (2016)

- **Mohammad Shokrzadeh, Hakimeh Abdi, Azin Asadollah-Pour and Fatemeh Shaki**, Nanoceria Attenuated High Glucose-Induced Oxidative Damage in HepG2 Cells *Cell J.* 2016 Spring; 18(1): 97–102 (2016)
- **Molodecky, N.A., and Kaplan G.G.** Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Hepatol. (N.Y.)* 6, 339–346 (2010).
- **Nazli A., Yang P.C., Jury J., Howe K., Watson J.L., Söderholm J.D.,** Epithelia under metabolic stress perceive commensal bacteria as a threat. *Am. J. Pathol.* 164, 947–957 (2004).
- **Novak E.A. and Mollen K.P.** Mitochondrial dysfunction in inflammatory bowel disease. *Front. Cell Dev. Biol.*, (2015)
- **Pallepati D., Averill-Bates,** Mild thermostolerance induced at 40 °C increases antioxidants and protects HeLa cells against mitochondrial apoptosis induced by hydrogen peroxide: Role of p53, *Archives of Biochemistry and Biophysics* Volume 495, Issue 2, Pages 97-111 (2010)
- **Parks, D. A.** Oxygen radicals: mediators of gastrointestinal pathophysiology. *Gut* 30, 293–298 (1989)
- **Patel H., Chen Juan, Das K.C. and Kavdia M.** Hyperglycemia induces differential change in oxidative stress at gene expression and functional

- levels in HUVEC and HMVEC Cardiovascular Diabetology 12, Article number: 142 (2013)
- **Patergnani, S., Suski, J. M., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E.** Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Commun. Signal.* 9:19 (2011).
 - **Persson, P. G., Karlén, P., Bernell, O., Leijonmarck, C. E., Broström, O., Ahlbom, A.,** Crohn's disease and cancer: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 107, 1675–1679 (1994)
 - **Piechota-Polanczyk A. & Fichna J.** Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Jul; Epub May 6 (2014)
 - **Poli G., Schaur RJ, SiemsWG, Leonarduzzi G.** 4-Hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev* 28:569–631(2008)
 - **Précourt L.P., Marcil V., Ntimbane T., Taha R., Lavoie J.C., Delvin E., Seidman E.G., Beaulieu J.F, and Levy E.,** Antioxidative properties of paraoxonase 2 in intestinal epithelial cells *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Sep 1; 303(5): G623–G634 (2012)

- **Precourt LP, Seidman E, Delvin E, Amre D, Deslandres C, Dominguez M, Sinnett D, Levy E.** Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family members. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1628–1637, (2009)
- **Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN.** The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 33: 498–507, (1996)
- **Racine A et al.** Dietary Patterns and Risk of Inflammatory Bowel Disease in Europe: Results from the EPIC Study. *Inflamm Bowel Dis* 22, 345–54 (2016)
- **Rahman K.** Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventionsentions in Aging*:2(2): 219–236 (2007)
- **Rajas F, Bruni N, Montano S, Zitoun C, Mithieux G,** The glucose-6-phosphatase gene is expressed in human and rat intestine regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 117(1);132-9 (1999)
- **Reed JC** Dysregulation of apoptosis in cancer. *J. Clin. Oncol.* 17:2941-2953 (1999)

- **Rezaie A, Parker RD, Abdollahi M:** Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Dig Dis Sci.*; 52:2015–2021. (2007).
- **Rharass T. and Lucas S.** High Glucose Level Impairs Human Mature Bone Marrow Adipocyte Function Through Increased ROS Production *Front. Endocrinol.*, (2019)
- **Rigoli, L., and Caruso, R. A.** Inflammatory bowel disease in pediatric and adolescent patients: a biomolecular and histopathological review. *World J. Gastroenterol.* 20, 10262–10278 (2014)
- **Rizzello F., Spisni E., Giovanardi E., Imbesi V., Salice M., Alvisi P., Valeri M.C. and Gionchetti P.** Implications of the westernized diet in the onset and progression of IBD, *Nutrients.* 11(5) (2019)
- **Robertson P., Harmon J., Tran P.O.T and Poitout V.,** β -Cell Glucose Toxicity, Lipotoxicity, and Chronic Oxidative Stress in Type 2 Diabetes *R. Diabetes* (2004)
- **Rossin D. et al.** HNE and cholesterol oxidation products in colorectal inflammation and carcinogenesis *Free Radical Biology and Medicine* (2017)
- **Rothem L, Hartman C, Dahan A, Lachter J, Eliakim R, Shamir R.** Paraoxonases are associated with intestinal inflammatory diseases and

- intracellularly localized to the endoplasmic reticulum. *Free Radic Biol Med.* 43(5):730-9. (2007);
- **Salim, S. Y., and Söderholm, J. D.** (2011). Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 362–381.
 - **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.* 21(1):1-26 (2005)
 - **Sanchez R, Levy E, Seidman E, Amre D, Costea F, Sinnett D.** Paraoxonase 1, 2 and 3 DNA variants and susceptibility to childhood inflammatory bowel disease. *Gut* 55: 1820–1821, (2006)
 - **Sanders LM, Henderson CE, Hong MY, Barhoumi R, Burghardt RC, Carroll RJ, Turner ND, Chapkin RS, Lupton JR** Pro-oxidant environment of the colon compared to the small intestine may contribute to greater cancer susceptibility. *Cancer Lett* 208:155–161 (2004)
 - **Santhanam, S., Venkatraman, A., and Ramakrishna, B. S.** Impairment of mitochondrial acetoacetyl CoA thiolase activity in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* 56, 1543–1549. (2007).

- **Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J** Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 42:477–484 (1998)
- **Schweikert EM, Amort J, Wilgenbus P, Forstermann U, Teiber JF and Horke S** Paraoxonases-2 and -3 Are Important Defense Enzymes against *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors due to Their Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Properties. *J. Lipids* 2012:352857 (2012)
- **Seiler A, Schneider M, Forster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, Plesnila N, Kremmer E, Radmark O, Wurst W, Bornkamm GW, Schweizer U, Conrad M** Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF mediated cell death. *Cell Metab* 8:237–248 (2008)
- **Seril DN, Liao J, Yang GY, Yang CS** Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis* 24:353–362 (2003)
- **Shamir R, Hartman C, Karry R, Pavlotzky E, Eliakim R, Lachter J, Suissa A, Aviram M** Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radic Biol Med.* 39(3):336-44. (2005)

- **Shamir, R.; Hartman, C.; Karry, R.; Pavlotzky, E.; Eliakim, R.; Lachter, J.; Suissa, A.; Aviram, M.** Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radic Biol Med* (2005)
- **Shi Y** Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* 117:855-858 (2004)
- **Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, Cheroutre H, Faull KF, Berliner JA, Witztum JL, Lusis AJ.** Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem* 275: 17527–17535 (2000)
- **Shokrzadeh, Hakimeh Abdi, Azin Asadollah-Pour and Fatemeh Shaki,** Nanoceria Attenuated High Glucose-Induced Oxidative Damage in HepG2 Cells *Cell J.* 2016 Spring; 18(1): 97–102 2016
- **Simm A, Müller B, Nass N, Hofmann B, Bushnaq H, Silber RE, Bartling B:** Protein glycation - Between tissue aging and protection. *Exp Gerontol.*; 68:71-5. (2015).

- **Simon H.U., A. Haj-Yehia and Levi-Schaffer F.** Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction *Apoptosis*; 5: 415–418 (2000)
- **Singer II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE, Stenson WF** Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 111:871–885 (1996)
- **Srinivasula SM, Datta P, Fan XJ, Fernandes-Alnemri T, Huang Z and Alnemri ES** Molecular determinants of the caspase promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J. Biol. Chem.* 275:36152-36157 (2000)
- **Stenman LK, Holma R, Eggert A & Korpela R** A novel mechanism for gut barrier dysfunction by dietary fat: epithelial disruption by hydrophobic bile acids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304, G227–34 (2013).
- **Stinghen Andréa E.M. Massy Z.A., Vlassara H., Striker G.E. and Boullier A.** *J Am Soc Nephrol.* Uremic Toxicity of Advanced Glycation End Products in CKD 354–370. (2016)
- **Stitt AW:** The maillard reaction in eye diseases. *Ann N Y Acad Sci.*; 1043:582597. (2005)

- **Tabatabaie T, Potts JD, Floyd RA** Reactive oxygen species mediated inactivation of pyruvate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 336:290–296 (1996)
- **Tait, S. W., and Green, D. R.** Mitochondria and cell signalling. *J. Cell Sci.* 125, 807–815 (2012)
- **Talley AK, Dewhurst S, Perry SW, et al.** Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in human neuronal cells: Protection by the antioxidant N-acetylcysteine and the genes Bcl-2 and crmA. *Mol Cell Biol*; 15: 2359–2366 (1995)
- **Thaiss M et al** Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection *Science* (2019)
- **Thornalley PJ, McLellan AC, Lo TW, Benn J, Sönksen PH:** Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications. *Clin Sci Lond*; 91(5):575-82 (1996).
- **Thornton JR, Emmett PM, Heaton KW.** Diet and Crohn's disease: characteristics of the pre-illness diet. *Br Med J*; 762-4 (1979)
- **Ting-Jun Fan, Li-Hui Han, Ri-Shan Cong, and Jin Liang,** Caspase Family Proteases and Apoptosis, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11): 719–727 (2005)

- **Trumpower BL.** The protonmotive Q cycle: energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex. *J Biol Chem*; 265: 11409-12 (1990)
- **Tsikakos** Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem*; 524:13-30 (2017)
- **Tsikakos Dimitrios** Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges, *Science Direct Analytical Biochemistry journal. Biochemistry* 524 (2017)
- **Tsunada S, Iwakiri R, Ootani H, Aw TY, Fujimoto K** Redox imbalance in the colonic mucosa of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 38:1002–1003 (2003)
- **Ullman TA, Itzkowitz SH.** Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* 140: 1807–1816, (2011)
- **Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M., Mazur M.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*; 160:1–40 (2006)
- **Vaux DL and Korsmeyer SJ** Cell death in development. *Cell* 96:245-254 (1999)

- **Vlassara H, Bucala R, Striker L:** Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging; *J Tech Meth and Path*; 70:138-151. (1994).
- **Vlassara H, Striker GE:** Advanced glycation end products in diabetes and diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin North Am.*; 42(4):697-719. (2013)
- **Wajant H.,** The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296:1635-1636 (2002)
- **Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM and Lenardo MJ** Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:13884-13888 (2001)
- **Wang, X., Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y. L., Selkoe, D., et al.** PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell* 147, 893–906 (2011).
- **Wendland BE, Aghdassi E, Tam C, Carrrier J, Steinhart AH, Wolman SL, Baron D, Allard JP** Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 74:259–264 (2001)

- **Winczura A, Zdzalik D, Tudek B** Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. *FreeRadic Res* 46:442–459 (2012)
- **Yasukawa K, Tokuda H, Tun X, Utsumi H, Yamada K** The detrimental effect of nitric oxide on tissue is associated with inflammatory events in the vascular endothelium and neutrophils in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *Free Radic Res* 46: 1427–1436 (2012)
- **Yehuda, I.; Madar, Z.; Szuchman-Sapir, A.; Tamir, S. Glabridin, A** phytoestrogen from licorice root, up-regulates manganese superoxide dismutase, catalase and paraoxonase 2 under glucose stress. *Phytotherapy research : PTR*, 25, 659-667 (2011)
- **Yokoyama Y, Dickens E, Cash TG, Freeman BA, Parks DA** Xanthine oxidase activity in the circulation of rats following haemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med* 15:407–414 (1993)
- **Young I.S. and Woodside J.V.** Antioxidants in health and disease. *J.Clin. Pathol.* 54, 176–186 (2001).
- **Zamzami N, Marchetti P, Castedo M et al.** Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive

- oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med*; 182: 367–377 (1995)
- **Zawada, A.E.; Moszak, M.; Skrzypczak, D.; Grzymislowski, M.** Gastrointestinal complications in patients with diabetes mellitus. *Adv Clin Exp Med*, 27, 567-572 (2018)
 - **Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., et al.** Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 56, 61–72. (2007)