

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE



**Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata
Curriculum Scienze della Nutrizione**

**POSIDONIA OCEANICA: (L.) DELILE: RUOLO PROTETTIVO
CONTRO IL DANNO GLICO-OSSIDATIVO IN CELLULE
INTESTINALI**

**POSIDONIA OCEANICA (L.) DELILE: PROTECTIVE EFFECT
AGAINST GLYO-OXIDATIVE STRESS IN INTESTINAL CELLS**

Tesi di Laurea Magistrale di:
Ilaria Guidoni

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ilaria Guidoni'.

Relatore:
Chiar.ma Prof.ssa Tiziana Bacchetti

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Tiziana Bacchetti'.

**Sessione di ottobre 2021
A.A. 2020/2021**

INDICE

SCOPO DELLA TESI	4
Capitolo 1	7
LA POSIDONIA OCEANICA: UN COMPLESSO ECOSISTEMA.....	7
1.1 <i>Le praterie di Posidonia oceanica: origine e distribuzione</i>	7
1.2 <i>Caratteristiche botaniche e morfologiche</i>	12
1.3 <i>Riproduzione e ciclo vitale</i>	16
1.4 <i>Composizione chimica.....</i>	17
1.5 <i>Utilizzi ed applicazioni della Posidonia oceanica</i>	22
Capitolo 2	33
GLICO-OSSIDAZIONE: RUOLO FISIO-PATOLOGICO E DIFESE NELL'APPARATO INTESTINALE	33
2.1 <i>Lo stress ossidativo e la sua rilevanza fisiopatologica.....</i>	33
2.2 <i>Glicazione e glico-ossidazione non enzimatica.....</i>	44
2.3 <i>Ruolo fisiopatologico dello stress glico-ossidativo a livello intestinale</i>	48
2.4 <i>Meccanismi di difesa e antiossidanti.....</i>	66
2.5 <i>Fattori che contrastano e prevengono la glico-ossidazione: il ruolo dei polifenoli.....</i>	73
Capitolo 3	87
MATERIALI E METODI.....	87
3.1 <i>Preparazione dell'estratto idroalcolico di Posidonia oceanica</i>	87
3.2 <i>Caratterizzazione della composizione polifenolica dell'estratto idroalcolico di Posidonia oceanica.....</i>	88
3.3 <i>Studio degli effetti dell'estratto di Posidonia oceanica su cellule intestinali CaCo-2</i>	89
Capitolo 4	108
RISULTATI.....	108
4.1 <i>Effetto dell'estratto di Posidonia oceanica (POE) sulla vitalità cellulare in cellule intestinali Caco-2.....</i>	108

<i>4.2 Effetto dell'estratto di Posidonia oceanica (POE) sullo stress ossidativo in cellule intestinali Caco-2.....</i>	<i>111</i>
<i>4.3 Effetto dell'estratto di Posidonia oceanica (POE) sulla formazione di AGEs e sull'espressione di proteine coinvolte nel pathway apoptotico....</i>	<i>114</i>
Capitolo 5	120
CONCLUSIONI.....	120
BIBLIOGRAFIA.....	129
RINGRAZIAMENTI	158

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della presente tesi di laurea è stato quello di indagare i ruoli protettivi dell'estratto di *Posidonia oceanica* (POE) nei confronti del danno glicossidativo indotto in cellule intestinali dalla condizione di iperglicemia cronica (HG). 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 glicossidazione. Questo causa delle alterazioni alle principali macromolecole e contribuisce con meccanismi diversi alla disfunzione cellulare e subcellulare.

La *Posidonia oceanica* (L.) Delile (PO) è una pianta marina del tipo fanerogama. È una specie endemica del mar Mediterraneo, di notevole importanza per la biodiversità dell'ambiente marino.

Molti studi hanno già dimostrato i ruoli protettivi delle foglie di PO nei confronti dell'ecosistema marino, quali la difesa da stress abiotici e biotici come la salinità, metalli pesanti, siccità, temperature, luce, malattie e agenti patogeni. Tali effetti sono dovuti principalmente ai composti fenolici, particolarmente abbondanti nelle foglie, che sono oggetto di crescente interesse scientifico in quanto esercitano notevoli benefici sulla salute umana.

Ci sono ancora pochi studi riguardanti l'effetto benefico di questa pianta nell'uomo, sono state già dimostrate le attività antiossidanti e antinfiammatorie, la capacità di anti-glicazione in vitro, la riduzione della perossidazione lipidica e il ruolo anti-glicemico nei ratti diabetici.

Tuttavia, il possibile ruolo protettivo svolto dalla PO in cellule intestinali e il suo ruolo nei confronti del danno glico-ossidativo a livello intestinale non è stato precedentemente investigato. È noto che le cellule intestinali sono altamente vulnerabili al danno glico-ossidativo dovuto all'esposizione agli agenti ossidanti e ai prodotti della perossidazione lipidica presenti negli alimenti ingeriti, ad esempio cibi ad alto indice glicemico. Alti livelli di ROS contribuiscono alla disfunzione e al danno cellulare e tissutale, inoltre i ROS possono comportarsi come molecole di segnalazione che inducono la morte cellulare programmata. La generazione di ROS e le alterazioni dei meccanismi di difesa antiossidante possono quindi essere responsabili dell'insorgenza di malattie gastrointestinali come la malattia infiammatoria intestinale (IBD).

Pertanto, nella presente tesi dopo un'attenta analisi della letteratura riguardante la composizione e i ruoli funzionali di PO, nella parte sperimentale della tesi è stato approfondito il possibile effetto protettivo dell'estratto di PO nei confronti del danno glico-ossidativo indotto da esposizione cronica ad elevate concentrazioni di glucosio (HG) in cellule intestinali. A tale scopo è stata

utilizzata la linea cellulare Caco-2, cellule che mostrano caratteristiche funzionali e morfologiche simili agli enterociti maturi, ampiamente utilizzate per studi di assorbimento intestinale.

Lo stress glico-ossidativo nelle cellule trattate con e senza POE è stato valutato analizzando la produzione di ROS intracellulari, i prodotti di glicazione avanzata e l'attivazione della caspasi. Inoltre, è stato studiato l'effetto del trattamento con HG e POE sull'espressione dei principali trasportatori del glucosio come il co-trasportatore del glucosio sodio-dipendente (SGLT1) e il trasportatore del glucosio-2 (GLUT2 - un trasportatore del glucosio a bassa affinità) e le proteine coinvolte nella regolazione dell'integrità della barriera intestinale come Zonula occludens-1 (ZO-1). L'interesse a indagare su queste alterazioni è supportato da studi precedenti che hanno dimostrato che l'esposizione all'HG e lo stress ossidativo possono interferire con l'integrità epiteliale intestinale. Queste alterazioni potrebbero essere coinvolte nelle alterazioni della funzione di barriera intestinale e nello sviluppo di malattie gastrointestinali.

Capitolo 1

LA POSIDONIA OCEANICA: UN COMPLESSO ECOSISTEMA

1.1 Le praterie di Posidonia oceanica: origine e distribuzione

Le fanerogame marine sono un gruppo di piante a fiore (Phylum: Angiospermae) che dominano con successo le acque costiere superficiali di tutti i continenti, eccetto l'Antartide. Il nome "seagrasses" (dall'inglese sea: mare e grass: erba), con cui sono indicate nella letteratura scientifica, è dovuto alla loro morfologia che ricorda quella delle piante erbacee terrestri. Le piante acquatiche, inoltre, per crescere nell'ambiente marino devono possedere quattro importanti proprietà: adattarsi alla vita in un mezzo salino, essere in grado di crescere completamente sommerse dall'acqua, devono disporre di un sistema di ancoraggio sufficientemente sviluppato per resistere all'azione delle onde e delle correnti e, infine, devono avere la capacità di impollinazione idrofila (Den Hartog C., 1970).

Esistono 5 specie di fanerogame che popolano il Mediterraneo: *Posidonia oceanica* (L.) Delile, *Cymodocea nodosa* (Ucria), *Zostera marina* L., *Zostera noltii* Hornemann e *Halophila stipulacea* (Forsskål) Ascherson.

Le Seagrasses più comuni sono l'endemica *Posidonia oceanica*, *Cymodocea nodosa* e, limitata alla zona intertidale o ad acque poco profonde, *Zostera noltii*.

Cymodocea nodosa, specie dioica, generalmente si accresce su substrati sabbiosi in acque poco profonde, ma eccezionalmente può trovarsi anche alla profondità di 30-40 m. Classicamente è considerata una specie “pioniera” che, determinando una progressiva umificazione del substrato, consente l’impianto delle praterie di *P. oceanica*, le quali rappresentano lo stadio di climax dell’ecosistema (Moliner e Picard 1952).

La *P. oceanica*, infatti, forma praterie continue dalla superficie fino ad una profondità massima di 50 m, su differenti tipi di substrato (roccioso e sabbioso). Non è, però, presente negli estuari dei fiumi dove è forte l’apporto di sedimenti fini e di acqua dolce; è, infatti, una pianta che predilige le acque salate che non scendono oltre il 33% di salinità ed è possibile trovarla nelle lagune ipersaline della Tunisia e della Libia che hanno una salinità media di oltre il 40% (Boudouresque et al., 2006).

È una pianta acquatica di origini antichissime, infatti le testimonianze fossili risalgono a circa 100 milioni di anni fa (Wellman et al., 2003).

Gli studi genetici richiedono spesso un numero consistente sia di campioni che di individui per campione per avere stime affidabili dei parametri genetici della popolazione. Per evitare campionamenti distruttivi si possono adottare diverse procedure. Nelle fanerogame, in particolare, si può raccogliere solo una porzione dell'intero tallo o una singola foglia, fornendo in genere materiale

sufficiente per tutte le applicazioni successive (Procaccini. G. and Maltagliati F., 2004).

Le praterie di *Posidonia oceanica* (L.) Delile, rappresentano la comunità di piante dominante ed endemica del bacino Mediterraneo (Molenaar et al., 2000). Copre una superficie di circa 38.000 km², corrispondente a circa l'1,5% della superficie totale del mar Mediterraneo, e forma delle praterie sottomarine fino a circa 40-50 metri di profondità che costituiscono dei veri e propri ecosistemi, di notevole importanza ecologica (Figura 1).

Secondo Mazzella et al., sembrerebbe che la teoria secondo cui le fanerogame si siano riadattate alla vita sommersa deriva dallo studio morfologico delle specie attuali e fossili sviluppata da Den Hartog, secondo cui le angiosperme terrestri si sarebbero evolute in specie alotolleranti, capaci di sopportare brevi immersioni in acque salate. Queste avrebbero così iniziato a colonizzare habitat al confine tra terra e mare, fino al momento in cui l'impollinazione idrofila andò a sostituire quella anemofila, e di conseguenza le piante si spostarono sempre di più verso l'ambiente marino (Mazzella et al., 1986). Tuttavia, le fanerogame marine rimangono in numero notevolmente inferiore rispetto alle monocotiledoni terrestri, si contano, infatti 60 specie di angiosperme contro 234.000 specie di Magnoliofite terrestri (Heip, 1998; Lecointre e Le Guyader, 2001).

Grazie all'esistenza di cartografie marine risalenti all'inizio del XIX secolo, è stato possibile seguire i cambiamenti nella distribuzione delle praterie di *Posidonia oceanica* in un ampio arco temporale. È stata stimata una riduzione delle praterie del 5% dall'inizio del secolo fino al 1975 e una marcata regressione del 44% nell'arco dei soli dodici anni successivi, con una completa scomparsa dei posidonieti tra i 20 ed i 10 m di profondità, avvenuta in concomitanza di un'alta urbanizzazione delle zone costiere corrispondenti. L'allarmante rarefazione progressiva delle praterie di *P. oceanica*, dovuta prevalentemente a disturbi di origine antropica, ha fatto sì che la conservazione delle praterie sia diventata un'alta priorità nazionale ed internazionale. I posidonieti, infatti, sono stati inseriti nell'Allegato A della Direttiva Habitat (92/43) dell'Unione Europea, che comprende i tipi di habitat naturali di interesse comunitario, la cui protezione richiede la designazione di zone speciali di conservazione (CEE, 1992) (Pergent-Martini e Pergent, 1996).

Di seguito vengono riportate le caratteristiche di questa pianta dalle mille risorse.

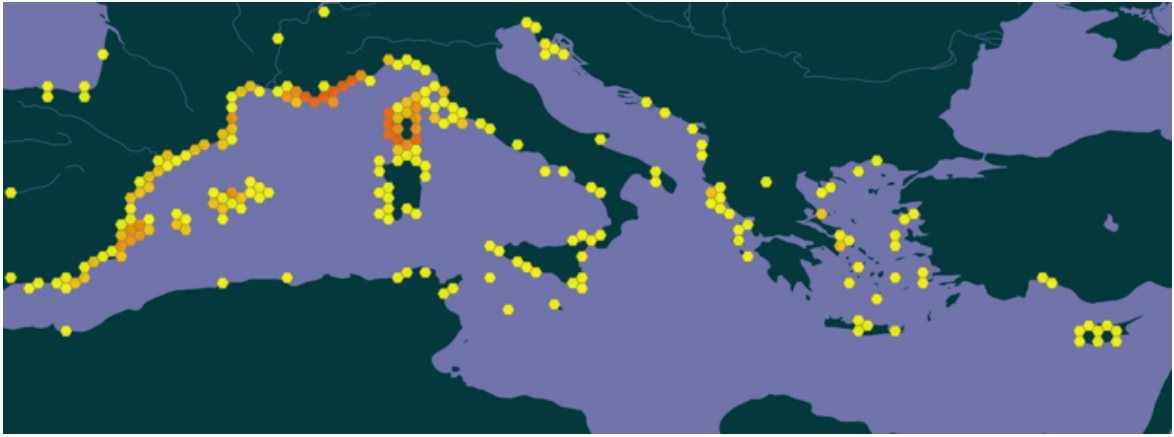


Figura 1. Distribuzione geografica della Posidonia oceanica.
Fonte: https://www.gbif.org/occurrence/gallery?taxon_key=5328663

1.2 Caratteristiche botaniche e morfologiche

Anche se vivono totalmente sommerse, le seagrasses possiedono la tipica organizzazione, come le piante terrestri, di radici, fusto rizomatoso e foglie nastriformi, lunghe fino ad un metro che crescono in gruppi. Possiede inoltre caratteristici fiori e semi, chiamati convenzionalmente olive di mare (Figura 2).

I rizomi sono fusti modificati che presentano la caratteristica di accrescersi sia in senso orizzontale (rizoma plagiotropo o tracciante) che verticale (rizoma ortotropo), da cui si dipartono verso l'alto le foglie e verso il basso le radici, che hanno sia ruolo di ancoraggio al substrato (sia sabbioso che roccioso), sia di assorbimento di nutrienti (Figura 3). All'interno, il rizoma presenta un sistema vascolare, mentre all'esterno risulta lignificato, in modo da contrastare il processo di degradazione.

I rizomi plagiotropi hanno la funzione di ancorare la pianta al substrato, grazie alla presenza di radici sul lato inferiore, e di consentire la colonizzazione di nuove aree. I rizomi ortotropi invece, crescendo in altezza, contrastano il progressivo insabbiamento dovuto alla continua sedimentazione e permettono in tal modo di sfruttare al massimo lo spazio e la luce disponibili. Lo sviluppo in verticale determina un progressivo innalzamento dal fondo, che dà origine ad una tipica formazione chiamata con il termine francese "matte". La matte è costituita dall'intreccio di più strati di rizomi e radici di vecchie piante e dal

sedimento intrappolato tra questi elementi; solo la sommità di questa formazione è ricoperta da piante vive (Mazzella et al., 1986).

Le foglie nascono dai rizomi ortotropi, sono nastriformi, con apici arrotondati, di colore verde intenso, hanno una larghezza media di un centimetro e possono raggiungere un metro e mezzo di lunghezza; sono differenziate in un lembo in cui avviene la fotosintesi ed in una base, presente solo nelle foglie più vecchie. Il limite tra base e lembo è rappresentato da una linea concava detta “ligula”, in corrispondenza della quale le foglie ormai deteriorate si staccano. Al contrario, le foglie giovanili, più interne e per convenzione di lunghezza minore a 5 cm, e quelle intermedie, più lunghe di 5 cm sono sprovviste di ligula (Boudouresque et al., 1984).

Le foglie sono raccolte in fasci di 4-8 e si presentano come lamine nastriformi che crescono fino ad 1 metro di lunghezza, mentre la larghezza varia da 0,6 a 1,2 cm, assottigliandosi verso l’apice che è la porzione più vecchia della lamina, infatti è la prima ad andare incontro a perdita di colore e degenerazione (Giraud, 1979; Mazzella et al., 1986).

La pianta è in grado di vivere entro un ampio intervallo di temperatura, tra i 10 e i 28°C e necessita di luce, infatti non la troviamo oltre i 50 m di profondità ed è influenzata dalla trasparenza dell’acqua. Al contrario, si adatta meno alle variazioni di salinità e non la troviamo in prossimità di aree fluviali e salmastre.

Predilige fondali sabbiosi, ma si adatta anche a fondali fangosi, detriti e roccia, sui quali si sviluppa attraverso la formazione delle matte descritte precedentemente (Boudouresque C.F. and Meinesz A., 1982).

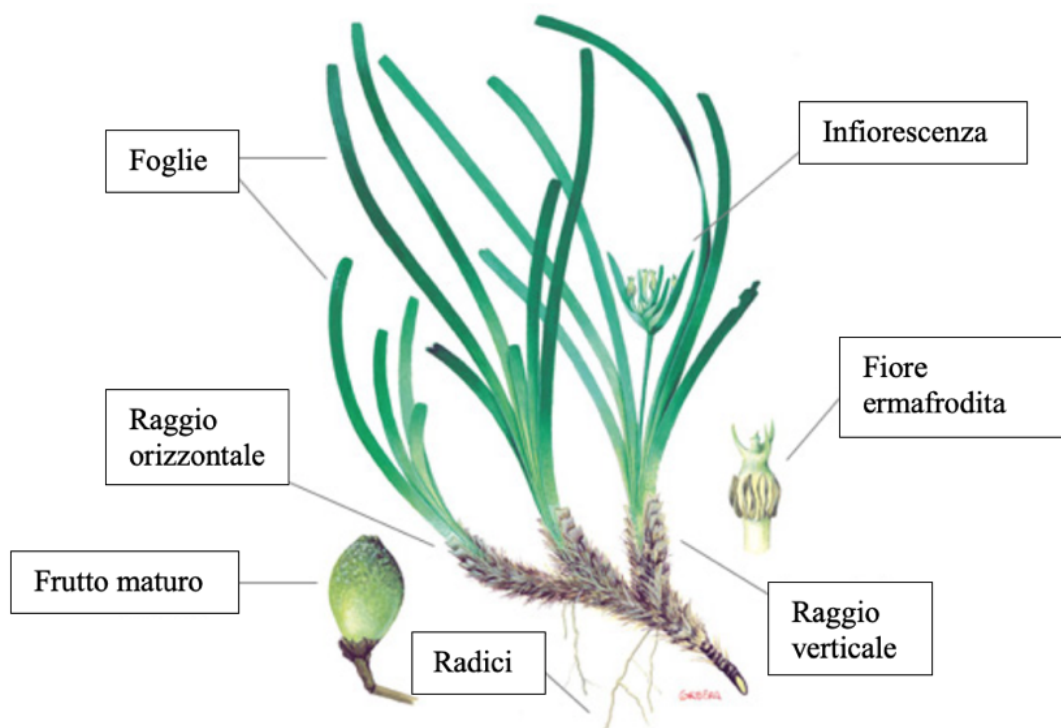


Figura 2. Morfologia della *Posidonia oceanica*. Fonte: <http://www.ocean4future.org/savetheocean/archives/253>



Figura 3. Praterie di *Posidonia oceanica*. Fonte: <https://www.terna.it/it/progetti-territorio/sapei/posidonia-oceanica>

1.3 Riproduzione e ciclo vitale

Il ciclo annuale della pianta comporta un periodo di crescita fogliare che va dall'autunno alla primavera, con colonizzazione delle foglie da parte di una comunità epifita molto specializzata; in autunno, con le prime tempeste, le foglie cadono e vengono accumulate in riva in forma di banchi che possono raggiungere vari metri di spessore.

La riproduzione è sia sessuata che asessuata. Quella asessuata, vegetativa, si verifica tramite stolonizzazione che avviene per distacco del rizoma terminale da quello parentale ad opera di fattori ambientali e fisiologici, ed è responsabile della colonizzazione orizzontale, quindi della formazione delle lunghissime praterie (Moliner and Picard, 1952; Molenaar et al., 2000).

La riproduzione sessuata si verifica prevalentemente in autunno, avviene attraverso la produzione di fiori ermafroditi e frutti ed è la modalità che permette di generare variabilità genetica.

I fiori sono raggruppati in infiorescenze e presentano una porzione maschile (stami) e una femminile (carpello); il gineceo è formato da un ovario contenente un'unica cellula uovo, che si prolunga in uno stilo che termina in uno stigma piumoso, mentre l'androceo è formato da tre stami con due sacchi pollinici ognuno, che si prolungano in corte antere.

A seguito dell'impollinazione, l'ovario matura in frutto, il quale somiglia ad un'oliva; da qui deriva il nome di "oliva di mare". Questo successivamente si stacca e viene trasportato dalle correnti marine fino a quando il pericarpo si degrada, il seme affonda e germina, permettendo alla pianta di colonizzare un nuovo territorio (Caye G. and Meinesz A., 1984).

1.4 Composizione chimica

A partire dal 2009 il contenuto biochimico e minerale della *Posidonia oceanica* è stato studiato in maniera più approfondita. È stata precisata la composizione chimica delle foglie di *Posidonia oceanica* determinandone le caratteristiche analitiche ai fini nutrizionali, la composizione in macro e microelementi, in acidi grassi, steroli e in amminoacidi liberi e totali (Tabella 1). La pianta risulta abbastanza ricca in sostanze proteiche ed in sali minerali e povera di lipidi, la cui composizione acidica si avvicina a quella delle piante acquatiche non marine (Lotti, G. and Paradossi C., 1979).

Considerando le dosi abituali di estratti da fonti naturali utilizzate nei prodotti per l'uomo (0,1-1%), il contenuto di iodio nell'estratto di foglie di *Posidonia oceanica* è compatibile con un'assunzione massima tollerabile di 1,0 mg/die (Misurcova et al., 2011).

Sono abbondantemente presenti componenti bioattive che hanno importanti funzioni antidiabetiche, antiossidanti, vasoprotettive, antibatteriche e antifungine. Tra queste, vi sono flavonoidi, tannini condensati e nuovi composti (Gokce G. and Haznedaroglu M.Z., 2007; Cariello L. and Zanetti L., 1979; Bernard P. and Pesando D., 1989; Cannac et al., 2007; Hammami et al., 2012). Sebbene la composizione dell'estratto, in termini di polifenoli, sia flessibile in base alla tecnica di estrazione, al tipo di foglia, al periodo stagionale e alle condizioni ecologiche, i principali fenoli presenti sono: acido 4-idrossibenzoico, acido cumarico, acido cinnamico, acido caffeico, acido freulico, miricetina, quercetina, isoramnetina, kampferolo, acido gentisico, acido cicorico e vanillina (Dumay O et al., 2005; Cannac M et al., 2006; Haznedaroglu MZ and Zeybek U, 2007). Le concentrazioni di alcuni principali componenti fenolici sono rappresentate in (Tabella 2).

Altri costituenti chimici includono derivati fenolici, tra i quali troviamo fluoroglucinolo, pirogallolo, vanillina aldeide, derivati dell'acido benzoico (4-idrossibenzaldeide, 3,4-diidrossibenzaldeide, acido p-idrossibenzoico), acido p-vanilansico, acido siringico, calconi (floreina e floridzina) e proantocianidine (Heglemeir A and Zidorn C, 2010; Haznedaroglu, M.Z. and Zeybek, U., 2007; Cannac et al., 2007).

La composizione fenolica è stata analizzata attraverso l'UPLC (Ultra-Performance Liquid Chromatography) e sono stati identificati l'88% dei fenoli totali, di cui l'83% è rappresentato da (+)-catechine, le componenti principali, ad una concentrazione di 420 $\mu\text{m}/\text{mL}$ e il restante 5% da acido gallico (0,4%), acido freulico (1,7%), (-)-catechine, epicatechine (1,4%) e acido clorogenico (0,6%). Il restante 12% è rappresentato da componenti non caratterizzate (Barletta et al., 2015).

La lignina, derivante dai polifenoli è presente in tutti i tessuti della pianta.

La frazione lipidica è rappresentata principalmente dagli acidi grassi a catena lunga palmitico, palmitoleico, oleico e linoleico, nonché dai fitosteroidi quali campesterolo, stigmasterolo e β -sitosterolo (Viso et al., 1993). È stato isolato dalle foglie anche un alcol sesquiterpenico denominato posidozinolo (Hammami et al., 2013).

Minerale	Quantità (mg/100 g)
Calcio	3890
Fosforo	930
Sodio	2765

Tabella 1. Quantità di minerali presenti nelle foglie di P. oceanica. Fonte: Vasarri et al., 2021; El Din et al., 2013

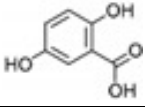
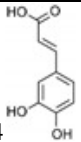
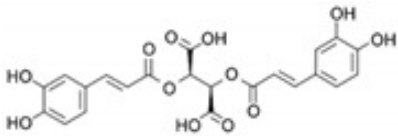
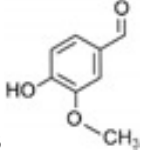
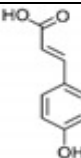
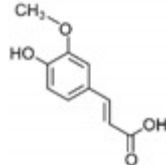
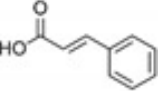
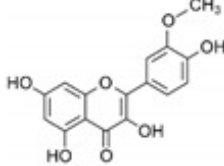
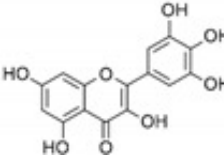
Composto	Formula molecolare e strutturale	Foglie giovani (µg/g di peso secco)	Foglie mature (µg/g di peso secco)
Acido gentisico	$C_7H_6O_4$ 	156.8	395.0
Acido caffeico	$C_9H_8O_4$ 	10.5	14.4
Acido cicorico	$C_{22}H_{18}O_{12}$ 	138.6	38.4
Vanillina	$C_8H_8O_3$ 	49.5	9.4
Acido cumarico	$C_9H_8O_3$ 	4.2	2.4
Acido freulico	$C_{10}H_{10}O_4$ 	2.2	1.5
Acido cinnamico	$C_9H_8O_2$ 	1.2	1.7
Isoramnetina	$C_{16}H_{12}O_7$ 	/	1-3
Miricetina	$C_{15}H_{10}O_8$ 	/	20

Tabella 2. Concentrazioni dei principali composti fenolici in foglie giovani e foglie mature. Fonte: Haznedaroglu MZ and Zeybek U, 2007

1.5 Utilizzi ed applicazioni della Posidonia oceanica

1.5.1 Importanza ecologica dei sistemi di Posidonia oceanica

La *Posidonia oceanica* costituisce un sistema complesso che ha un ruolo fondamentale nell'ecosistema costiero e marino. Le praterie di *P. oceanica* rappresentano una biocenosi molto complessa e ben strutturata, caratterizzata da un'elevata variabilità biologica delle comunità vegetali ed animali che la compongono. La prateria di *Posidonia* costituisce la "comunità climax" del Mediterraneo, cioè rappresenta il massimo livello di sviluppo e complessità che un ecosistema può raggiungere. Il posidonieto è, quindi, l'ecosistema più importante del mar Mediterraneo. 1 ettaro di prateria può ospitare e dare nutrimento fino a 350 specie diverse di animali, offrendo riparo a pesci, cefalopodi, bivalvi, gasteropodi, echinodermi e tunicati, quindi anche a specie ittiche commercialmente importanti.

Dal momento che la legislazione specifica sulla pesca non consenta la pesca distruttiva (pesca a strascico), l'unico tipo di pesca consentita nelle praterie di *Posidonia oceanica* è la piccola pesca basata sull'uso di reti fisse e gabbie (Buia et al., 2000).

È noto che le praterie di *P. oceanica* costituiscono una delle componenti fondamentali dell'equilibrio e della ricchezza dell'ambiente litorale costiero

mediterraneo. Svolgono un ruolo fondamentale nella produzione di ossigeno: grazie al suo sviluppo fogliare infatti libera nell'ambiente fino a 20 litri di ossigeno al giorno per ogni m² di prateria. Inoltre, vengono usate come indicatore biologico della qualità delle acque, e dell'ambiente marino costiero a causa della loro ampia distribuzione, della loro sedentarietà e della loro suscettibilità alle mutevoli condizioni ambientali (Montefalcone M., 2009).

Esse sono caratterizzate da un'elevata biomassa vegetale, considerata tra le più alte, a livello mondiale, per l'ambiente marino.

Una parte considerevole di questa produzione primaria (dal 25% all'85%) viene esportata sotto forma di foglie morte verso altri tipi di fondo, dove rappresenta una risorsa alimentare di grande importanza. La sostanza organica prodotta costituisce una fonte di cibo diretta e indiretta per numerosi organismi, infatti, la maggior parte di produzione fogliare, stimata attorno ai valori di 300-2000 g di peso secco per m² all'anno viene consumata attraverso l'azione di crostacei, gasteropodi e microrganismi presenti nella lettiera, creando la base di una complessa rete trofica (Pergent et al., 1994; Boudouresque et al., 2006).

Inoltre, proprio questa sua caratteristica di elevata produzione primaria rende l'ecosistema delle praterie di *P. oceanica* in grado di sequestrare grandi quantità di carbonio chiamato "blue carbon" (blue si riferisce agli ecosistemi

costieri e marini) e quindi grandi quantità di anidride carbonica dall'atmosfera, riuscendo così ad ossigenare notevolmente le acque costiere.

Sebbene la loro area globale sia da uno a due ordini di grandezza inferiore a quella delle foreste terrestri, il contributo degli habitat costieri vegetati per unità di area al sequestro di C a lungo termine è molto maggiore, in merito alla loro efficienza nell'intrappolare la materia sospesa e le sostanze organiche durante le inondazioni (Mcleod et al., 2011).

La fascia costiera è soggetta a continui cambiamenti legati a diversi impatti, sia di origine naturale come ad esempio l'erosione delle coste, che di origine antropica (scarichi industriali e urbani, pesca a strascico, opere marittime, allevamenti marini, attività legate al diporto nautico). I sistemi a fanerogame, proprio a causa della loro vicinanza alla costa, sono soggetti a diversi tipi di impatti antropici i quali, sommati a quelli naturali ne causano un evidente e generalizzato declino. Per questo motivo le praterie di *Posidonia oceanica* rientrano tra i bioindicatori. La valutazione dello stato di una prateria di *Posidonia oceanica* può essere effettuata studiando la fenologia della pianta, le interazioni tra pianta, flora e fauna associata oppure la morfologia e la struttura della prateria. La stima dell'andamento annuale della produzione della pianta, la produzione in biomassa, l'allungamento del rizoma e l'eventuale contaminazione da metalli pesanti come composti organo clorurati e metalli in

traccia nei tessuti, consente indirettamente di avere informazioni sulla qualità dell'ambiente (Vasarri et al., 2021).

Le praterie di *P. oceanica* rivestono un ruolo importante e multifunzionale nei sistemi litorali. L'apparato radicale e quello stolonifero della pianta garantiscono un effetto di stabilizzazione del fondo marino, svolgendo un ruolo fondamentale sulla dinamica costiera in quanto possono agire sulla sedimentazione imbrigliando il particolato fine tra i rizomi, oppure interagire con la violenza del moto ondoso, riducendola. Le osservazioni sul campo hanno rivelato che quando il flusso d'acqua è coerente da una direzione, i germogli di alghe si allineano in file perpendicolari all'asse principale della direzione del flusso; tuttavia, anche le lame fotosinteticamente attive possono essere danneggiate o rotte in condizioni di tempesta frequenti, indipendentemente dalla disposizione dei germogli. La matte, inoltre, rappresenta una struttura allo stesso tempo elastica e rigida che può assorbire una parte dell'energia delle onde (Fonseca et al., 2007).

Infine, le foglie morte, trasportate a riva dalle correnti, costituiscono ammassi misti a sabbia che possono superare anche il metro di altezza (banquettes, banchetti) e che rappresentano una protezione per le spiagge, attenuando i danni provocati dalle mareggiate, rappresentando perciò un'importante cintura naturale di contenimento e di protezione delle coste dall'azione erosiva del

moto ondoso. Tuttavia, la percezione di questi accumuli vegetali da parte di gestori delle spiagge, amministrazioni locali e turisti è spesso negativa, e i banchetti vengono considerati come depositi di rifiuto da rimuovere (Rotini et al., 2020).

La *P. oceanica* riveste quindi un ruolo fondamentale nell'economia generale delle aree costiere, inoltre recentemente si sono indagate le sue proprietà e i suoi benefici in altri ambiti.

1.5.2 Uso in ambito edilizio

In passato le foglie di *Posidonia oceanica* venivano usate per imballaggi di alimenti e beni materiali, per la costruzione di tetti e come isolante termico.

1.5.3 Utilizzo in ambito zootecnico e agricolo

In zootecnia le foglie di *Posidonia oceanica* venivano usate come lettiera per il bestiame, in virtù delle sue proprietà antimicotiche e repellenti verso gli insetti, e come integratore alimentare per pollame e bestiame.

In campo agricolo è già stato documentato l'uso come fertilizzante e si sta analizzando la possibilità di utilizzare le foglie per la concimazione e per la produzione di biogas, tuttavia alcuni studi recenti hanno evidenziato che il

contenuto di sali minerali è notevolmente superiore alle concentrazioni ammissibili e il suo ruolo come fertilizzante è stato rivalutato.

1.5.4 Utilizzo in ambito alimentare

Studi recenti attestano la presenza di sostanze polifenoliche, antiossidanti e antifungine presenti nell'estratto di foglie di PO, che potrebbero conferirle un ruolo nella conservazione degli alimenti.

1.5.5 Utilizzo e proprietà della *Posidonia oceanica* in ambito medico-clinico

Le prime informazioni di tipo farmacologico provengono dall'antico Egitto, dove la *Posidonia oceanica* veniva usata per la cura di infiammazioni e irritazioni, quindi mal di gola, colite, problemi della pelle, acne e dolore agli arti inferiori (Batanouny, K.H., 1999). Inoltre, le foglie cotte di PO venivano usate come antico rimedio naturale per il diabete e l'ipertensione dagli abitanti dell'Anatolia, suggerendo un possibile impiego terapeutico nella salute umana e aprendo la strada a varie ricerche in tale ambito. Infatti, è stato successivamente osservato che la somministrazione orale ai ratti dell'estratto per 15 giorni, a concentrazioni di 50, 150 e 250 mg/kg di peso corporeo, determinava una diminuzione dose-dipendente della glicemia e il ripristino delle risposte rilassanti all'acetilcolina (ACh).

Nel 1989 Bernard e Pesando attribuirono proprietà antibatteriche e antifungine ai rizomi di *Posidonia oceanica*, proprietà che furono poi ulteriormente studiate da Berfad e Alnour nel 2014, i quali dimostrarono che anche l'estratto di foglie di PO aveva attività antibatteriche contro Gram-positivi e Gram-negativi, in particolare contro *P. aeruginosa* e *S. aureus* (Berfad M.A. and Alnour T.M.S., 2014).

Le proprietà antivirali furono invece studiate da Farid et al., nel 2018, che dimostrarono un effetto inibitorio da parte dell'estratto dei rizomi di PO del 45% verso l'infezione dal virus H5N1, ovvero il virus dell'influenza aviaria. Questi risultati potrebbero essere dovuti alle alte concentrazioni di acido p-idrossibenzoico, un agente antivirale. I suoi derivati, infatti, sono ampiamente utilizzati per il trattamento di infezioni causate da virus dell'epatite B, papilloma virus umano, virus dell'herpes simplex, condilomi acuminati, cervicite ed erosioni cervicali nell'uomo e nell'animale (Farid et al., 2018).

Questi studi hanno interessato negli ultimi anni la scienza dell'alimentazione e la ricerca si sta concentrando sulle applicazioni di composti naturali con attività antimicrobica e antiossidante come alternativa sicura e rispettosa per l'ambiente agli additivi chimici, nel campo della conservazione degli alimenti. È già stato dimostrato un possibile impiego dell'estratto di PO su alimenti di

IV gamma, in particolare per ridurre il rischio di deterioramento da parte di *Pseudomonas* in frutta fresca (Piva et al., 2017).

Recenti studi in cellule di fibrosarcoma HT1080 hanno dimostrato le sue proprietà antitumorali. Nel cancro, le metalloproteasi contribuiscono all'invasione cellulare e alla propagazione (Kessenbrock et al., 2010). Le metalloproteasi (MMP) sono endopeptidasi Zn-dipendenti e tra queste troviamo la gelatinasi A (MMP-2) e la gelatinasi B (MMP-9) (Pytliak et al., 2012; Kwaan HC and McMahon B, 2009). In genere, le cellule tumorali vanno incontro ad autofagia per sopravvivere alle condizioni di stress (Gugnoni et al., 2016), le cellule HT1080, trattate con estratto do *Posidonia oceanica*, mostravano un aumento di autofagia, osservato tramite un aumento di autofagosomi nel citosol, dovuto alla riduzione dell'attività delle metalloproteasi e un concomitante effetto inibitorio sulla migrazione (Wang et al., 2017).

Utilizzando l'albumina sierica umana (HSA), altri studi hanno dimostrato le proprietà anti-glicative dell'estratto di POE. Gli AGE sono dei composti finali di glicazione avanzata che vengono prodotti in condizioni di iperglicemia in seguito ad una reazione non enzimatica. La glicazione delle proteine provoca cambiamenti nella conformazione delle molecole e ne interferisce con l'attività enzimatica e recettoriale (Singh et al., 2014). L'estratto di POE è stato in grado

di inibire la produzione di AGEs, in albumina sierica glicata con glucosio per mimare una condizione di iperglicemia (Vasarri et al., 2020).

Da un altro studio è emerso che la somministrazione di POE ha migliorato la tolleranza al glucosio, in maniera concentrazione-dipendente, e diminuito la concentrazione dei biomarcatori della funzionalità epatica (ALP, GPT) e renale (blood urea nitrogen - BUN, creatinina), e la perdita di peso corporeo in topi diabetici (Gokce G. and Haznedaroglu M.Z., 2007).

L'estratto di *Posidonia oceanica* ha mostrato inoltre proprietà antiinfiammatorie ed antiossidanti in macrofagi murini RAW264 co-trattati con lipopolisaccaride (LPS). L'estratto ha contrastato lo stimolo pro-infiammatorio indotto da LPS riducendo livelli intracellulari di ROS e l'NO e modulato l'espressione di NF-kB, quindi il suo ingresso nel nucleo e lo stimolo della sintesi dei geni pro-infiammatori (Vasarri et al., 2020).

Recentemente è stato investigato l'effetto della somministrazione orale di POE sul dolore e sull'infiammazione in topi CD-1, nei quali sono stati iniettati agenti pro-infiammatori come il carragenano. POE ha aumentato la soglia di dolore in maniera dose-dipendente, e ciò è stato confermato con il test di pressione sulla zampa, attraverso uno stimolo meccanico. Inoltre, POE ha ridotto il diametro dell'edema provocato dal carragenano (Micheli et al., 2021).

Infine, Cornara et al, hanno dimostrato che l'estratto di foglia di *Posidonia oceanica* è in grado di stimolare la proliferazione e la produzione di collagene nei fibroblasti (Cornara et al., 2018).

Riassumendo, i recenti studi sulla *Posidonia oceanica* stanno dimostrando moltissimi ruoli benefici di questa pianta sulla salute umana, dovuti principalmente ai composti bioattivi polifenolici di cui è ricca.

Nella Figura 4 sono riassunte le principali vie metaboliche su cui la *Posidonia oceanica* esercita un effetto inibente o stimolante. Possiamo osservare quindi che PO ha un effetto antitumorale, in quanto inibisce le vie coinvolte nella migrazione cellulare e l'autofagia; esercita un ruolo protettivo contro lo stress ossidativo, agendo come antiossidante e scavenger di radicali liberi ed inibendo di conseguenza la produzione di ROS; ha un effetto positivo sulla salute della pelle, promuovendo l'attivazione dei fibroblasti, l'attività demelanizzante e la lipolisi; ha un effetto antidiabetico in quanto permette di diminuire la glicemia e contrasta la formazione di AGEs; e, più in generale, agisce come antinfiammatorio, bloccando la formazione di tutti i mediatori coinvolti nelle vie che portano all'infiammazione e al dolore.



Figura 4. P. oceanica e i possibili target terapeutici per la salute umana. Le frecce con terminazione a punta indicano un effetto favorevole sulla via in questione, le frecce con il blocco orizzontale terminale indicano un'inibizione. Fonte: Vasarri et al., 2021

Capitolo 2

GLICO-OSSIDAZIONE: RUOLO FISIO-PATOLOGICO E DIFESA NELL'APPARATO INTESTINALE

2.1 Lo stress ossidativo e la sua rilevanza fisio-patologica

Lo stress ossidativo è un concetto introdotto per la prima volta nella teoria di Denham Harman nel 1956 che indica una condizione patologica, in un organismo vivente, causata dalla rottura dell'equilibrio fisiologico fra la produzione e l'eliminazione di specie chimiche ossidanti, da parte dei sistemi di difesa antiossidanti (Figura 5) (Harman, D., 2009). I radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) sono molecole coinvolte nei processi fisiologici cellulari; i ROS, ad esempio, sono prodotti durante la respirazione cellulare come sottoprodotti del metabolismo, in particolare durante l'attività fisica, sono coinvolti nei meccanismi di difesa cellulare, nelle funzioni immunologiche, nella segnalazione cellulare, apoptosi e regolazione genica, fungendo da messaggeri intra ed intercellulari.

Queste molecole, assieme ad agenti non radicalici pro-ossidanti come l'acqua ossigenata e alle radiazioni ionizzanti possono portare ad una condizione di stress ossidativo e, se le difese antiossidanti dell'organismo sono insufficienti

a contrastarli, possono compromettere in modo anche irreversibile le cellule e l'organismo.

Uno dei bersagli dei ROS è rappresentato dalla componente fosfolipidica delle membrane e delle lipoproteine plasmatiche. La perossidazione lipidica è un processo causato dall'interazione tra molecole ossidative reattive libere e atomi di idrogeno presenti negli acidi grassi: questo dà origine a radicali lipidici, che sono a loro volta instabili e si legano facilmente all'ossigeno molecolare formando radicali perossili lipidici che sono in grado di ossidare altri lipidi, innescando così una reazione a catena (Niki et al., 2005).

Le molecole più suscettibili ad un attacco radicalico sono gli acidi grassi insaturi, in particolare i polinsaturi presenti nei fosfolipidi (PUFA – Poly-Unsaturated Fatty Acids) ed il colesterolo che compongono le membrane cellulari. Il principale prodotto di reazione della lipoperossidazione è la malondialdeide (MDA), un'aldeide reattiva in grado di reagire con la deossiguanina e la deossiadenosina del DNA formando composti mutageni, precursori di carcinogenesi (es. pirimidopurinone - M1G) (Ayala et al., 2014; Marnett L.J., 1999) (Figura 6).

I radicali dell'ossigeno, inoltre, reagiscono con le principali macromolecole biologiche generando danni cellulari e subcellulari, danni mitocondriali, invecchiamento, senescenza e apoptosi (Davalli et al., 2016).

Lo stress ossidativo è perciò coinvolto nello sviluppo di patologie croniche degenerative che sono principalmente legate all'età ed aggravate in condizioni di alterazioni dell'equilibrio redox:

- patologie infiammatorie: glomerulonefriti, malattie autoimmuni, artrite reumatoide (Dandekar et al., 2015)
- patologie respiratorie: danni da fumo di sigaretta, enfisema, danno iperossico, fibrosi cistica, malattia polmonare cronica ostruttiva, asbestosi, fibrosi polmonare, asma (Ornatowski et al., 2020)
- patologie neurologiche: Morbo di Alzheimer, Morbo di Parkinson, sclerosi multipla, distrofie muscolari, encefalopatia allergica, emorragia cerebrale (Singh et al., 2019)
- ischemia-riperfusione: infarto del miocardio, ictus, trapianti d'organo (Shen et al., 2019)
- patologie ematologiche: anemia falciforme, favismo, anemia di Fanconi, malaria (Grune et al., 2020; Percário et al., 2012)
- patologie cardiovascolari: miocardiopatia alcolica, aterosclerosi, ipertensione, trombosi (Ndrepepa G., 2019)
- patologie cutanee (Baek J. and Lee M.G., 2016)
- patologie renali: effetti cronici della terapia dialitica, ipercalciuria, nefropatia (Khan S.R., 2013)

- patologie oculari: cataratta, degenerazioni retiniche, glaucoma (Ivanov et al., 2018)
- altre: diabete, danno epato-tossico, pancreatite acuta, senescenza precoce, cancro (Luc et al., 2019; Wen S. and Liao T., 2021; Armstrong et al., 2013; Davalli et al., 2016; Klaunig J.E., 2018)



Figura 5. Lo stress ossidativo: uno sbilanciamento tra specie ossidanti e antiossidanti. Fonte: <https://www.airas.it/stress-ossidativo-invecchiamento-malattia/>

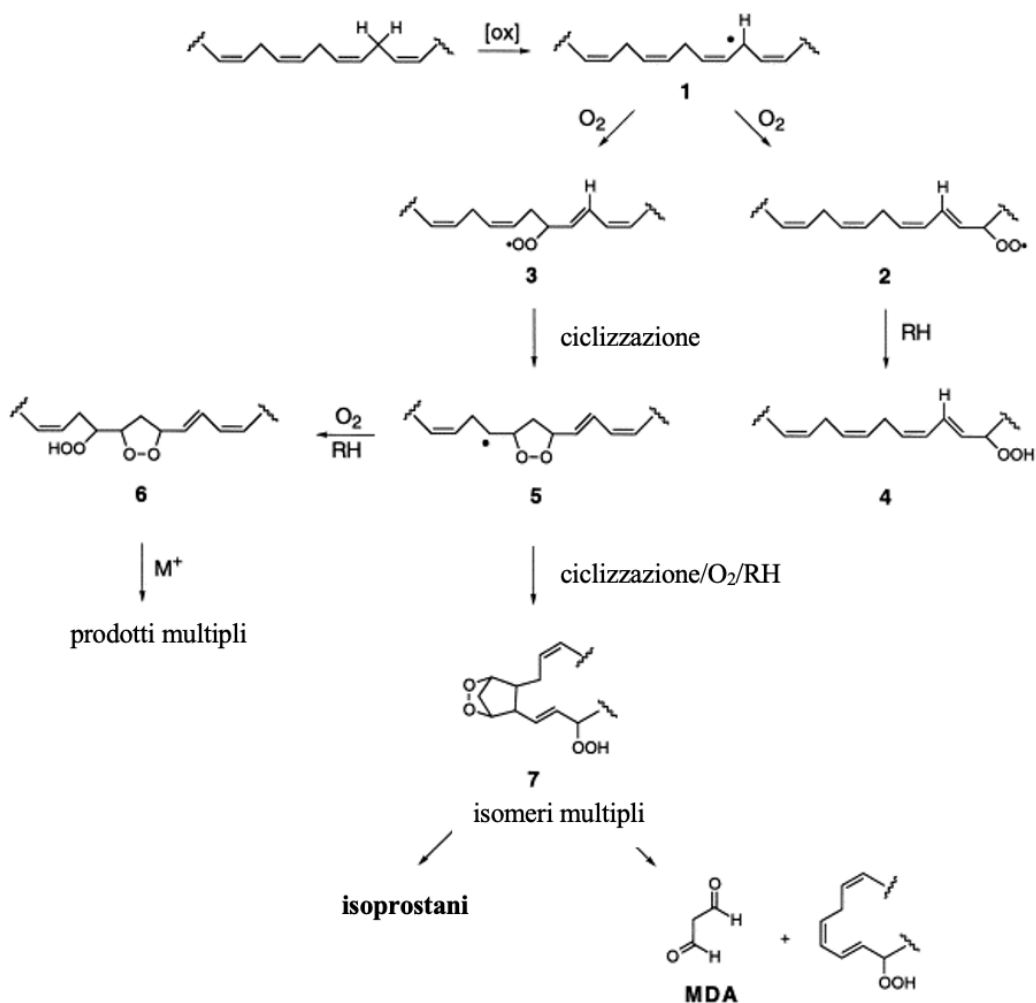


Figura 6. Perossidazione lipidica. I gruppi metilene sono altamente reattivi agli agenti ossidanti e i loro atomi di idrogeno vengono rimossi per formare radicali centrati sul carbonio (1). Questi reagiscono con l' O_2 per formare radicali perossilici (2, 3), che hanno un destino diverso a seconda della loro posizione all'interno della catena dell'acido grasso: se si trova all'estremità del sistema a doppio legame viene ridotto a idroperossido (4), un prodotto relativamente stabile; se si trova all'interno si forma un prodotto di ciclizzazione che è un perossido ciclico adiacente a un radicale centrato sul carbonio (5). Questo a sua volta può accoppiarsi con l' O_2 e formare un radicale perossilico che viene ridotto a idroperossido (6) o subire una seconda ciclizzazione per formare un perossido biciclico che si accoppia con O_2 e produce una molecola analoga all'endoperossido di prostaglandina (7), che funge da intermedio per la produzione di isoprostani e malondialdeide (MDA). Fonte: Marnett L.J., 1999

2.1.1 Patologie infiammatorie

Nel caso di infiammazioni polmonari i ROS e RNS possono causare necrosi epiteliale e vascolare, degenerazione del connettivo e attivazione dei fattori di trascrizione di interleuchine pro-infiammatorie (IL-8, IL-6) che alimentano lo stato infiammatorio. È stato documentato che l'attivazione del fattore nucleare kappa-B/proteina attiva-1 (NF-kB/AP-1) e la produzione del fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) svolgono un ruolo critico nel processo infiammatorio, determinando l'aggravarsi di patologie croniche (Hussain et al., 2016).

Dal momento che i ROS possono attivare diverse vie di segnalazione che hanno un'importanza vitale nello sviluppo e progressione dell'artrite reumatoide, è stato riscontrato che nel liquido sinoviale di pazienti malati vi erano aumentati livelli di composti derivanti dalla perossidazione lipidica e nelle articolazioni minori livelli di glutatione. Inoltre, le cellule T che permeano lo strato sinoviale possono attivare macrofagi, monociti e fibroblasti sinoviali attraverso il contatto cellula-cellula e l'attivazione da parte di varie citochine pro-infiammatorie, quali interferone- γ , fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) e interleuchina 17 (IL-17), che determinano un peggioramento dell'infiammazione e del quadro clinico (Phull et al., 2018).

2.1.2 Insufficienza renale cronica (IRC)

I ROS svolgono un ruolo importante nella regolazione fisiologica della funzione renale che di conseguenza rende il rene particolarmente vulnerabile agli squilibri redox e allo stress ossidativo determinando alterazioni del flusso sanguigno, ritenzione di sodio, infiammazione, cambiamenti fibrotici e proteinuria. Nei pazienti con IRC sono state riscontrate concentrazioni maggiori di marcatori di stress ossidativo: superossido mitocondriale, LDL ossidato (conseguenza della perossidazione lipidica), omocisteina, varie tossine uremiche e carenza di superossido dismutasi (SOD) e glutazione (GSH).

L'ossidazione di proteine e lipidi può portare all'accumulo plasmatico di aggregati macromolecolari (amiloidosi da dialisi) e, di conseguenza, all'aterosclerosi. Inoltre, durante la dialisi, il contatto del sangue con del materiale poco biocompatibile può scatenare la produzione di ROS e una diminuzione delle difese antiossidanti (Daenen et al., 2019).

Altri meccanismi che portano al peggioramento della patologia coinvolgono l'induzione di enzimi pro-ossidanti renali che generano un'elevata quantità di ROS, che mediano risposte miogene alterate delle arteriole renali afferenti, e l'accumulo di prodotti proteici di ossidazione avanzata che sono correlati al danno dei podociti, alla proteinuria e allo sviluppo della glomerulosclerosi focale segmentaria (FSGS) e della fibrosi tubulo interstiziale.

In aggiunta, l'attivazione di NF-kB nell'ambiente pro-ossidante promuove l'espressione di citochine proinfiammatorie e il reclutamento di cellule proinfiammatorie (Duni et al., 2019).

2.1.3 Diabete mellito (DM)

Le cellule beta del pancreas risultano altamente suscettibili al danno ossidativo in quanto il potenziale antiossidante endocellulare risulta minore rispetto ad altri tipi cellulari. Nel DM di tipo 1 le cellule beta subiscono un attacco autoimmune e la morte cellulare sembra essere mediata da macrofagi, cellule T e dall'esposizione a mediatori secreti dalle cellule stesse come citochine, ROS e ossido nitrico. Nel DM di tipo 2 l'iperglicemia causa una maggiore produzione mitocondriale di anione superossido e di ROS che inducono l'ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS) a produrre NO ed anione perossinitrito (ONOO^-), che agiscono con effetti tossici sulle cellule beta (Kaneto et al., 2007).

2.1.4 Patologie cardiovascolari

Nel miocardio lo stress ossidativo altera la compartimentazione subcellulare dello ione calcio, il quale si trova aumentato a livello citoplasmatico in caso di

aterosclerosi, ipertensione, ischemia-riperfusion e ipertrofia che prelude allo scompenso cardiaco.

La lipoperossidazione della membrana sarcoplasmatica delle cellule muscolari dell'apparato cardiovascolare causa l'inibizione dell'ATPasi Ca^{++} -dipendente e il rilascio dello ione nel citoplasma, mentre nel mitocondrio, la perossidazione lipidica a livello della membrana interna causa la fuoriuscita del citocromo c innescando il processo apoptotico.

Inoltre, ROS e perossidi lipidici causano il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa nei mitocondri alterando il trasporto del Ca^{++} , mentre a livello delle arterie, le LDL accumulate attivano i macrofagi e cellule con effetto pro-ossidante causando la progressione delle lesioni aterosclerotiche (Mitra et al., 2011; Kattoor et al., 2017).

2.1.5 Cancerogenesi

È stato documentato che le cellule tumorali presentano una più alta quantità di ROS rispetto alle cellule normali. Ciò può dipendere sia dalla loro maggiore produzione da parte dei mitocondri o da parte di enzimi quali nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ossidasi o NADPH ossidasi (NOX), sia da una ridotta quantità di sistemi antiossidanti come la superossido dismutasi (SOD) e la catalasi. I ROS, tramite l'attivazione delle chinasi ERK 1/2 e di fattori di

sopravvivenza (NF- κ B, AKT, Src, PI3K), promuovono la proliferazione cellulare e la resistenza all'apoptosi che determinano il fenotipo oncogenico delle cellule e la conseguente invasività, metastasi tumorale, attraverso la secrezione di metalloproteinasi (MMP) nella matrice extracellulare, e angiogenesi tramite il rilascio del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF).

Per quanto riguarda la proliferazione cellulare, lo stress ossidativo colpisce diverse vie biochimiche: dal recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) a mTOR, che coinvolgono proteine chiave di segnalazione, come il fattore nucleare eritroide 2 correlato al fattore 2 (Nrf2), la proteina simile al kelch 19 (Keap1), Ras, Raf, proteine chinasi attivate da mitogeni (MAPK: ERK1/2, MEK, p38 α , c-Jun N-terminale chinasi, c-myc, p53 e PKC). Tra questi, Nrf2 è considerato il principale regolatore della risposta antiossidante, mentre p38 α agisce da sensore di rilevamento redox bloccando la tumorigenesi e promuovendo l'apoptosi.

Inoltre, i ROS hanno un ruolo rilevante nella formazione e nell'evoluzione della patologia, principalmente innescando mutazioni sul DNA. Infatti, molti interventi terapeutici di prevenzione e gestione del decorso clinico sono mirati ad aumentare il potenziale antiossidante (Klaunig JE, 2018; Sosa et al., 2013).

2.2 Glicazione e glico-ossidazione non enzimatica

La glicazione non enzimatica, o reazione di Maillard, è una complessa serie di reazioni che coinvolge uno zucchero riducente e i gruppi amminici delle proteine. Poiché la reazione non richiede la presenza di enzimi, le variabili che regolano il processo sono le concentrazioni degli zuccheri riducenti, della proteina, la vita media della proteina e la sua reattività in termini di gruppi amminici disponibili. La reazione di Maillard avviene negli alimenti durante il trattamento termico, i processi tecnologici e la conservazione. La reazione è associata ad effetti sia positivi sia negativi nell'alimento. Infatti, da una parte porta alla formazione di molecole responsabili del colore e dell'aroma degli alimenti, dall'altra è associata alla perdita della qualità nutrizionale (Fu et al., 2020).

La reazione di Maillard avviene anche nel nostro organismo e può coinvolgere proteine e molecole biologiche. Tale reazione ha rilevanza clinica in quanto la glicazione non enzimatica causa alterazioni strutturali alle principali macromolecole, che si riflettono nelle funzioni da esse svolte e, pertanto, svolge un ruolo chiave nello sviluppo di numerose patologie cronico-degenerative come il diabete, l'obesità e le patologie cardiovascolari, e nell'invecchiamento (Voyer L.E. and Alvarado C., 2019; Tessier F.J., 2010).

La reazione di glicazione non enzimatica che porta alla formazione degli AGE consta di tre fasi:

- 1) la condensazione degli zuccheri riducenti con i gruppi amminici dei residui di lisina delle proteine porta alla formazione di una base di Schiff che si riorganizza in una chetoamina più stabile denominata prodotto di Amadori
- 2) il prodotto di Amadori, attraverso riarrangiamenti, viene degradato a composti carbonilici reattivi, quali il gliosale, il metilgliosale e il deossiglucosone, che fungono da propagatori della reazione;
- 3) questi ultimi reagiscono con nuovi gruppi amminici liberi delle proteine portando alla formazione degli AGEs (Figura 7);

Come prodotti introdotti con la dieta, oltre agli zuccheri riducenti, anche altre sostanze sono in grado di generare gli AGE, tra questi l'ascorbato, altri carboidrati (fruttosio, galattosio, ecc.) e sostanze esogene che si formano negli alimenti utilizzati nelle diete occidentali trattati con il calore (reazione di Maillard) (Chuyen N.V., 2006).

La glicazione non enzimatica delle proteine e la formazione di AGE avvengono in vivo. La loro formazione aumenta in condizioni patologiche, soprattutto nel diabete, ma anche in tutte le patologie associate al danno ossidativo. Durante il processo di glicazione si ha la produzione di ROS: infatti, gli zuccheri riducenti e i prodotti di Amadori possono andare incontro ad autossidazione portando

alla formazione di anione superossido, radicali idrossilici, perossido di idrogeno, inoltre nelle prime fasi della glicazione, i prodotti di Amadori e le basi di Schiff sono suscettibili all'ossidazione, incentivando la formazione di dicarbonili reattivi, come il metilgliossale.

Per la stretta relazione tra stress ossidativo e produzione di AGEs, si parla di glico-ossidazione. La glico-ossidazione, quindi, rappresenta un comune pathway che porta non solo alle complicazioni del diabete, ma anche ad una serie di molteplici patologie cronico-degenerative come l'obesità, le patologie cardiovascolari e l'invecchiamento (Zhang et al., 2009).

Con la glico-ossidazione si innescano una serie di eventi come l'attivazione delle vie: p38 MAPKs per la risposta immunitaria ed antinfiammatoria, PI3K/Akt la via più importante per quanto riguarda la trasmissione di segnali antiapoptotici nella sopravvivenza cellulare, e le MAP chinasi (ERK1/2 MAPK). Quest' ultime sono in grado di attivare, con la fosforilazione di amminoacidi serina o treonina, una serie di fattori di trascrizione, tra cui NF-kB coinvolto nella produzione cellulare di citochine pro-infiammatorie (Sosa et al., 2013).

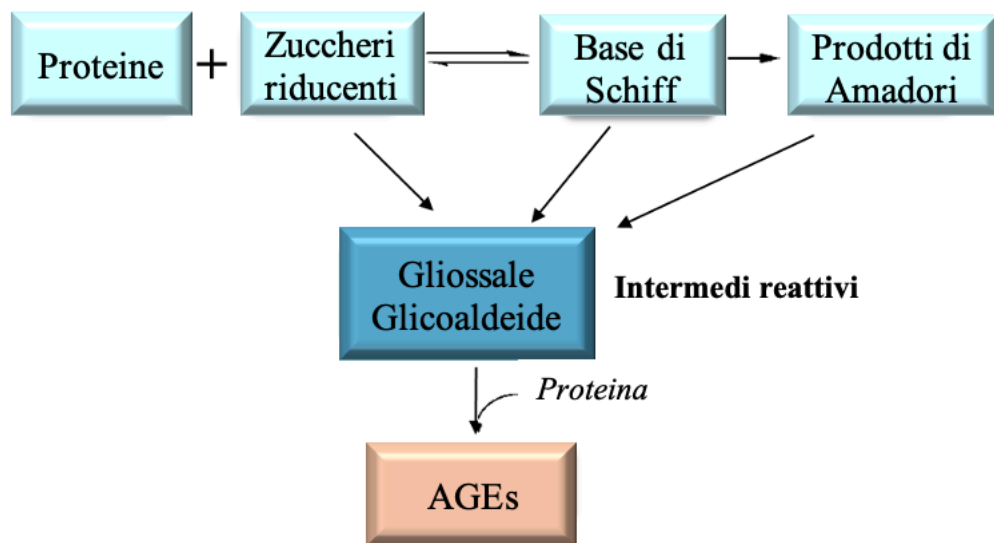


Figura 7. Schema della via biochimica che porta alla formazione degli AGEs. Dalla reazione reversibile tra una proteina e uno zucchero riducente si ottiene una base di Schiff che è un prodotto instabile, la quale, tramite una reazione irreversibile forma i prodotti di Amadori. Questi subiscono riarrangiamenti ad intermedi reattivi che sono i precursori degli AGEs.

2.3 Ruolo fisiopatologico dello stress glico-ossidativo a livello intestinale

Come detto in precedenza, le cellule intestinali sono quelle più esposte agli insulti fisici, ambientali, e biologici, tra i quali iperglicemia, che possono indurre risposte biologiche, che portano a danni cellulari attraverso la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Figura 8). La mucosa intestinale è soggetta ad un elevato stress glico-ossidativo, proprio per la sua continua esposizione alle specie reattive dell'ossigeno (ROS) sia endogene, che esogene, cioè introdotte con la dieta (Halliwell et al., 2000).

Tra i vari fattori nutrizionali che incidono nello sviluppo malattie infiammatorie intestinali (IBDs) 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 (Brownlee M. 2001).

Le IBDs 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 L. and Caruso R.A., 2014).

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 deregolazione del sistema immunitario, lo stress ossidativo e vari fattori ambientali, come l'esposizione ad antibiotici e a farmaci antiinfiammatori, disbiosi e stress (Bennett et al., 1991; Loftus, 2004; Bernstein et al., 2006; Bernstein, 2008; Molodecky N.A. and Kaplan G.G., 2010).

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 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 (O_2^-) prodotto grazie alle numerose cellule fagocitiche presenti. 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.

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-kB) (Brennan et al. 1995). Quando attivato, NF-kB 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 (H_2O_2), anione superossido (O_2^-), radicale idrossile ($\cdot OH$) e acido ipocloroso ($HClO$) e di mediatori infiammatori da parte delle cellule infiammatorie, con conseguente aumento della permeabilità intestinale (Tian et al., 2017).

L'iperglicemia è associata all'aumento di permeabilità con conseguente comparsa di uno stato infiammatorio, che porta all'insorgenza di numerose patologie. Du et al. hanno dimostrato che l'iperglicemia genera un alto potenziale di membrana mitocondriale, pompando protoni attraverso la membrana mitocondriale interna a seguito della sovrapproduzione di donatori di elettroni da parte del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA), causando così un aumento della produzione di superossido dalle cellule (Du et al., 2000). Questa sovrapproduzione di superossido determina una diminuzione

dell'attività del GADPH deviando i metaboliti, tra cui il glucosio, verso vie alternative che portano all'attivazione della proteina chinasi C, alla formazione del metilgliosale (MGO) e dei prodotti di glicazione avanzata (AGE), al flusso di glucosio attraverso la via dei polioli che provoca una deplezione di glutazione (GSH), uno dei principali meccanismi di difesa antiossidanti.

I maggiori danni provocati dagli AGE sono la formazione anomala di legami crociati a livello del collagene, che provoca delle modificazioni tissutali osservate nelle complicanze diabetiche, quali rigidità vascolare e arteriosa, spessore della membrana basale, ma anche nell'invecchiamento, nell'aterosclerosi e nell'osteoartriosi. Inoltre, gli AGE possono interagire con recettori specifici e accumularsi in sede intracellulare (Lapolla et al., 2005).

Per di più, lo stress glico-ossidativo porta delle modificazioni a livello dei mitocondri, che assumono una forma anomala, determinando così una riduzione della produzione di ATP e 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. Vengono richiamate le cellule immunitarie, che rilasciano IL-8 e IL-10 nel lume. In questa condizione infiammatoria, lo strato mucoso si riduce e la produzione di peptidi antimicrobici diminuisce esponendo l'epitelio intestinale ai microrganismi e agli antigeni presenti nel lume, mentre le

interazioni tra le cellule immunitarie e quelle batteriche rilasciano mediatori pro-infiammatori influenzando l'epitelio intestinale in tutte le sue componenti (Novak E.A. and Mollen K.P., 2015).

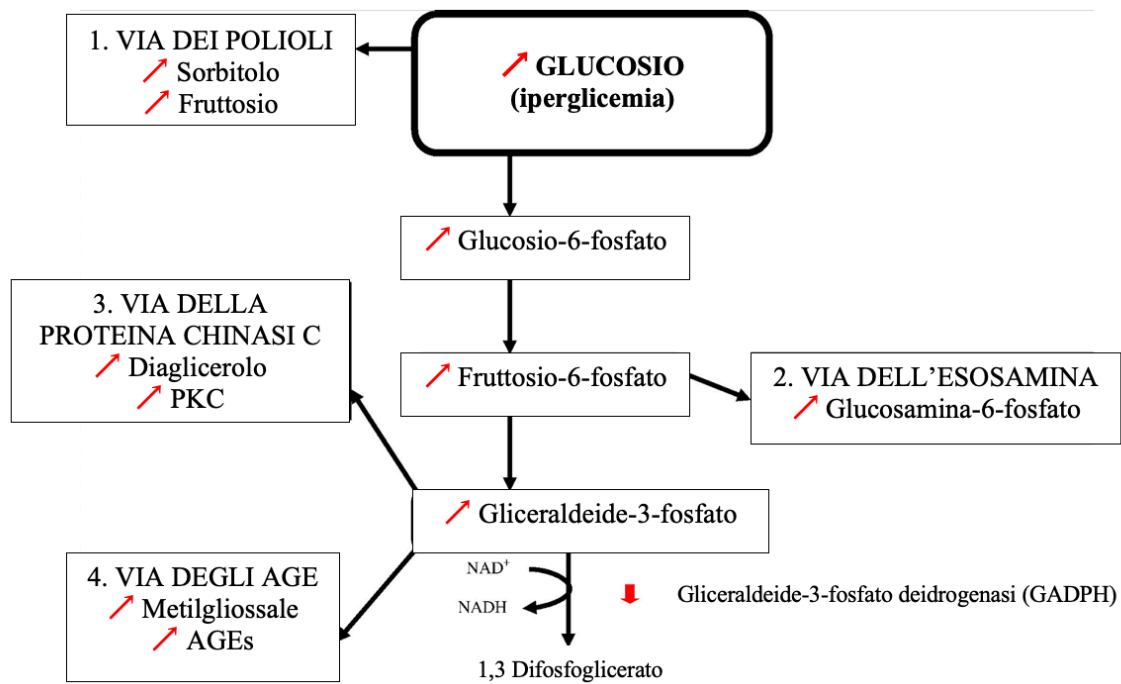


Figura 8. Quattro meccanismi indotti dall'iperglicemia che portano allo stress ossidativo e al danneggiamento tissutale. 1) Via dei polioli; 2) Via dell'esosamina; 3) Attivazione della proteina chinasi C; 4) Via degli AGEs. Fonte: Choi et al., 2007.

2.3.1 Barriera e permeabilità intestinale, tight junction ed effetti correlati alla glico-ossidazione

Il tratto gastrointestinale rappresenta un elemento chiave del sistema immunitario, in quanto deve tollerare la presenza del microbiota del lume, ma anche proteggere la mucosa intestinale da antigeni dietetici potenzialmente dannosi e agenti patogeni invasori.

L'epitelio, presente a livello dei villi intestinali, è formato da un singolo strato di cellule, chiamate enterociti, che hanno il ruolo di formare una barriera fisica e coordinare la difesa immunitaria (Allaire et al., 2018). Tale barriera permette l'assorbimento, la secrezione e il trasporto di acqua, ioni e molecole organiche dal canale digerente al flusso sanguigno. Gli enterociti sono cellule di forma prismatica, nella cui superficie apicale, rivolta verso il lume intestinale, presentano delle estroflessioni chiamate microvilli, che formano l'orletto a spazzola, deputate ad aumentare la superficie di assorbimento dei nutrienti (Figura 9).

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. 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).

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 (Novak E.A. and Mollen K.P., 2015).

Il trasporto transcellulare è altamente regolato da specifiche pompe e canali di membrana, mentre il trasporto paracellulare è custodito dalle giunzioni strette (tight junction, TJ), complessi multiproteici apicali che collegano tra loro gli enterociti e regolano la permeabilità epiteliale e la diffusione di molecole tra le cellule.

Le TJ (Figura 10) sono strutture dinamiche complesse, formate da proteine di barriera transmembrana (claudina, molecole di adesione giunzionale, occludina, tricellulina) e proteine di scaffold citoplasmatiche (Zonula occludens-1, cingulina, afadina), connesse con l'actina, con i microtubuli del citoscheletro e interagenti con altre proteine regolatrici che modulano la

permeabilità attraverso la fosforilazione/espressione delle proteine delle giunzioni.

Una barriera intestinale caratterizzata da una maggiore permeabilità da parte delle TJ verso le sostanze tossiche presenti nel lume che sono libere di raggiungere il torrente ematico causando un'endotossinemia metabolica, che è un segno distintivo di condizioni patologiche, tra cui, appunto, infiammazione, glicco-ossidazione, insulino-resistenza, lipogenesi, fegato grasso e sindrome metabolica (Dokladny et al., 1985).

Nelle cellule intestinali esposte ad alte concentrazioni di glucosio la formazione intracellulare di AGE avviene in circa una settimana e provoca danni modificando le proteine: quelle intracellulari mostrano una funzione alterata, quelle della matrice extracellulare determinano interazioni anomale con altre proteine della matrice e con integrine cellulari, quelle plasmatiche determinano ligandi che si legano al recettore AGE, portando alla produzione di ROS, attivazione del fattore di trascrizione NF-kB e alterazioni patologiche nell'espressione genica, in diversi tipi di cellule (Lapolla et al., 2005) (Figura 11).

A livello intestinale possono svilupparsi alterazioni a livello della barriera intestinale, determinando una perdita di omeostasi e lo scaturire di malattie

infiammatorie come il morbo di Crohn e la colite ulcerosa, che se non trattate possono portare a complicanze più gravi (Novak E.A. and Mollen K.P., 2015).

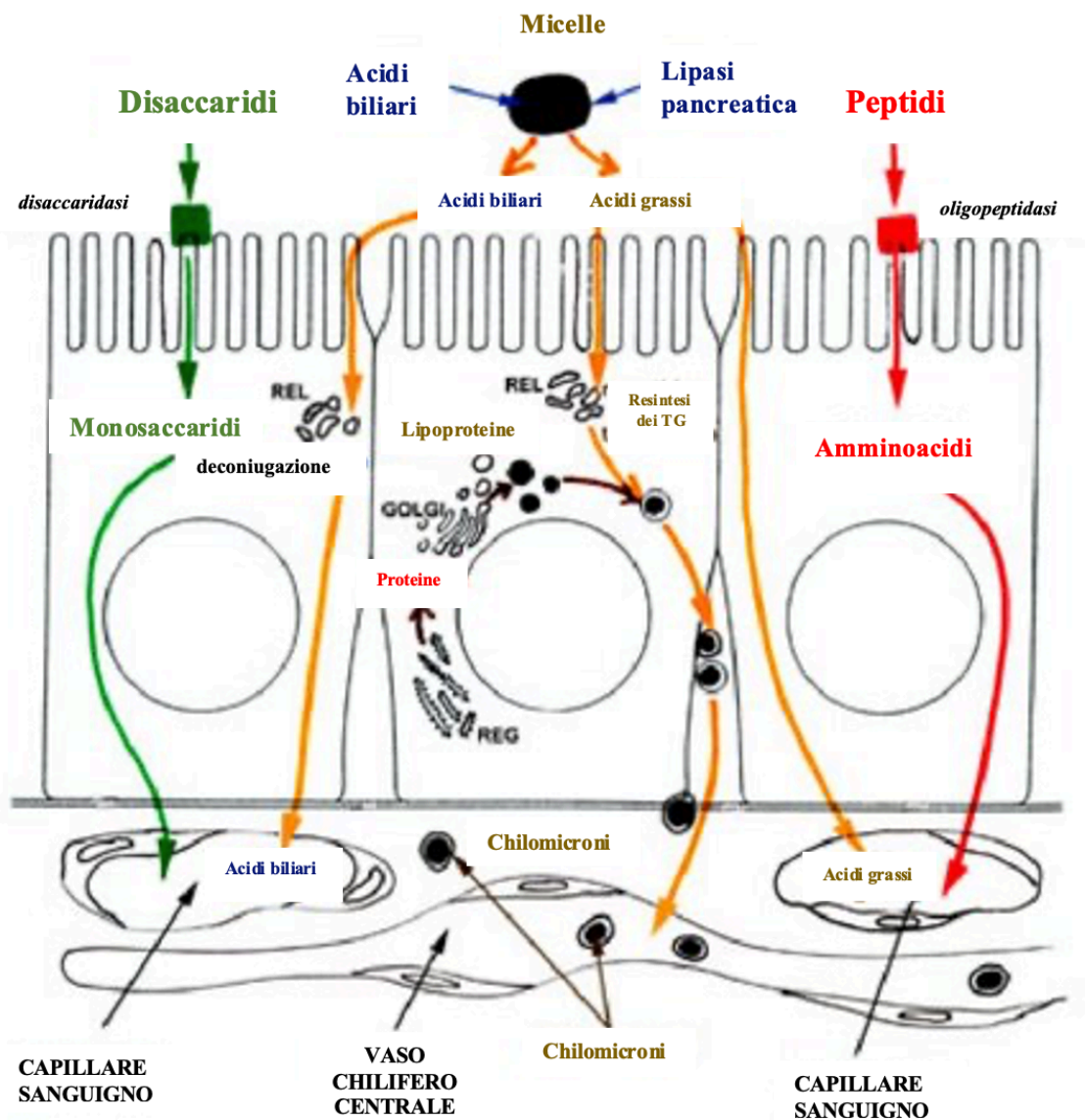


Figura 9. Schema semplificato dell'assorbimento dei nutrienti da parte degli enterociti e il loro trasporto trans-epiteliale. A sinistra è schematizzata la via d'assorbimento dei carboidrati, al centro dei lipidi, a destra delle proteine. Fonte: Waharte F., 2002

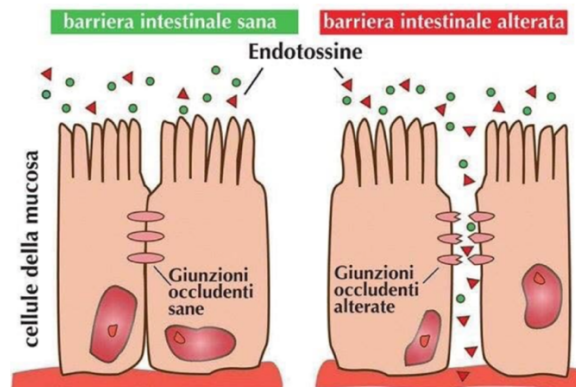


Figura 10. Barriera intestinale formata da enterociti collegati da giunzioni strette. Differenze tra una barriera intestinale fisiologica (sx) ed una barriera in cui le giunzioni strette sono alterate e permettono il passaggio di molecole dal lume intestinale al circolo sanguigno (dx).

Fonte: <https://www.fermentidivita.com/2017/09/22/1087/>

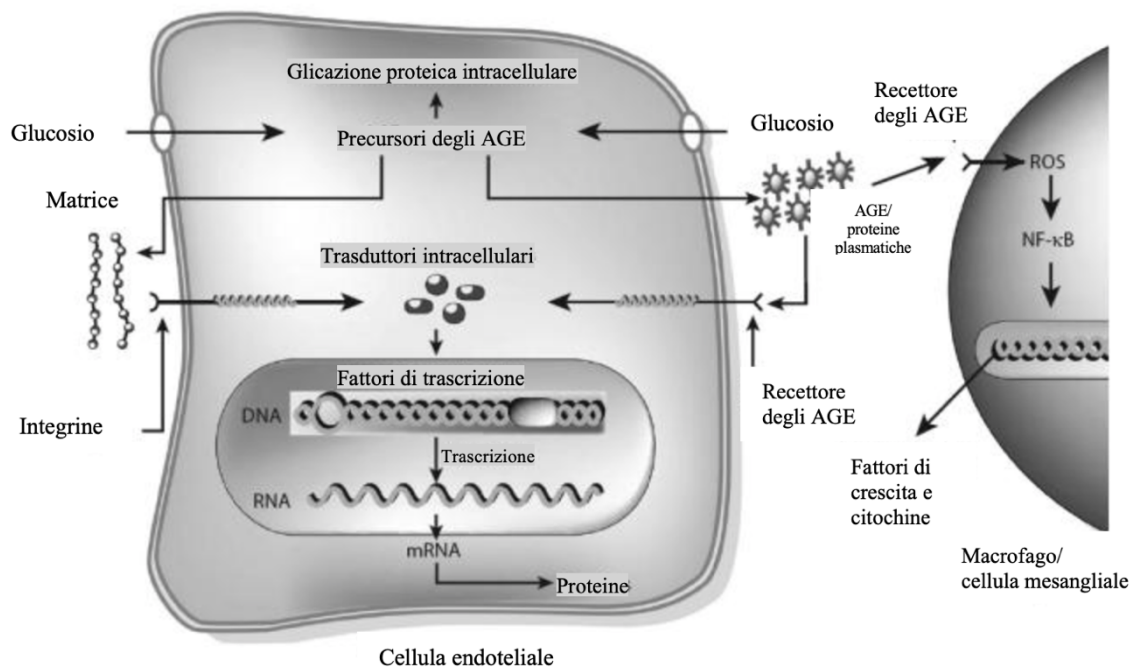


Figura 11. Meccanismo intracellulare di produzione di AGE in condizioni di iperglicemia. La modifica covalente delle proteine intracellulari da parte dei precursori AGE del dicarbonile altera diverse funzioni cellulari. La modifica delle proteine della matrice extracellulare provoca interazioni anomale con altre proteine della matrice e con le integrine. La modifica delle proteine plasmatiche da parte dei precursori degli AGE crea ligandi che si legano ai recettori degli AGE, inducendo cambiamenti nell'espressione genica nelle cellule endoteliali, nelle cellule mesangiali e nei macrofagi.

Fonte: Cumbie and Hermayer, 2007.

2.3.2 GLUT2 e SGLT1: ruoli fisiopatologici correlati all'iperglicemia

La funzione principale dell'intestino tenue è l'assorbimento di nutrienti. Sulla membrana apicale delle cellule epiteliali del piccolo intestino, il glucosio viene assorbito tramite (SGLT1) e il trasportatore GLUT2.

Tuttavia, pochi lavori hanno affrontato l'effetto dello stress ossidativo su assorbimento cellulare del glucosio e non si sa nulla riguardo le conseguenze di un aumento dei livelli di stress ossidativo per l'assorbimento intestinale di glucosio e fruttosio. Diversi studi hanno dimostrato che i ROS possono interferire con l'attività dei trasportatori di membrana, ma molto poco è stato scoperto in relazione all'effetto dello stress ossidativo sull'assorbimento intestinale degli zuccheri (Andrade et al., 2018).

I trasportatori del glucosio sono un insieme di proteine transmembrana che consentono il passaggio del glucosio attraverso la membrana plasmatica mediante trasporto passivo o diffusione facilitata. Gli amminoacidi componenti il trasportatore sono disposti in modo da formare un canale con i residui idrofili orientati verso l'interno. Nell'uomo esistono 12 tipi di trasportatori. L'isoforma del trasportatore del glucosio GLUT2 (Figura 12) è espressa nelle cellule di tessuti quali intestino, fegato, reni, pancreas e sistema nervoso centrale.

La sua espressione è necessaria per il controllo fisiologico dei geni sensibili al glucosio; infatti, una sua inattivazione nel fegato porta ad una ridotta secrezione

di insulina stimolata dal glucosio; nel SNC controlla l'alimentazione e la termoregolazione; nel pancreas è correlato con una corretta funzione delle cellule beta; nel circolo ematico consente la rimozione del glucosio in eccesso dal sangue.

Avendo una K_m relativamente alta, il trasportatore ha massima velocità solo quando la concentrazione ematica del glucosio è elevata, quindi dopo i pasti, in modo da non sottrarre nutrimento nei periodi di digiuno ai tessuti che richiedono il glucosio come fonte di energia anche quando si è a digiuno (SNC). A livello intestinale, infatti, lo possiamo trovare espresso sia a livello della membrana basolaterale, in caso di digiuno, per consentire l'ingresso di glucosio dal circolo ematico all'enterocita, sia nella membrana apicale, come ad esempio dopo un pasto ricco di zuccheri, per permettere l'assorbimento del glucosio dal lume intestinale verso il circolo ematico (Kellett G.L. and Brot-Laroche E., 2005) (Figura 13).

È stato dimostrato, inoltre, che difetti genetici o mutazioni del gene del GLUT2 (SLCA2) possono causare diabete neonatale transitorio, transizione al diabete di tipo 2, rischio di iperglicemia a digiuno, ipercolesterolemia e malattie cardiovascolari (Thorens B., 2015).

Thaiss et al., attraverso il loro studio hanno dimostrato che in modelli murini di obesità e diabete, l'iperglicemia altera la permeabilità della barriera

intestinale attraverso la riprogrammazione trascrizionale GLUT2-dipendente delle cellule epiteliali intestinali e l'alterazione dell'integrità delle giunzioni strette e aderenti. Di conseguenza, i topi avevano un afflusso sistemico di prodotti microbici e una maggiore diffusione dell'infezione enterica (Thaiss et al., 2018).

SGLT1 (Figura 14) è il trasportatore del glucosio, una proteina integrale di membrana codificata dal gene SLC5A1, presente a livello dell'orletto a spazzola dei villi intestinali e nella membrana basolaterale delle cellule del tubulo prossimale del nefrone. Permette il passaggio di glucosio dal compartimento extracellulare a quello intracellulare sfruttando il gradiente elettrochimico del sodio (2Na^+ , rapporto 2:1), che esce dalle cellule mediante una pompa Na^+/K^+ e successivamente rientra in simporto con il glucosio attraverso il trasportatore (Turk et al., 1994) (Figura 15).

A livello del rene è deputato quindi al completo riassorbimento del glucosio filtrato; tuttavia, in caso di iperglicemia, il glucosio in eccesso viene eliminato attraverso le urine in quanto il trasportatore SGLT1 viene saturato e si crea una condizione di glicosuria. In condizioni normali, infatti, questo zucchero non è presente nelle urine e la sua presenza riscontrata a seguito di un'analisi è indice di una possibile condizione diabetica.

È stato dimostrato che l'inibizione di SGLT1 abbassa i livelli glicemici attraverso la limitazione dell'assorbimento intestinale e del riassorbimento renale di glucosio, determinando l'escrezione del glucosio attraverso le urine. Nell'intestino tenue SGLT1 trasporta glucosio e galattosio attraverso la membrana apicale degli enterociti. È interessante notare che la sua inibizione riduce e ritarda l'escursione del glucosio dopo l'ingestione di carboidrati e aumenta il rilascio di glucagon like peptide-1 (GLP-1) da parte delle cellule L dell'intestino e del peptide YY (PYY), contribuendo al loro effetto ipoglicemizzante (Lehmann A. and Hornby P.J., 2016).

Infatti, alcuni farmaci somministrati ai pazienti diabetici (Canagliflozin, Sotagliflozin), hanno come target l'inibizione del trasporto del glucosio mediato da SGLT1 ed oltre all'effetto ipoglicemizzante hanno altri ruoli benefici: possono proteggere il tessuto cardiaco riducendo l'accumulo di glicogeno e diminuire la produzione di ROS. Tuttavia, non mancano effetti collaterali quali diarrea, deplezione di volume, mancata correzione delle ipoglicemie e predisposizione alla chetoacidosi diabetica (Tsimihodimos et al., 2018).

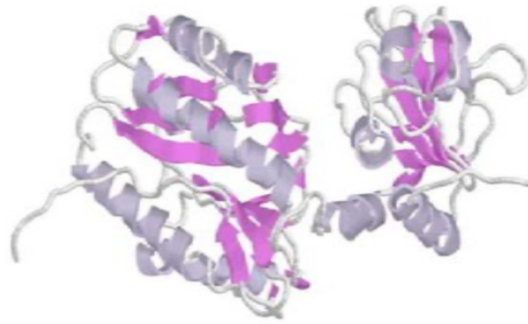


Figura 12. Struttura cristallina del trasportatore del glucosio 2 (GLUT2).

Fonte:

https://www.researchgate.net/publication/215623442_Probing_the_structure_of_human_glucose_transporter_2_and_analysis_of_protein_ligand_interactions/figures?lo=1

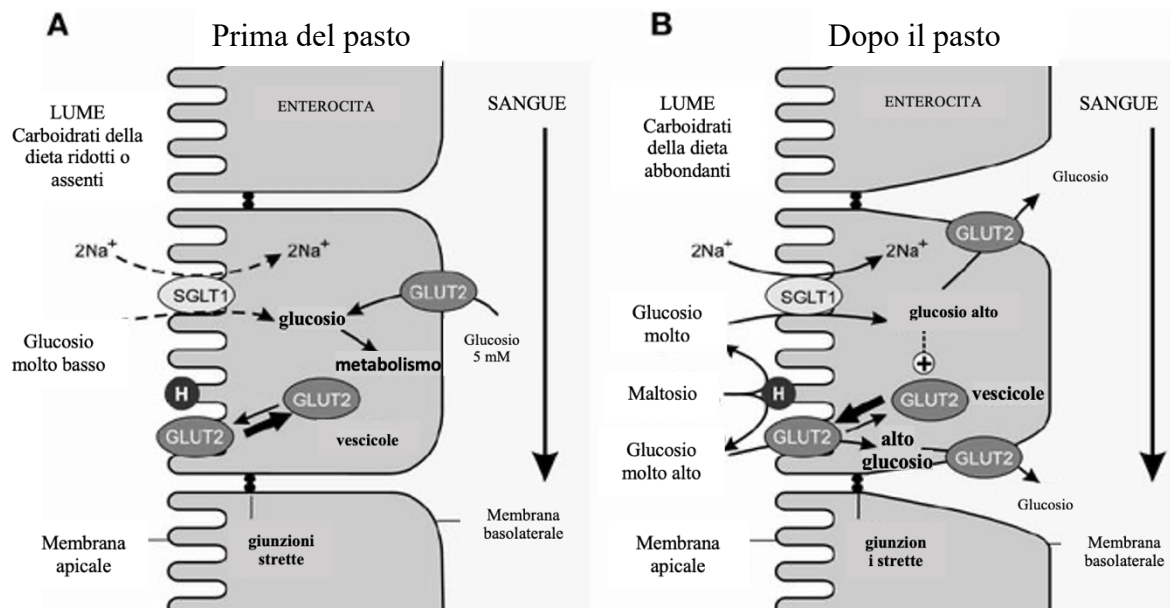


Figura 13. Modello del GLUT2 dell'assorbimento intestinale di glucosio prima (A) e dopo (B) il pasto. Fonte: Kellett G.L. and Brot-Laroche E., 2005

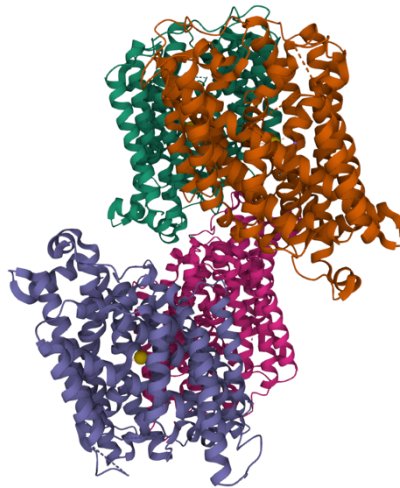


Figura 14. Struttura cristallina del trasportatore del glucosio SGLT1.
 Fonte: <https://www.rcsb.org/structure/3DH4>

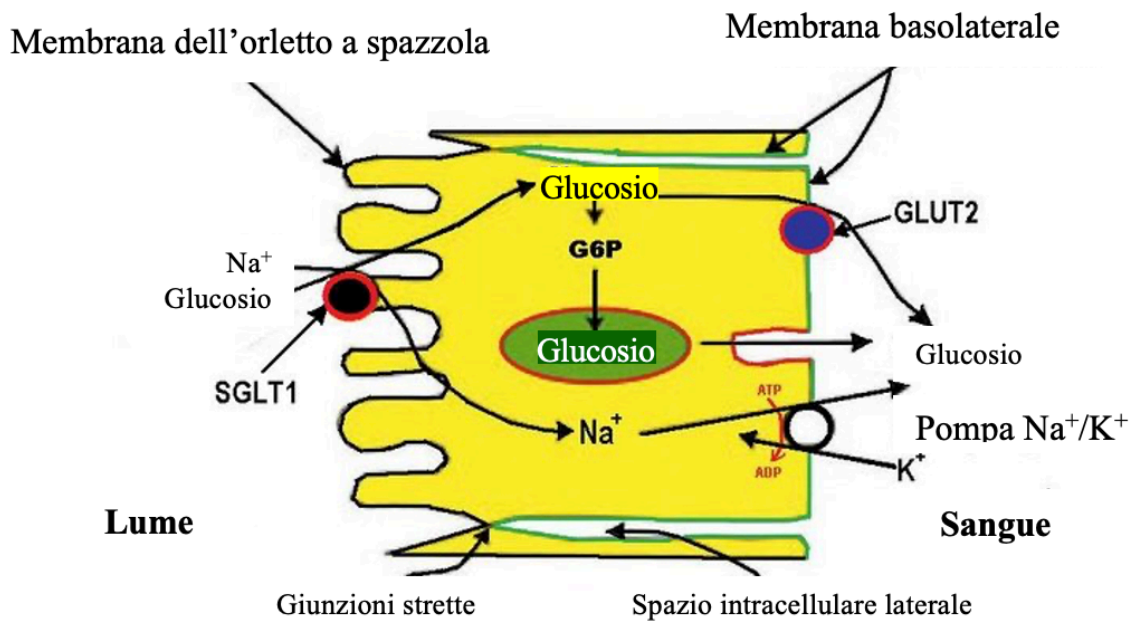


Figura 15. Ruolo di SGLT1 nell'assorbimento del glucosio (e galattosio) attraverso l'enterocita dei villi dell'intestino tenue. Fonte: Sopjani M., 2010.

2.4 Meccanismi di difesa e antiossidanti

Lo stress ossidativo indica una condizione patologica, in un organismo vivente, causata dalla rottura dell'equilibrio fisiologico fra la produzione e l'eliminazione di specie chimiche ossidanti, da parte dei sistemi di difesa antiossidanti.

Gli antiossidanti sono sostanze chimiche o agenti fisici che prevengono l'ossidazione di altre sostanze, sono quindi agenti riducenti coinvolti nell'omeostasi redox. Tra questi vi sono numerosi sistemi che permettono all'organismo di difendersi dai radicali in eccesso che si formano a seguito dello stress ossidativo.

Gli organismi hanno sviluppato un sistema di difesa antiossidante che può essere suddiviso in:

- difese antiossidanti di natura enzimatica e no, che interagiscono direttamente con i radicali liberi;
- complessi metalloproteine/enzimi (come ferritina e transferrina) che riducono la partecipazione di metalli pesanti (come ferro e rame) alla formazione di ROS;
- sistemi che riparano biomolecole dopo che sono state danneggiate dai ROS come polimerasi, lipasi e proteasi.

I sistemi enzimatici principalmente coinvolti sono il superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT) e il glutazione perossidasi (GPx) e la famiglia delle Paraoxonasi (PON).

Ci sono inoltre sostanze di origine alimentare, introdotte con la dieta che sono in grado di reagire con i radicali liberi. Tra le vitamine, quelle con il maggiore potere antiossidante sono le vitamine C (acido ascorbico) ed E (tocoferolo). La vitamina C (Figura 16) è un una vitamina idrosolubile essenziale per l'uomo in quanto deve essere introdotto con la dieta; la troviamo specialmente negli agrumi e in molti altri frutti e ortaggi. Viene mantenuta in forma ridotta all'interno delle cellule per reazione con il glutazione ed esercita il suo potere antiossidante riducendo i ROS e ossidandosi di conseguenza. È il principale antiossidante nel compartimento acquoso (Padayatty et al., 2003).

Invece, la vitamina E (Figura 17) fa parte di quelle vitamine liposolubili che proteggono le membrane cellulari dall'ossidazione, reagendo con i radicali lipidici prodotti durante la perossidazione lipidica, impedendo la propagazione della reazione (Herrera E. and Barbas C., 2001). La forma ossidata, ovvero il radicale tocoferossile, può essere nuovamente riconvertito a tocoferolo per azione con ascorbato, retinolo o ubiquinone (Wang X. and Quinn P., 1999).

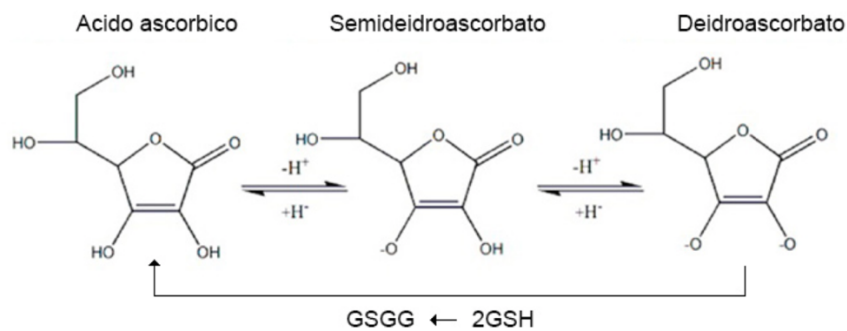


Figura 16. Vitamina C nelle tre diverse forme in si trova nell'organismo: dalla forma ridotta a quella completamente ossidata. La rigenerazione avviene a spese del glutathione, (2GSH), che fornisce i due elettroni necessari per riconvertire il deidroascorbato ad acido ascorbico.

Fonte: <https://www.mauriziotommasini.it/vitamina-c-proprieta-benefici-salute/>

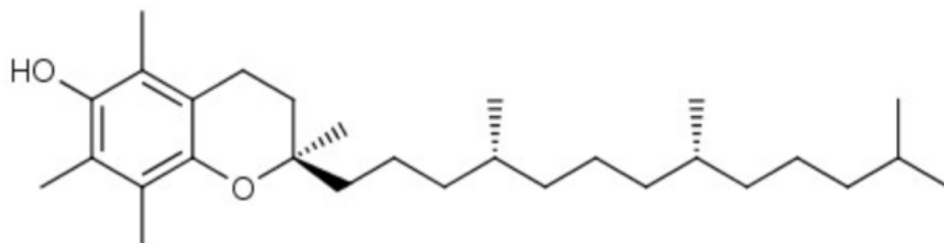


Figura 17. Formula chimica dell' α -tocoferolo.

Fonte: <https://www.cosmetimag.it/vitamina-e-nei-cosmetici/>.

2.4.1 Paraoxonasi-2: il suo ruolo antiossidante a livello intestinale

La paraoxonasi-2 (PON2) è un enzima di 39 kDa, di 354 amminoacidi, appartenente alla classe delle paraoxonasi, enzimi con attività di idrolasi verso una grande varietà di substrati (lattoni, tiolattoni, carbonati, esteri, fosfotriesteri, fosfolipidi ossidati); ne esistono 3 forme: la paraoxonasi-1 è principalmente espressa nel fegato ed ha un importante ruolo antiossidante e di contrasto verso l'aterosclerosi; la paraoxonasi-3 è molto simile a quella di tipo 1, ma ha attività più bassa ed agisce su substrati diversi; la paraoxonasi-2 è di tipo ubiquitario e protegge le cellule dal danno ossidativo e dall'apoptosi (Mackness et al., 2010).

Le PON (Figura 18) sono enzimi calcio-dipendenti localizzati a livello intracellulare nella membrana plasmatica, reticolo endoplasmatico, involucro nucleare e membrana mitocondriale interna.

La PON2 è ampiamente espressa nelle cellule del tratto digestivo, in quanto agisce da enzima antiossidante per contrastare i processi infiammatori che porterebbero a danni alla mucosa intestinale e all'insorgenza di malattie croniche intestinali (IBD) (Sanchez et al., 2006). Inoltre, risulta avere anche proprietà antiapoptotiche; ciò è stato correlato al suo ruolo di modulazione sul rilascio del citocromo c dai mitocondri e all'attivazione delle caspasi, che sono enzimi pro-apoptotici (Altenhofer et al., 2010; Witte et al., 2012).

Il silenziamento della PON2 predispone le cellule alla perossidazione lipidica e allo sviluppo di una risposta infiammatoria esacerbata nelle cellule epiteliali intestinali. Precourt et al., nel loro studio, hanno mostrato le conseguenze dell'inattivazione della PON2 nelle cellule epiteliali, utilizzando la linea Caco-2 come modello sperimentale: risposte antiossidanti squilibrate caratterizzate dall'aumento della superossido dismutasi e diminuzione della catalasi; alte concentrazioni di H₂O₂ e malondialdeide, insieme a basso rapporto glutatione/glutazione disolfide; sovraregolazione dell'espressione genica del TNF- α , IL-6 e della proteina-1 chemiotattica dei monociti a seguito dell'induzione dello stress ossidativo; aumento del livello di attivazione di NF- κ B, implicato nell'attivazione della risposta infiammatoria (Precourt et al., 2012).

In un altro studio, è stato dimostrato che anche l'esposizione cronica indotta dal glucosio contribuisce all'aumento dello stress e della produzione di ROS in quanto induce una downregolazione dell'espressione della PON2 a livello del suo mRNA, con conseguente diminuzione dell'attività enzimatica nei macrofagi e monociti (Yehuda et al., 2011); tuttavia l'espressione della PON2 a livello delle cellule intestinali in condizioni di iperglicemia è finora ignoto.

Al contrario, l'aggiunta di PON2 purificato alle cellule Caco-2 intestinali permeabilizzate riduce la perossidazione lipidica dopo l'induzione di stress ossidativo (Bourquard et al., 2011).

Per quanto riguarda i meccanismi d'azione, questi non sono stati ben determinati, in quanto non è stato ancora identificato il substrato fisiologico su cui agiscono. Di conseguenza, per i saggi sull'attività della PON sono stati usati vari substrati sintetici ed è stato osservato che la PON2 idrolizza preferenzialmente N-acil-omoserina lattoni, che vengono prodotti da specie batteriche.

Il ruolo antiossidante sembra essere correlato all'attività dell'enzima nel mitocondrio, dove la PON2 si trova associata al complesso III della catena respiratoria e al coenzima Q10, attraverso un legame calcio-dipendente, prevenendo la formazione dell'anione superossido e diminuendone il rilascio sia dal complesso I che del complesso II a livello della membrana mitocondriale interna (Altenhofer et al., 2010).

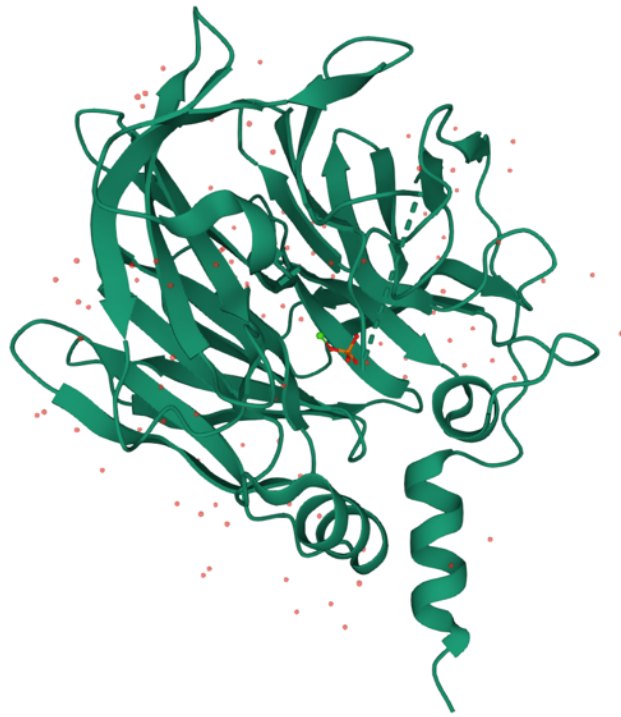


Figura 16. Struttura cristallina della Paraoxonasi.

Fonte: <https://www.rcsb.org/structure/1V04>

2.5 Fattori che contrastano e prevengono la glico-ossidazione: il ruolo dei polifenoli

2.5.1 I polifenoli e la loro attività biologica

I polifenoli rappresentano una delle principali classi di metaboliti secondari e comprendono un ampio spettro di sostanze molto eterogenee, ma tutte caratterizzate dalla presenza di un anello aromatico con uno o più sostituenti ossidrilici. Possono essere suddivisi in diverse sottoclassi in base al numero di anelli fenolici presenti nella loro struttura, agli elementi strutturali che legano questi anelli tra di loro, e ai sostituenti legati agli anelli.

Possono quindi essere individuati due grandi gruppi: i flavonoidi, caratterizzati da una struttura C6-C3-C6 ed i non flavonoidi (Di Lorenzo et al., 2021).

Sono stati identificati più di 6000 flavonoidi che possono essere ulteriormente suddivisi in 6 sottoclassi principali, in funzione del tipo di eterociclo coinvolto (Dixon R.A. and Pasinetti G.M., 2010) (Figura 19, 20).

Tra i non flavonoidi si individuano vari composti, tra cui gli acidi fenolici, aldeidi benzoiche, tannini, acidi idrossicinnamici, cumarine, stilbeni, lignani. Dagli acidi fenolici troviamo le sottoclassi derivati dagli acidi idrossibenzoici come acido gallico, e quelli derivati da acido idrossicinnamico contenente caffeico, ferulico e acido cumarico (Di Lorenzo et al., 2021).

Si è sviluppata notevolmente la ricerca riguardante gli effetti sulla salute umana dei polifenoli naturali assunti nella dieta. Fino alla metà degli anni '90, i composti della dieta di maggiore interesse erano soprattutto vitamine, carotenoidi e minerali. La ricerca sui flavonoidi e altri polifenoli in relazione ai loro effetti sulla prevenzione di alcune patologie ha avuto grande sviluppo solo in seguito. I principali fattori che hanno ritardato la ricerca su tali molecole risiedono soprattutto nella loro grande diversità e nella complessità delle loro strutture chimiche (Scalbert, A. and Zamore-Ros R., 2005).

I polifenoli introdotti con la dieta possono contribuire ad incrementare le difese antiossidanti naturali ed esercitare un ruolo protettivo nei confronti dei radicali liberi e dello stato infiammatorio responsabili della insorgenza di numerose patologie associate al danno ossidativo (obesità, diabete, ipertensione, sindrome metabolica, patologie cardiovascolari) e dell'invecchiamento (Di Lorenzo et al., 2021).

A tale scopo, in vivo, queste molecole devono essere biodisponibili, ossia devono essere assorbite e devono raggiungere elevate concentrazioni nella corretta forma metabolica. Pertanto, gli effetti positivi, legati al consumo di mele, ad esempio, dipendono dalla biodisponibilità dei fitonutrienti contenuti in questo frutto. La biodisponibilità, generalmente bassa, può essere influenzata da fattori intrinseci all'alimento e all'organismo umano quali

l'efficienza del processo digestivo, la composizione della microflora intestinale, l'assorbimento intestinale e il metabolismo post-assorbitivo (Di Lorenzo et al., 2021).

Una volta resi biodisponibili, i polifenoli svolgono la loro attività biologica attraverso numerosi meccanismi.

I polifenoli possono esercitare un'azione scavenging diretta contro i ROS e i RNS reagendo con radicali liberi come ossidrile, superossido, ossido nitrico, radicali alcossilici e perossidici, perossinitrito e ipoclorito. La loro attività di scavenging è attribuita principalmente alla presenza del legame all'anello benzenico dei gruppi idrossilici che sono in grado di donare o un idrogeno o un singolo elettrone al ROS, e stabilizzare la specie reattiva.

I polifenoli possono svolgere anche un'azione inibitoria diretta sulla formazione metallo-dipendente dei radicali liberi, chelando appunto ioni come il Fe^{++} e il Cu^{++} e sugli enzimi che producono ROS (Yahfoufi et al., 2018) (Figura 21).

Gli ioni metallici quali ferro o rame sono potenti pro-ossidanti che accelerano l'energia di attivazione delle reazioni di iniziazione dell'ossidazione lipidica, generando radicali alchilici a partire da acidi grassi o inducendo la formazione di ossigeno; i metalli, inoltre, perpetuano l'ossidazione lipidica, producendo radicali liberi attraverso la reazione di Fenton (tale reazione è la principale via

di formazione di radicali alcossilici, che sono i più reattivi e pericolosi ROS dei sistemi biologici).



I polifenoli prevengono la formazione di radicali liberi agendo da agenti chelanti dei metalli (Yahfoufi et al., 2018; Cheng et al., 2017).

Recenti studi hanno evidenziato come alcuni polifenoli siano in grado di svolgere la loro azione antiossidante inibendo l'attività di enzimi che generano ROS. Un esempio è la capacità consolidata di alcuni flavonoidi (quali apigenina, luteolina, kaempferolo) di agire come inibitori competitivi della xantina ossidasi (XO), implicata nel danno ossidativo ai tessuti. Alcuni flavonoidi, come apocinina ed epicatechina, sono noti per inibire l'attività di NADPH ossidasi, (NOX) interferendo con la formazione o inibendo l'espressione delle sue diverse subunità. Cianidina, cianidina-3-glucoside e curcumina sono noti per inibire la monoamino-ossidasi mitocondriale (MAO), correlata con numerose patologie come Parkinson e l'Alzheimer (Mathew et al., 2014).

Particolarmente importante, come fonte generatore di radicali liberi, sono i complessi I (NADH: ubichinone ossido riduttasi) e III (ubichinolo:citocromo c ossidoreduttasi), ETC (catena trasporto di elettroni), in quanto questi complessi enzimatici sono generalmente considerati i due principali produttori di anioni

superossido all'interno dei mitocondri. Recenti evidenze indicano che, agendo a livello dei complessi ETC, alcuni polifenoli come flavonoli, flavoni e stilbeni (es. resveratrolo) potrebbero potenzialmente modulare la velocità di produzione di superossido mitocondriale, stimolando la biogenesi mitocondriale che riduce il flusso di elettroni per unità di mitocondri, e accelerando la disintossicazione da ROS potenziando l'espressione di SOD (Xia et al., 2017).

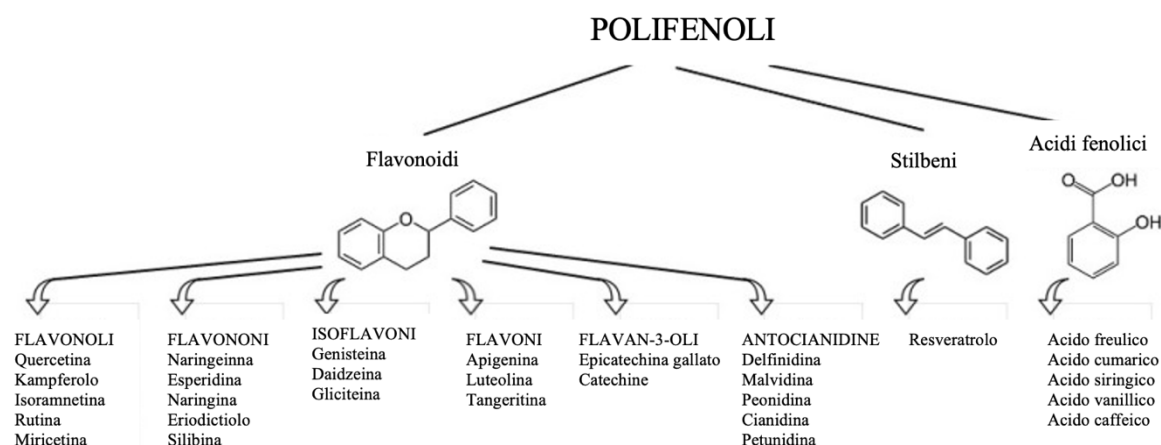


Figura 19. Classificazione dei polifenoli e strutture chimiche di alcuni principali composti. Fonte: Di Lorenzo et al., 2021.

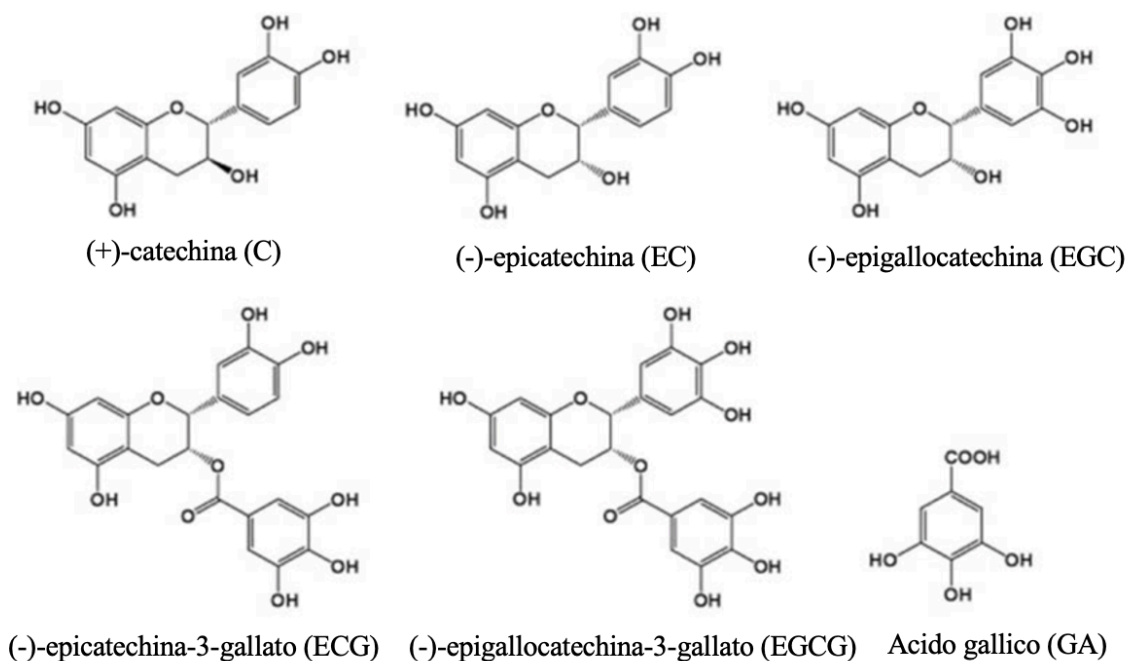


Figura 17. Struttura di alcuni dei principali polifenoli. Fonte: Polifenoli, biodisponibilità e nutrizione di Grosso A. e Marra M.

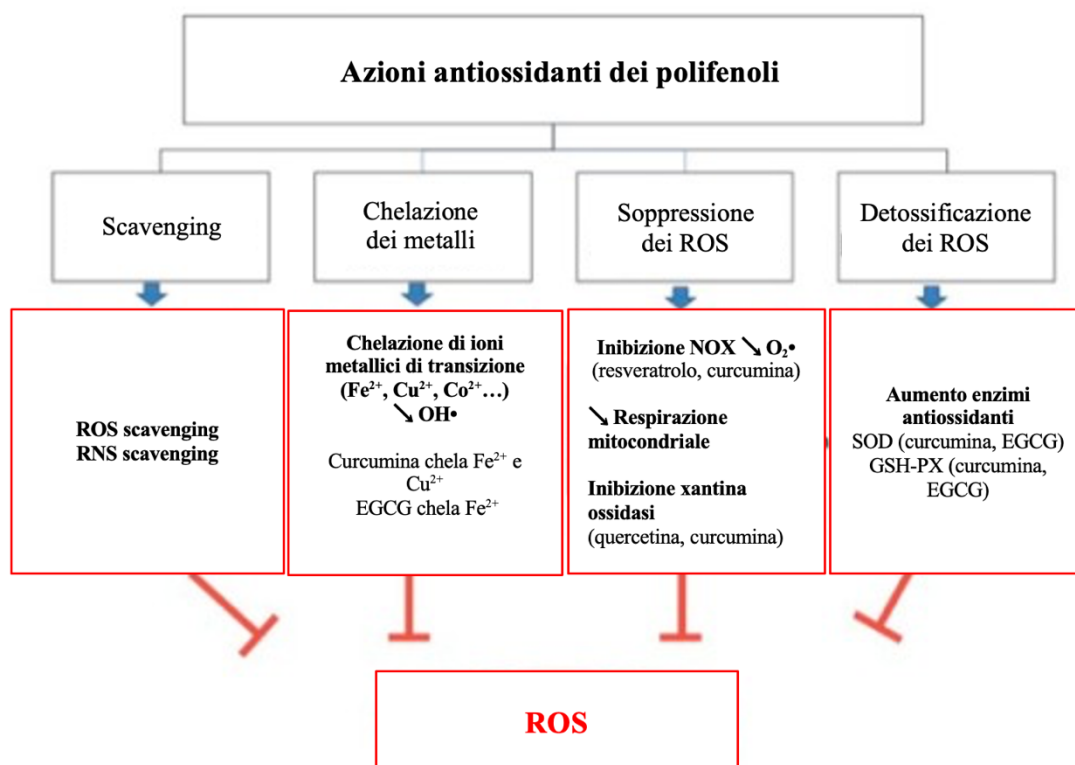


Figura 21. Principali azioni antiossidanti polifenoliche in relazione all'infiammazione. I polifenoli eliminano i radicali, chelano ioni metallici, inibiscono la produzione di ROS e ne promuovono la disintossicazione. ROS: specie reattive dell'ossigeno; RNS: specie reattive dell'azoto; NOX: NADPH ossidasi; SOD: superossido dismutasi; GSH-PX: glutazione perossidasi; EGCG: epigallocatechina gallato. Fonte: Yahfoufi et al., 2018.

2.5.2 I polifenoli ed il loro ruolo nella glicazione non enzimatica

Recenti studi hanno dimostrato che i polifenoli possono svolgere un ruolo protettivo importante nei confronti della glico-ossidazione. Tali studi sono stati condotti in vitro, utilizzando numerosi modelli sperimentali come amminoacidi, proteine isolate, in particolare l'albumina o lipoproteine plasmatiche, e simulando le condizioni di un ambiente iperglicemico. È emerso che gran parte dei composti fenolici, come gli acidi fenolici (acido caffeico, acido clorogenico, ferulico), i flavonoidi e le antocianine svolgono un ruolo protettivo nei confronti della glicazione non enzimatica e hanno un effetto inibitorio sull'ossidazione delle LDL (Cai et al., 2018; Sarmah et al., 2021; Khan et al., 2020).

Esiste una relazione tra la struttura (Figura 22) e l'azione protettiva: l'idrossilazione dei flavonoidi, ovvero l'aggiunta dei gruppi -OH ad un atomo di carbonio a livello dell'anello della molecola, influenza l'attività inibitoria sulla formazione degli AGE, infatti i flavonoidi con più gruppi ossidrilici hanno la più alta capacità di inibizione. Allo stesso modo, anche il tipo di struttura può andare ad influenzare la chelazione degli ioni ferro e rame (Rice-Evans et al, 1996).

La metilazione (aggiunta del gruppo metilico -CH₃) e la metossilazione (aggiunta di un gruppo metile legato all'ossigeno, -OCH₃) dei gruppi ossidrilici

dei flavonoidi aumentano il loro adsorbimento a livello gastrointestinale e migliorano la loro biodisponibilità, stabilità metabolica e trasporto di membrana a livello dell'intestino e del fegato, ma riducono l'attività di inibizione della formazione degli AGE (Walle T, 2007; Wen et al., 2017).

Le caratteristiche essenziali dei polifenoli coinvolti in questi meccanismi sono il doppio legame C2-C3 e il numero e la posizione dei gruppi ossidrilici, glicosilico e O-metilico. Questi fattori inducono un cambiamento nella planarità molecolare che interferisce con la formazione del legame idrogeno, la delocalizzazione degli elettroni e la chelazione di ioni metallici (Crascì et al., 2018).

È stato dimostrato che l'idrossilazione sia sull'anello A che B migliora l'attività inibitoria, mentre sull'anello C la riduce, e questo significa che i flavoni sono maggiori inibitori rispetto ai loro corrispondenti flavonoli. In particolare, il doppio legame C2-C3 migliora l'attività antiossidante e l'inibizione delle metalloproteinasi della matrice (MMP), enzimi che degradano la matrice extracellulare e controllano i processi infiammatori e tumorali, permettendo il passaggio di cellule e leucociti che vanno ad invadere i tessuti. Al contrario, la metilazione riduce l'attività inibitoria, così come la glicosilazione degli ossidrilici (Rice-Evans et al, 1996; Crascì et al., 2018).

Alcuni studi sono stati condotti utilizzando culture cellulari come modello per investigare le proprietà protettive dei polifenoli contro la glico-ossidazione. Utilizzando colture cellulari di condrociti, ossia cellule del tessuto cartilagineo, è stato dimostrato che i prodotti finali della glicazione avanzata (AGEs) inducono la produzione di citochine proinfiammatorie e MMP, molecole che hanno un ruolo chiave nella morfogenesi del tumore, nel rimodellamento tissutale e nell'insorgenza dell'osteoartrite (OA) (Rasheed Z. and Haqqi T.M., 2008; Sternlicht M.D. and Werb Z., 2001). La presenza di polifenoli come EGCG (trattamenti da 25 a 200 μ M) era in grado di sopprimerne l'espressione del fattore di necrosi tumorale (TNF) e delle MMPs, indotta da AGE (AGE-BSA trattamenti da 20 a 600 mg/ml) nei condrociti umani. Questi effetti erano associati all'inibizione del complesso MAP-chinasi (MAPK) e al blocco del fattore di trascrizione NF-kB (Rasheed Z. et al, 2009).

Uno studio condotto sulla linea cellulare HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) ha confermato gli effetti benefici di estratti di polifenoli di semi di uva (proanthocyanidin - GSPE) nei confronti della glico-ossidazione. Le cellule sono state preincubate in assenza (controllo) o in presenza di polifenoli a diverse concentrazioni (10 mg/L, 50 mg/L, e 100 mg/L) per 4 ore prima di essere trattati con 200 mg/L AGE-BSA per 24 ore. I risultati hanno mostrato che GSPE riduce significativamente l'espressione di VCAM-1

(Vascular cell adhesion protein 1) coinvolta nell'adesione di linfociti, monociti eosinofili e basofili nell'endotelio vascolare. I polifenoli, inoltre, hanno inibito l'espressione di RAGE (recettore per gli AGE) attivato dalla concentrazione di AGEs (Ma et al., 2007).

Studi più recenti, svolti sulla linea cellulare di fibrosarcoma umano HT1080, hanno confermato che anche i polifenoli presenti nell'estratto di *Posidonia oceanica* erano in grado di diminuire l'espressione genica e proteica delle MMP in modo dose-dipendente, che ha permesso di conseguenza l'inibizione della migrazione delle cellule tumorali (Barletta et al., 2015).

Cianfruglia et al. hanno studiato gli effetti protettivi esercitati dai polifenoli introdotti con la dieta sullo stress glico-ossidativo, in vitro, utilizzando la linea cellulare Caco-2. In condizioni di iperglicemia è stato osservato un aumento dell'attività della gliossalasi II (GlxII), un maggiore uso di GSH e una maggiore produzione di AGE dovuta non solo ad un parallelo aumentato livello di MGO, ma anche ad una auto-ossidazione del glucosio, alla reazione non enzimatica di Maillard e la perossidazione lipidica. Il trattamento con polifenoli della mela in condizioni di iperglicemia ha determinato il recupero dei parametri di stress glico-ossidativo in quanto avveniva una diminuzione della formazione di AGE e ROS, e della perossidazione lipidica, assieme ad un aumento della capacità antiossidante e dei livelli di GSH. Si era verificato, inoltre, un effetto di

intrappolamento del MGO da parte di alcuni polifenoli della mela (quercetina, floretina e floridzina) e ciò ha determinato una diminuzione dell'attività della GlxI. Questi effetti si verificavano a concentrazioni comprese tra $4-8 \times 10^{-4}$ mol/L (Cianfruglia et al., 2020).

Uno studio in vivo su topi indotti a condizioni di diabete ha valutato il trattamento con i polifenoli di Hibiscus (HPE). I risultati hanno mostrato una notevole riduzione dell'iperglicemia e dell'iperinsulinemia, soprattutto alla dose di 200 mg/kg, oltre ai livelli di AGEs e di markers di perossidazione lipidica. In aggiunta, l'osservazione immunoistologica ha rivelato una diminuzione dell'espressione del fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF) e del recettore di AGEs (RAGE) (Peng et al, 2011).

Risultati simili sono stati ottenuti anche utilizzando estratti polifenolici del tè: in modelli animali, l'assunzione di una dose di tè di 200 mg/kg di peso corporeo per 8 settimane (contenente catechine per il 99%) riduceva la produzione di AGEs e i livelli di emoglobina glicata (Shanli P. and Genvi Z., 2014). Similmente, un altro studio in vivo sui topo ha dimostrato che l'epigallocatechina-3-gallato (EGCG), il principale composto polifenolico presente nel tè verde, possiede un'ampia gamma di proprietà terapeutiche, in particolare antidiabetiche, antiinfiammatorie e antiossidanti, associate

principalmente all'inibizione di NF- κ B, alla riduzione di emoglobina glicata (Hba1c), dei ROS e dei marker infiammatori (Eng et al., 2018).

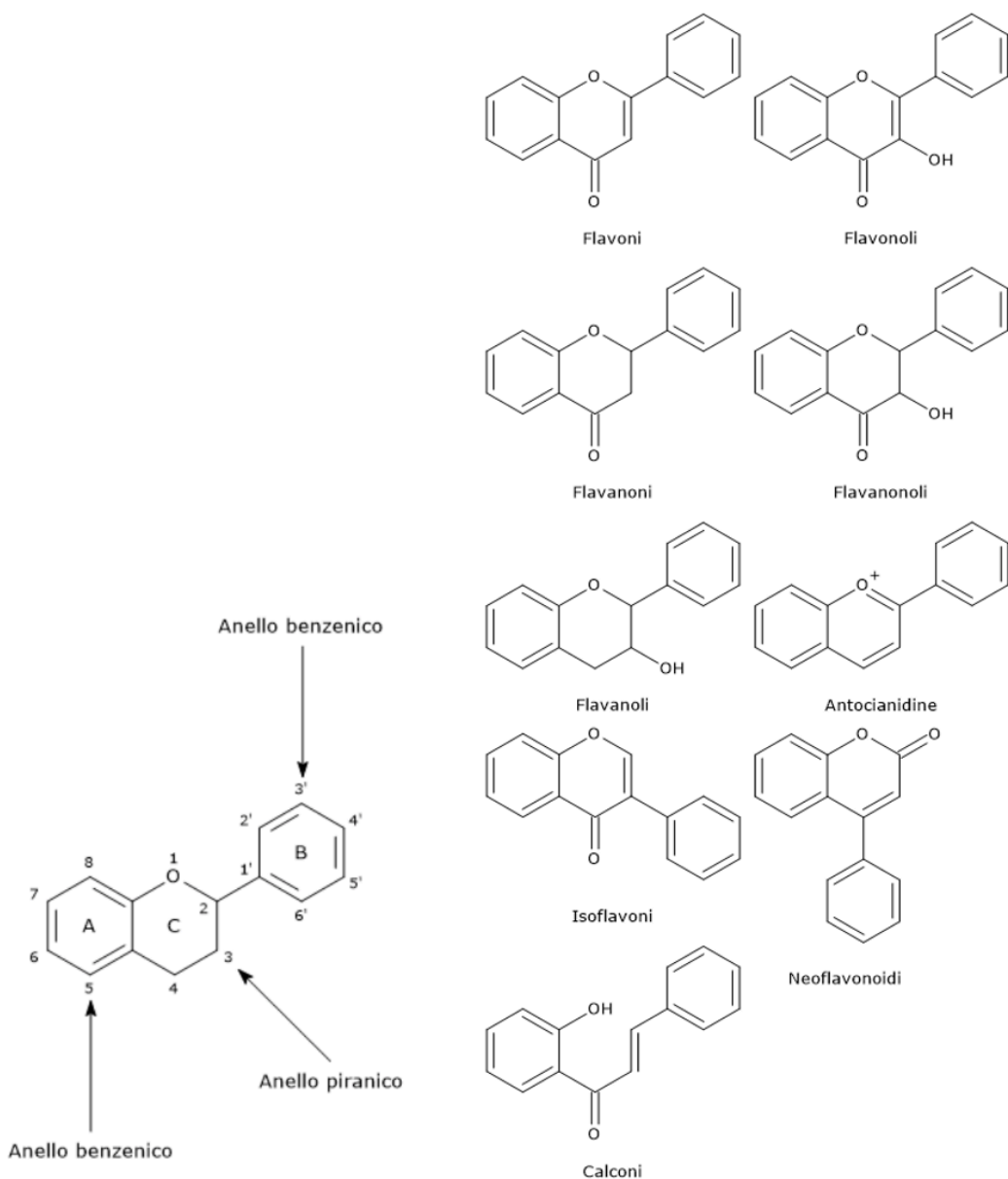


Figura 22. Struttura chimica dei flavonoidi. A sinistra, la struttura di base è definita da uno scheletro C6-C3-C6. A destra, la classificazione in sottoclassi avviene in base al carbonio dell'anello C su cui va a legarsi l'anello B. I flavonoidi in cui l'anello B si lega in posizione 3 dell'anello C sono detti isoflavoni; quelli in cui l'anello B si lega in posizione 4 sono i neoflavonoidi, mentre quelli in cui l'anello B si lega in posizione 2 a loro volta essere suddivisi in sei sottogruppi sulla base delle caratteristiche strutturali dell'anello C: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, flavanoli o catechine e antociani. I flavonoidi con l'anello C aperto sono detti calconi. Fonte: <https://www.tuscany-diet.net/2014/01/22/flavonoidi-definizione-struttura-classificazione/>

Capitolo 3

MATERIALI E METODI

*3.1 Preparazione dell'estratto idroalcolico di *Posidonia oceanica**

L'estratto di *Posidonia oceanica* (POE) è stato gentilmente offerto dal Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche dell'Università degli Studi di Firenze, come due provette di estratto secco, corrispondenti a 1,84 mg totali. L'estratto idroalcolico di *Posidonia oceanica* è stato ottenuto secondo il metodo descritto da Barletta et al., 2015.

Brevemente, l'estrazione dei composti fenolici riguarda la porzione centrale delle foglie, le quali sono state essiccate, triturate e risospese in 10 mL di etanolo al 70%/grammo. L'estrazione si è svolta a durante la notte, in continua agitazione, a temperatura ambiente e successivamente a 65°C per le 3 ore successive. L'estratto etanolicò è stato separato per filtrazione e mescolato con n-esano in rapporto 1:1 attraverso un imbuto separatore.

La fase organica, contenente composti idrofobici, è stata scartata e con la parte rimanente, contenente composti idrofilici, sono state preparate aliquote da 1 mL di estratto di *Posidonia oceanica*, successivamente essiccate e concentrate tramite centrifugazione a sottovuoto Univapo™. L'estratto secco è stato conservato a temperatura ambiente, al buio.

Per le analisi, le aliquote dell'estratto secco sono state dissolte in 0,5 mL di DMSO, centrifugate ed il pellet è stato scartato. L'estratto così ottenuto è stato usato direttamente per le analisi ed è stato denominato POE (*Posidonia oceanica* extract).

3.2 Caratterizzazione della composizione polifenolica dell'estratto idroalcolico di Posidonia oceanica

La quantificazione dei fenoli totali nell'estratto di *Posidonia oceanica* è stata effettuata attraverso una valutazione colorimetrica, utilizzando il metodo di Folin-Ciocalteu. Come standard è stato usato l'acido gallico (GA), un composto fenolico con azione antiossidante.

Il principio di questo metodo è basato sulla capacità del reattivo di Folin-Ciocalteu di ossidare i composti fenolici, producendo un picco di assorbimento a 765 nm. Il reattivo è costituito da una miscela in soluzione acquosa di fosfomolibdato e fosfotungstato. L'assorbanza, misurata a 765 nm, è direttamente proporzionale al contenuto di composti fenolici totali presenti nel campione (Nihal et al, 2007). I risultati vengono espressi in mg di acido gallico equivalenti.

3.3 Studio degli effetti dell'estratto di Posidonia oceanica su cellule intestinali CaCo-2

3.3.1 Le cellule intestinali CaCo2

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 T75 fino a raggiungere la formazione di un monostrato con giunzioni strette funzionali e microvilli a livello apicale (orletto a spazzola). Successivamente vengono splittate in supporti trattati appositamente per la crescita cellulare in adesione per effettuare gli esperimenti. Il terreno di crescita è il DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenente L-glutammina, supplementato con il 10% di FBS "Fetal Bovine Serum" (decomplementato 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 23).

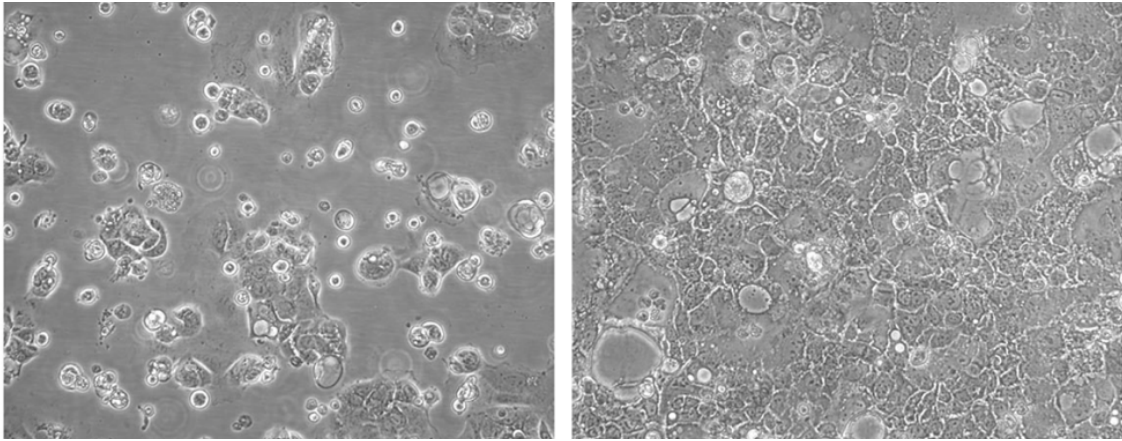


Figura 23. Cellule intestinali Caco2 in adesione. A sinistra notiamo una confluenza del 20%, a destra una confluenza piena del 100%.

Fonte: <https://www.atcc.org/products/htb-37>

3.3.2 Il trattamento ad alte concentrazioni di glucosio in presenza ed in assenza dell'estratto di PO: il modello cellulare

Dopo essere state piastrate overnight, 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, per una settimana (cellule HG). 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 cresciute in assenza di glucosio sono state utilizzate come controllo. Il mezzo è stato sostituito due volte a settimana.

Diverse concentrazioni di POE corrispondenti a concentrazioni di polifenoli che vanno da 5 µg GAE/mL a 40 µg GAE/mL sono state aggiunte nel terreno e co-incubate in entrambe le condizioni sperimentali (cellule HG e Controllo) per le ultime 24 ore.

3.3.3 L'effetto dell'estratto idroalcolico POE sulla vitalità cellulare

Si tratta di un test di citotossicità cellulare che valuta l'attività catalitica dell'enzima deidrogenasi mitocondriale, la quale riduce il composto MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), che viene aggiunto al terreno di coltura e captato dalle cellule per endocitosi, scindendo l'anello tetrazolico, e lo converte in un sale di formazano dal colore blu-violaceo (Figura 24). Il formazano si accumula poi all'interno delle cellule vitali e viene trasportato sulla superficie cellulare per esocitosi, un meccanismo di trasporto che avviene soltanto nelle cellule vive. Dal momento che la quantità di formazano è proporzionale al numero di cellule vitali, si valuta l'intensità della colorazione del lisato cellulare (ottenuto trattando le cellule con DMSO) tramite spettrofotometro, che sarà quindi un indice della vitalità cellulare (Castell, J. and Gmez-Lechn, M., 1966).

Le cellule sono state seminate overnight nella micropiastra da 96 pozzetti ad una concentrazione di 5×10^4 cellule/well. Successivamente il terreno è stato rimosso e le cellule sono state trattate nelle diverse condizioni sperimentali per una settimana:

- Ctrl: Terreno DMEM, per la normale crescita cellulare (25 mmol glucosio)
- HG: Terreno DMEM supplementato con 25mmol di glucosio (50 mmol), nelle ultime 24 ore

- Ctrl o HG co-incubato con varie concentrazioni di POE (5 µg GAE/mL, 10 µg GAE/mL, 15 µg GAE/mL, 40 µg GAE/mL), in triplicato, secondo lo schema in (Figura 25).

Al termine del trattamento (una settimana) il terreno è stato rimosso, i pozzetti sono stati lavati in PBS e successivamente sono stati aggiunti 100 µl di soluzione fornata da MTT (5 mg/ml di PBS) in ciascun pozzetto.

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

In ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di dimetilsolfossido (DMSO) per avere la lisi cellulare e permettere la solubilizzazione dei cristalli di formazano.

Il tutto è stato trasferito dopo 5 minuti in una micropiastra da 96 pozzetti bianca, rispettando lo schema del caricamento, ed è stata effettuata una lettura a 540 nm utilizzando un lettore automatico per micropiastre ELISA BioTek Synergy.

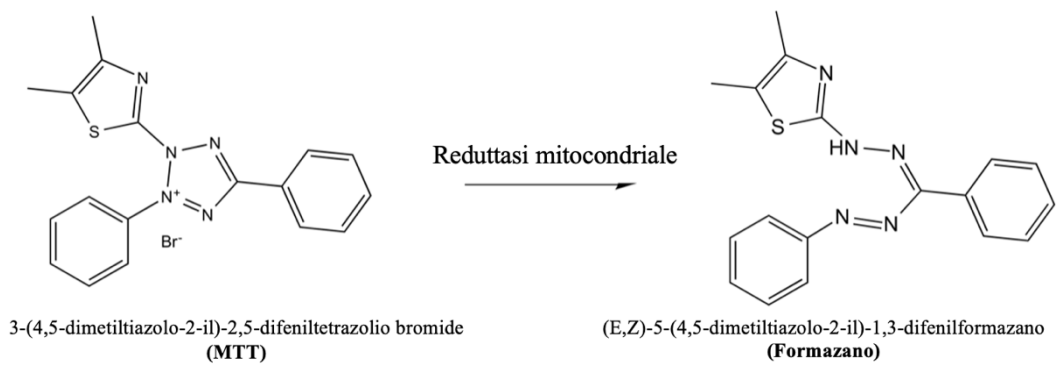


Figura 24. Reazione enzimatica condotta dalla deidrogenasi mitocondriale che riduce il sale di tetrazolio a formazano.

Fonte: https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay

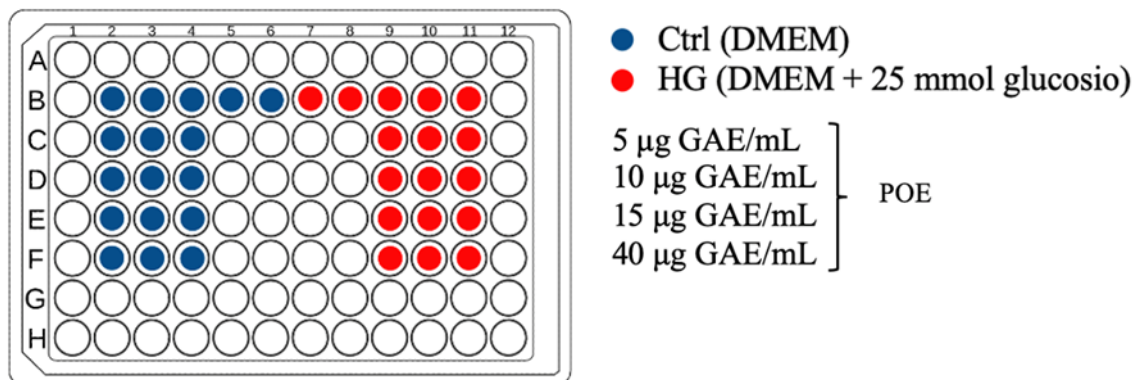


Figura 25. Schema del disegno sperimentale

3.3.4 L'effetto dell'estratto idroalcolico di PO sullo stress glico-ossidativo

L'analisi per la quantificazione delle specie reattive dell'ossigeno si basa sull'uso di un substrato fluorescente che viene attivato a livello intracellulare da parte di una reazione di ossidazione. Si tratta quindi di un saggio fluorimetrico in cui si ha l'aggiunta di una sonda, la 2',7'-diclorofluoresceina diacetato (H2DCF-DA, Invitrogen, USA), che diffonde all'interno delle cellule in quanto non è polare, viene ossidata e i gruppi acetato vengono tagliati dalle esterasi intracellulari formando un composto polare che viene trattenuto all'interno delle cellule (H2DCF). I ROS intracellulari provocano l'ossidazione di tale convertendolo in 2,7-diclorodifluoresceina (DCF) che è un composto permeabile, esce dalla cellula e può essere quantificata in quanto è altamente fluorescente ed emette ad una lunghezza d'onda di 532 nm (Chen et al., 2010) (Figura 26).

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

Le cellule nelle varie condizioni sperimentali sono state piastrate in concentrazione 5×10^4 in piastre 96 well black, nere con fondo trasparente per lettura in fluorescenza. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C e CO₂ al 5% il terreno è stato rimosso e sono stati effettuati due lavaggi in PBS. Successivamente sono stati aggiunti 100 µl di sonda H2DCF-DA 25 µM (25 µl

di sonda in 10 ml di terreno DMEM è la concentrazione raccomandata per cellule con fenotipo di crescita aderente). La piastra è stata incubata al buio per 45 min alle condizioni standard, dopodiché la sonda è stata rimossa dai pozzetti ed è stato effettuato un lavaggio con PBS per eliminare la sonda in eccesso. È stata eseguita infine una lettura in cinetica per 1 ora e 30 min alla lunghezza d'onda di eccitazione di 485 nm e lunghezza d'onda di emissione di 532 nm tramite un lettore automatico di micropiastre BioTek Sinergy con sottrazione automatica del background. I dati sono stati poi normalizzati per quelli della vitalità cellulare.

In seguito, è stato acquisito l'imaging cellulare relativo allo stress glicossidativo indotto dal glucosio e all'ipotetico ruolo protettivo di POE, attraverso il microscopio automatizzato Lion hearth FX Automated live cell Imager (Biotek, USA).

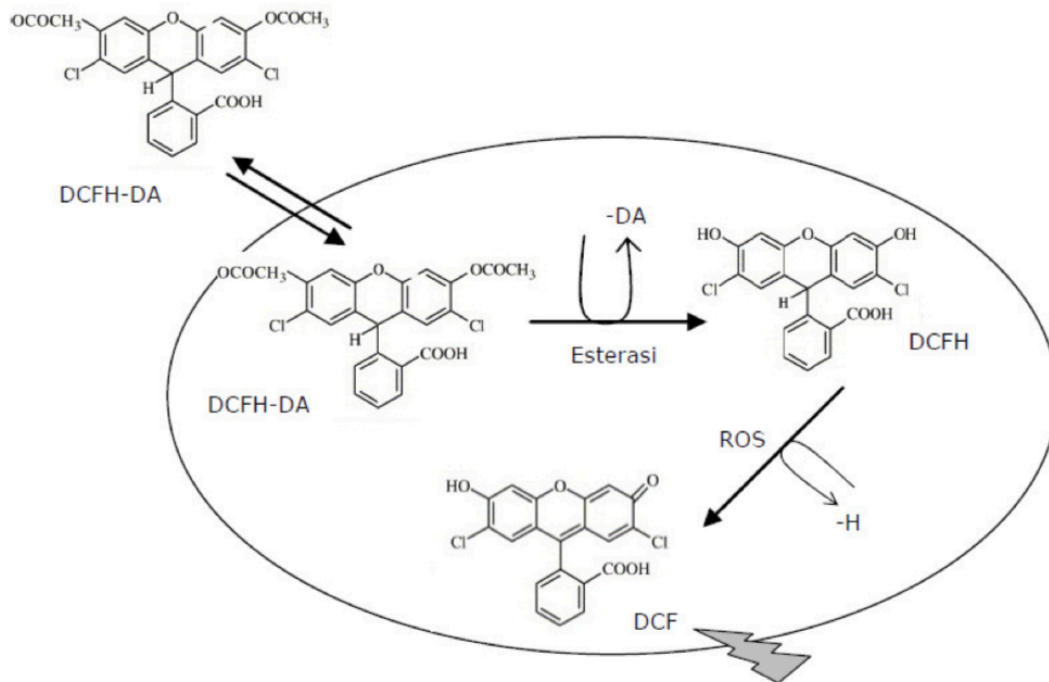


Figura 26. Meccanismo d'azione della diclorofluoresceina diacetato nei saggi di misurazione dello stress ossidativo intracellulare. La DCFH-DA (non fluorescente) può diffondere liberamente attraverso la membrana plasmatica; una volta deacetilata a DCFH (non fluorescente) dalle esterasi intracellulari, diviene substrato per l'ossidazione a DCF (fluorescente) e può essere misurata per analisi fluorimetrica.

3.3.5 L'effetto dell'estratto idroalcolico POE sull'espressione delle proteine

3.3.5.1 Estratto proteico totale e quantificazione mediante metodo BCA

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

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

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

Il pellet cellulare è stato raccolto in una eppendorf e sono stati aggiunti 50 µl di tampone di lisi Ripa (37,5 ml di H₂O, 5 ml di Triton X100, 5 ml di DOC, 250 µl di SDS, 500 µl di TRIS 1M a pH 7,5, 1,5 ml di NaCl 5M, 250 µl di NaF 1M).

Le cellule sono state rotte con una siringa/puntale e lasciate 15 min in ghiaccio.

Il tutto è stato poi centrifugato 10 min a 14000 rpm in modo da far precipitare le membrane e le varie componenti cellulari ed il surnatante, contenente le

proteine, è stato recuperato per il dosaggio di esse, quindi congelato a -80°C per il successivo processamento.

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

(<https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-quantitation/tools-for-protein>).

I campioni sono stati scongelati in ghiaccio, vortexati e centrifugati a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C , successivamente sono stati mantenuti in ghiaccio.

Successivamente i campioni sono stati diluiti 1:10 per ottenere un volume finale di $60\ \mu\text{l}$ ($6\ \mu\text{l}$ di campione + $54\ \mu\text{l}$ di H_2O) in modo da avere un eccesso per permettere un caricamento in duplicato ($25\ \mu\text{l}$ per ogni caricamento).

È stata preparata una curva standard utilizzando albumina sierica bovina (BSA). Dallo stock a concentrazione di $2\ \text{mg/ml}$ sono state preparate 6 diluizioni 1:2, utilizzando per la prima diluizione $100\ \mu\text{l}$ di stock di BSA. In questo modo è stata ottenuta una retta di taratura: $1000\ \mu\text{g/ml}$, $500\ \mu\text{g/ml}$, 250

$\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 62,5 $\mu\text{g/ml}$ e 31,25 $\mu\text{g/ml}$ e sono state caricate 25 μl di ciascuna, in una multipiastra da 96 pozzetti.

In seguito sono stati caricati 25 μl per ogni campione e come bianco sono stati utilizzati 25 μl di acqua deionizzata. Tutti i caricamenti sono stati fatti in duplicato.

Successivamente è stato aggiunto il reagente BCA, composto da due reattivi A e B in rapporto 50:1:

- reagente A: 1 g di BCA, 2 g di carbonato di sodio, 0,16 g di tartrato di sodio, 0,4 g di NaOH, 0,95 g di bicarbonato di sodio, H₂O per un volume finale di 100 ml a pH 11,25.

- reagente B: 0,4 g di solfato rameico pentaidrato in 10 ml di acqua distillata.

Una volta caricato il reagente, la micropiastra da 96 pozzetti è stata incubata al buio per 30 minuti a 37°C e poi è stata effettuata una lettura di assorbanza a 572 nm attraverso un lettore automatico di micropiastre. Il contenuto proteico dei campioni è stato determinato attraverso un'analisi automatizzata di regressione lineare fatta mediante la curva di taratura standard creata con la BSA.

3.3.5.2 Analisi Western Blotting

Il Western blotting è una procedura che serve per immunolocalizzare le proteine tramite gli anticorpi, dopo che sono state separate mediante elettroforesi su gel e trasferite su una membrana. La rivelazione delle proteine dipende dalla specificità dell'interazione antigene-anticorpo ed è utile per l'identificazione qualitativa o semiquantitativa di proteine specifiche e il loro peso molecolare da una miscela complessa (Hnasko TS and Hnasko RM, 2015).

Grazie alla sua attività denaturante, l'SDS interagisce con le varie proteine in un rapporto costante di 1,4 g di SDS per grammo di proteina, permettendone la separazione sulla base delle differenze di peso molecolare dato che il rapporto massa/carica per ogni proteina denaturata con SDS rimane costante (Smith B.J., 1984). La concentrazione di acrilammide varia a seconda della porosità desiderata per la separazione della proteina di interesse: a concentrazioni maggiori corrispondono pori di dimensioni minori, capaci di separare le proteine di piccole dimensioni, e viceversa.

Per queste analisi, 20 µg/mL di proteine per ciascuna condizione sperimentale sono stati fatti correre in un gel di poliacrilammide 12,5%.

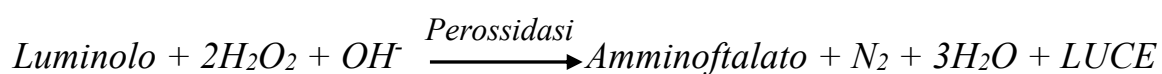
Nel caso dell'SDS-PAGE, applicando un campo elettrico di corrente continua a una soluzione a pH determinato che contiene proteine, queste si muoveranno verso l'elettrodo positivo, in virtù della carica netta negativa fornita dal SDS,

con una velocità che dipende dalle dimensioni. I gel posizionati nel supporto, quindi nella camera elettroforetica, sono stati caricati con il marker (Figura 27) con i campioni in base all'ordine prescelto. La corsa è stata eseguita in Electrode buffer (10 g di SDS 0,1%, 30 g di TRIS 25 mM, 144 g di glicina a pH 8,3), 100 V costante fino all'arrivo dei campioni al livello del running gel, e successivamente la potenza è stata alzata a 200 V costante, per un tempo totale di corsa di 1 ora e 30 min.

Al termine della corsa le proteine sono state trasferite dal gel alla membrana in PVDF (polivinildenfluoruro) attivata in metanolo. Il trasferimento è stato effettuato in Transfer buffer, (15,15 g di TRIS, 72 g di glicina, 20% metanolo) a freddo, 20 V costante per tutta la notte.

La membrana è stata bloccata con EveryBlot Blocking Buffer (BIORAD) per bloccare i siti aspecifici non impegnati nel legame con le proteine trasferite. Successivamente la membrana è stata incubata con vari anticorpi primari elencati nella tabella 3, e con i rispettivi anticorpi secondari seguendo i protocolli indicati dalla ditta produttrice (Tabella 3).

L'anticorpo secondario è coniugato all'enzima perossidasi di rafano (horse-radish peroxidase, HRP), che catalizza l'ossidazione del luminolo e la riduzione dell' H_2O_2 con la seguente reazione:



Il luminolo ossidato emette luce, la cui intensità viene aumentata grazie all'uso di un intensificatore chimico, SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La luce emessa impressiona una lastra fotografica che ne immagazzina l'immagine (Figura 28). La rilevazione è avvenuta attraverso un sistema per Imaging, ChemiDoc XRS+ System (BioRad, USA), che offre un rilevamento rapido e altamente sensibile della chemiluminescenza, e l'utilizzo del software ImageJ per l'acquisizione di immagini.

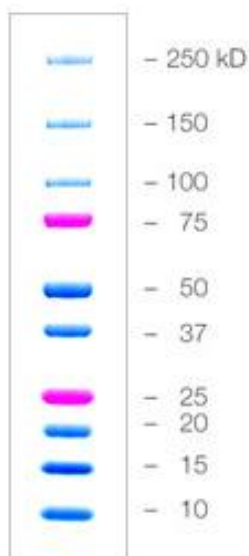


Figura 27. Pattern di localizzazione del marcatore in base al peso molecolare riportato a fianco in kDa. Fonte: <https://www.bio-rad.com/it-it/sku/1610374-precision-plus-protein-dual-color-standards-500-ul?ID=1610374>

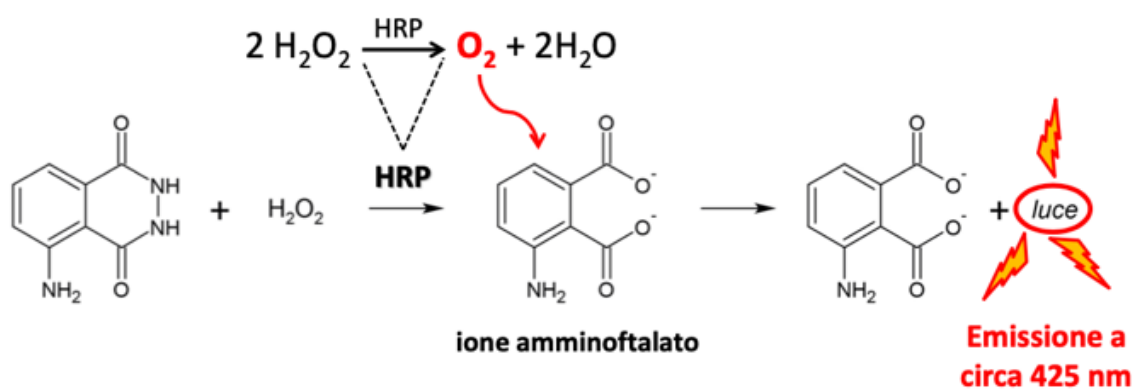


Figura 28. Schema della reazione dell'ossidazione del luminolo per la rilevazione mediante Chemidoc.

Anticorpo	PM (kDa)	Ospite	Ditta produttrice	Diluizione finale	Ruolo
Vinculina	120	Mouse		1:1.000.000 in BSA 1% TBS Tween	Normalizzazione proteine
NFkB-105	105	Rabbit	Genetex	1:75.000.000 in BSA 1% TBS Tween	Infiammazione
NFkB-65	65	Mouse	Santa Cruz	1:2.500.000 in BSA 1% TBS Tween	Infiammazione
PON2	39	Rabbit	Sigma Aldrich	1:75.000.000 in BSA 1% TBS Tween	Anti-apoptosi, antiossidante
CASP3	32	Rabbit	Sigma Aldrich	1:75.000.000 in BSA 1% TBS Tween	Apoptosi
CASP3 cleaved	32,18	Mouse	Santa Cruz	1:2.500.000 in BSA 1% TBS Tween	Apoptosi
GLUT2	57	Rabbit	Invitrogen	1:75.000.000 in BSA 1% TBS Tween	Assorbimento intestinale
SGLT1	61	Rabbit	Invitrogen	1:30.000.000 in BSA 1% TBS Tween	Assorbimento intestinale
ZO-1	195	Rabbit	Genetex	1:150.000.000 in BSA 1% TBS Tween	Permeabilità intestinale
AGEs	Pattern	Goat	Merck	1:2.000 in 5% Latte + Sodio azide 0.025%	Proteine modificate dalla glicolaldeide, stress ossidativo

***Tabella 3. Elenco degli anticorpi primari utilizzati nel Western blotting.
Sono riportati ospite, ditta produttrice, diluizione e ruolo.***

3.3.6 Analisi statistica

I dati sono stati espressi come Media \pm deviazione standard di un numero di esperimenti compreso fra tre e cinque.

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).

Capitolo 4

RISULTATI

4.1 Effetto dell'estratto di Posidonia oceanica (POE) sulla vitalità cellulare in cellule intestinali Caco-2

In una fase preliminare è stato valutato l'effetto concentrazioni crescenti di POE (corrispondenti alla concentrazione di polifenoli che vanno da 5 µg GAE/ml a 40 µg GAE/ ml) sulla vitalità cellulare mediante MTT test. Come mostrato nella Figura 29, non sono state osservate modifiche significative della vitalità cellulare nelle cellule Caco-2 trattate con livelli crescenti di POE. Questi risultati hanno confermato che l'estratto POE non esercita effetti citotossici nelle nostre condizioni sperimentali.

Come mostrato nella Figura 29, una significativa diminuzione di circa il 40% della vitalità cellulare è stata osservata nelle cellule incubate in presenza di elevate concentrazioni di glucosio (HG-cells) rispetto alle cellule di controllo. Questi dati sono in linea con uno studio precedente (Morresi et al., 2019).

Per valutare il potenziale effetto dell'estratto sulla citossicità indotta da HG, le cellule trattate con HG o con terreno sono state successivamente co-incubate per 24 ore con concentrazioni crescenti di POE (corrispondenti alla concentrazione di polifenoli che vanno da 5 µg GAE/mL a 40 µg GAE/ ml).

Come mostrato in Figura 29, a concentrazioni uguali e superiori a 15 µg GAE/mL ($p < 0,05$) in condizione di iperglicemia si è assistito ad un aumento significativo della vitalità cellulare rispetto alla condizione HG-cells (60%).

In base ai dati ottenuti, la concentrazione di 15 µg GAE/mL di POE è stata utilizzata per gli esperimenti successivi, in quanto è risultata la minima concentrazione ad esercitare un effetto significativo.

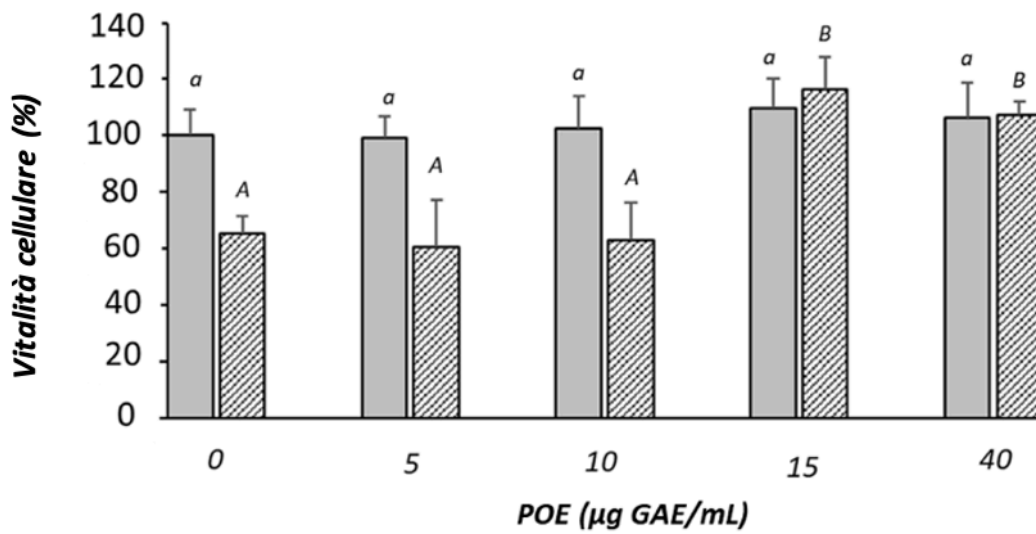


Figura 29. Effetto di POE sulla vitalità cellulare. Vitalità delle cellule Caco-2 in cellule Caco-2 incubate in terreno DMEM (control) o con 50 mM di glucosio (HG per una settimana), co-incubate in presenza ed in assenza di POE (5-40 µg GAE/mL) per le ultime 24 ore. I risultati sono rappresentati come media \pm DS di 5 determinazioni in triplicato. Lettere diverse indicano significanti differenze statistiche tra i campioni ($p < 0.05$).

4.2 Effetto dell'estratto di Posidonia oceanica (POE) sullo stress ossidativo in cellule intestinali Caco-2.

La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è stata valutata grazie all'uso di una sonda, la 2',7'-diclorofluoresceina diacetato (DCF). Successivamente mediante il microscopio a fluorescenza (Lionheart™ FX Automated Microscope) sono state acquisite immagini sia in high contrast brightfield che in fluorescenza (DCG Fluorescence intensity).

Come mostrato nella Figura 30, non sono state osservate modifiche significative nei livelli di ROS intracellulari nelle cellule Caco-2 trattate con livelli crescenti di POE.

Un aumento significativo della produzione di ROS intracellulari è stato osservato in cellule HG (2 ± 0.2) rispetto alle cellule di controllo (1 ± 0.1) ($p < 0,05$) (Morresi et al., 2019).

La co-incubazione di POE (15 μg GAE/mL) in condizione di iperglicemia induce una significativa diminuzione della produzione intracellulare di ROS, che ritorna alla situazione di controllo (Figura 30A).

Le immagini ottenute mediante il microscopio a fluorescenza (Figura 30/B) hanno confermato quanto riportato dai dati sperimentali. In condizione di iperglicemia (HG-cells) si è assistito ad una diminuzione del numero di cellule visto con l'high contrast brightfield e, allo stesso tempo, ad un aumento

dell'intensità della fluorescenza. L'aggiunta di estratto ha riportato sia il numero di cellule che l'intensità della DCF ai valori di controllo.

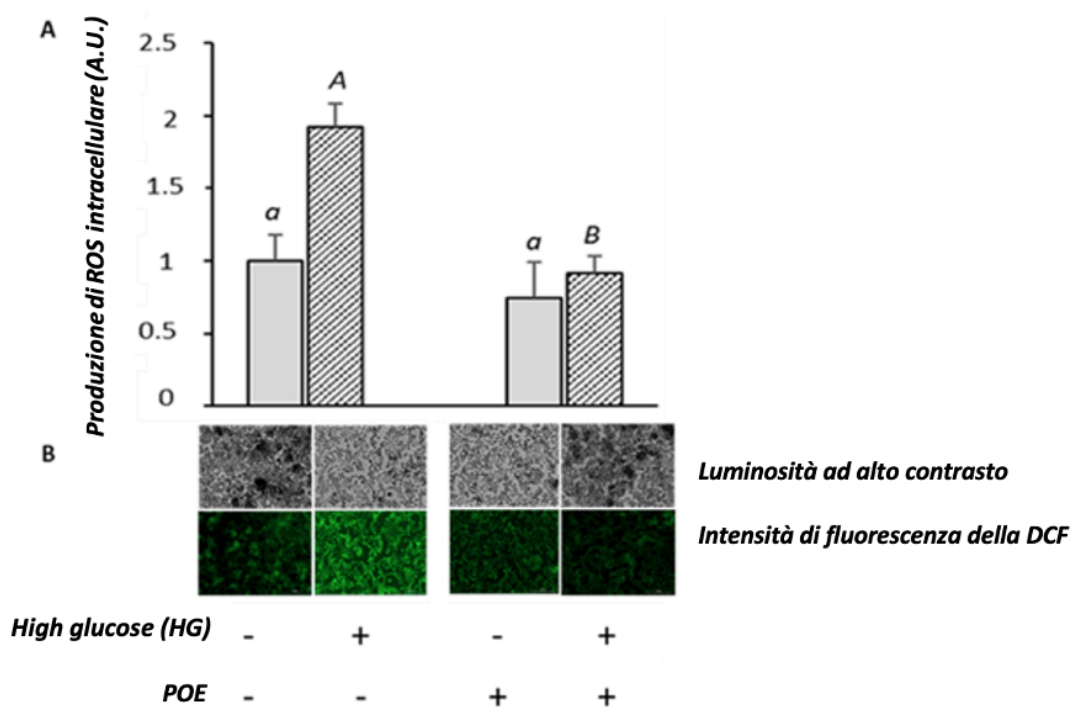


Figura 30. Effetto di POE sullo stress ossidativo. A) Produzione di ROS intracellulari. B) Imaging di cellule Caco-2 ottenute tramite microscopio a fluorescenza Lionheart™ FX Automated Microscope in cellule Caco-2 incubate in terreno DMEM (control) o con 50 mM di glucosio (HG per una settimana), co-incubate in presenza ed in assenza di POE (15 µg GAE/mL) per le ultime 24 ore. I risultati sono rappresentati come media ± DS di 5 determinazioni in triplicato. Lettere diverse indicano significanti differenze statistiche tra i campioni ($p < 0.05$)

4.3 Effetto dell'estratto di Posidonia oceanica (POE) sulla formazione di AGEs e sull'espressione di proteine coinvolte nel pathway apoptotico.

Per investigare i possibili ruoli dell'estratto di PO contro il danno glicossidativo, la formazione di AGEs e dell'attivazione di pathway apoptotici nelle diverse condizioni sperimentali è stata valutata mediante l'analisi dell'espressione proteica delle principali proteine coinvolte tramite Western Blott.

Si ritiene che la modificazione delle proteine con aldeidi reattive (glicolaldeidi) svolga un ruolo nella patogenesi di diverse malattie. I livelli di GA-modified protein, cioè proteine modificate dalla glicolaldeide, sono stati analizzati mediante anticorpi specifici. Come mostrato nella Figura 31 si è osservato un aumento significativo dei livelli di GA-modificate nelle cellule trattate con HG ($2.14 \pm 0,17$ A.U.) rispetto alla condizione di controllo ($1 \pm 0,1$ A.U.) ($p < 0.05$).

Lo stress glicossidativo ha indotto anche una significativa diminuzione dell'espressione dell'enzima PON2 di circa 50% (Figura 31B) rispetto alla condizione di controllo. Al fine di indagare la rilevanza fisio-patologica della down regolazione di PON2, sono stati analizzati i livelli della proteina caspasi-3, coinvolta nell'attivazione della cascata della caspasi, enzimi con ruolo pro-apoptotico.

Dalla quantificazione densitometrica delle bande normalizzate (Figura 31C), nelle cellule trattate con HG, si è assistito ad un aumento significativo dell'espressione proteica della caspasi-3 attivata (cleaved), di circa tre volte rispetto alla condizione di controllo.

Nelle condizioni di controllo, il trattamento con POE ha indotto solo una leggera diminuzione delle proteine modificate con GA rispetto alle cellule di controllo non trattate (Figura 31A); non sono state osservate modifiche significative di altri parametri.

Al contrario, la co-incubazione con POE (15 μg GAE/mL) nelle cellule trattate HG, ha contrastato l'effetto del glucosio portando ad una significativa diminuzione dei livelli di GA-modified protein (Figura 31 A, D), un aumento significativo dell'espressione di PON2 (Figura 31B) e di una conseguente diminuzione dei livelli di caspasi 3 attivata (Figura 31C) ($p < 0.05$).

Lo stress ossidativo e la glicazione non enzimatica sono strettamente correlati: questi dati suggeriscono che il trattamento ad alte concentrazioni di glucosio induce uno stress glico-ossidativo, modulando l'espressione delle proteine coinvolte nel pathway apoptotico. La co-incubazione con estratto di POE, mostra un effetto protettivo e contrasta il danno indotto dall'iperglicemia, ripristinando i livelli a quelli di controllo.

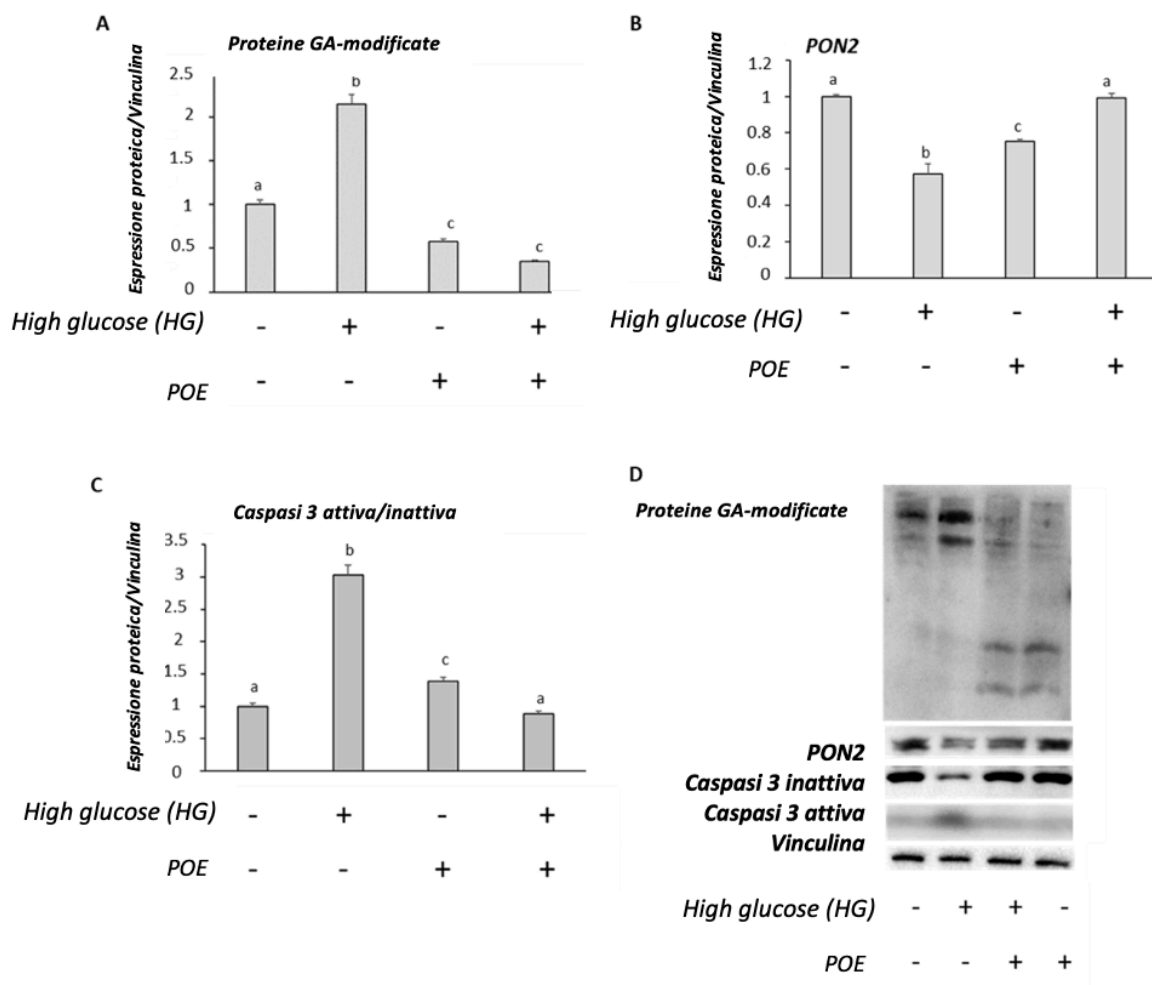


Figura 31. Espressione di proteine coinvolte nella glico-ossidazione e nel pathway apoptotico. Analisi densitometrica di (A) proteine GA-modificate, (B) Paraoxonasi-2 (PON2), (C) Caspasi-3 espressa come rapporto tra CASP3 cleaved/CASP3, in cellule Caco-2 incubate in terreno DMEM (control) o con 50 mM di glucosio (HG per una settimana), co-incubate in presenza ed in assenza di POE (15 µg GAE/mL) per le ultime 24 ore. I dati densitometrici sono stati normalizzati sulla Vinculina, e rispetto alla condizione di controllo. I risultati sono presentati come media ± DS di 3 determinazioni effettuate in triplicato. Lettere diverse indicano differenze statistiche significative tra i campioni ($p < 0.05$). (D) Immagine del Western blot ottenuta tramite ChemiDoc XRS+ System (BioRad, USA).

4.4 Effetto dell'estratto di Posidonia oceanica (POE) sull'espressione dei trasportatori del glucosio e sulle giunzioni strette dell'epitelio intestinale

Come descritto precedentemente, l'esposizione cronica ad alte concentrazioni di glucosio causa danni alla barriera intestinale alterando l'assorbimento da parte dell'epitelio. Per valutare il possibile effetto protettivo di POE nei confronti del danno indotto da glico-ossidazione, è stata valutata l'espressione dei trasportatori del glucosio GLUT2 e SGLT1, e della proteina ZO-1 caratterizzante le giunzioni strette dell'epitelio intestinale.

Per quanto riguarda l'integrità di barriera intestinale, non sono state evidenziate modifiche significative nell'espressione di ZO-1 in cellule HG rispetto al controllo ($p < 0.05$). La presenza di POE in entrambe le condizioni, Ctrl e HG ha determinato un aumento significativo dell'espressione di ZO-1 (Figura 32A).

Per quanto riguarda i trasportatori, nelle cellule HG, si è assistito ad una diminuzione significativa, di 5 e di 3 volte rispettivamente per GLUT2 e SGLT1 (Figura 32 B, C) rispetto alle cellule di controllo.

Il trattamento con POE, in condizioni di controllo, ha comportato un aumento di circa il doppio dell'espressione della proteina ZO-1 rispetto alle cellule di controllo non trattate ($p < 0,05$) (Figura 32A). La sovraregolazione indotta da POE di ZO-1 si è verificata anche nelle cellule HG (Figura 32A) ($p < 0,05$).

Inoltre, il trattamento con POE in condizioni di controllo ha comportato una leggera diminuzione dell'espressione di GLUT2, ma nessun cambiamento nel trasportatore intestinale SGLT1 rispetto alle cellule di controllo non trattate (Figura 32B e 32C). Al contrario, il trattamento con POE in condizioni HG ha indotto un aumento dei livelli di trasportatori di glucosio (SGLT1 e GLUT2) rispetto alle cellule HG non trattate (Figura 32B e 32C) ($p < 0,05$).

Tali risultati confermano il coinvolgimento di POE nella modulazione di espressione dei trasportatori del glucosio, sottolineando il suo ruolo positivo sull'integrità di barriera intestinale.

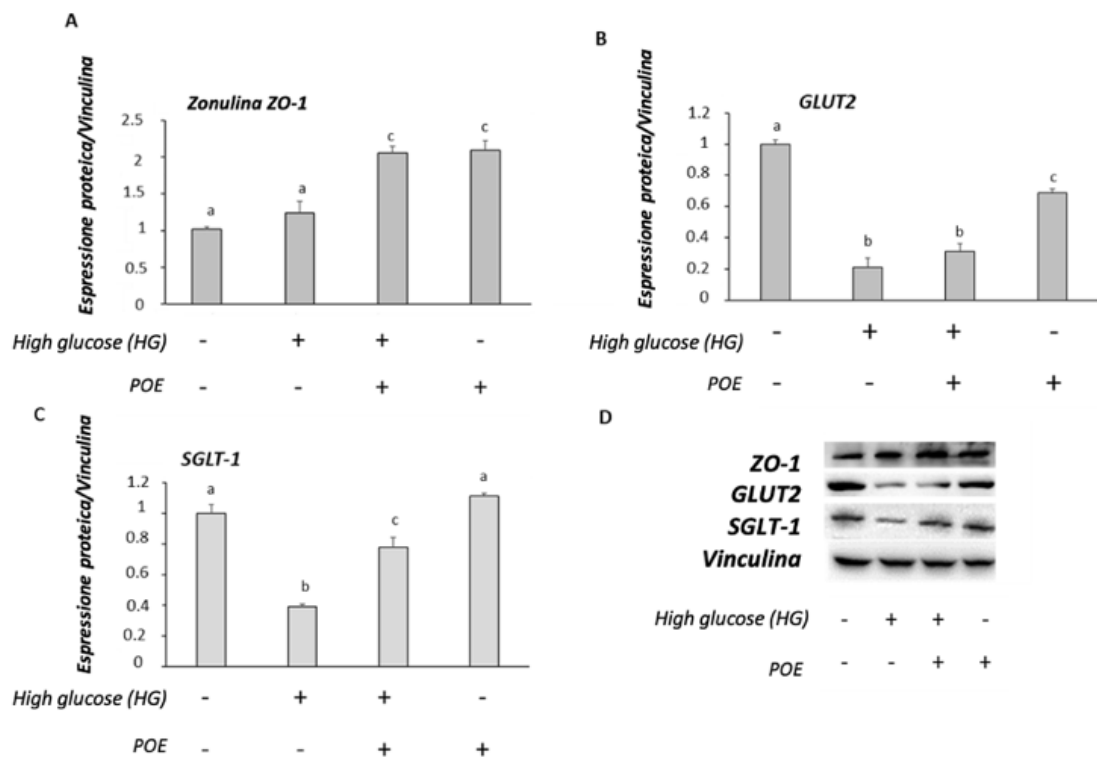


Figura 32. Espressione di proteine coinvolte nel trasporto del glucosio e sulle giunzioni strette cellulari. Analisi densitometrica di (A) Zonulina-1 (ZO-1), (B) GLUT2, (C) SGLT1 in cellule Caco-2 incubate in terreno DMEM (control) o con 50 mM di glucosio (HG per una settimana), co-incubate in presenza ed in assenza di POE (15 μ g GAE/mL) per le ultime 24 ore. I dati densitometrici sono stati normalizzati sulla Vinculina, e rispetto alla condizione di controllo. I risultati sono presentati come media \pm DS di 3 determinazioni effettuate in triplicato. Lettere diverse indicano differenze statistiche significative tra i campioni ($p < 0.05$). (D) Immagine del Western blot ottenuta tramite ChemiDoc XRS+ System (BioRad, USA).

Capitolo 5

CONCLUSIONI

Lo studio dei meccanismi molecolari ha evidenziato che l'iperglicemia, può portare al danno cellulare e contribuire allo sviluppo di malattie croniche nell'ambito dei quali svolge un ruolo chiave l'aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) endogene e di composti di glicazione avanzata (AGEs), non controbilanciata da adeguate difese antiossidanti. Tale condizione è definita stress glico-ossidativo.

Le cellule intestinali sono altamente vulnerabili alla glico-ossidazione dovuto all'esposizione agli agenti pro-ossidanti, ai prodotti di perossidazione lipidica e composti di glicazione introdotti con la dieta (Rohr et al., 2020). Lo stress glico-ossidativo ha diversi target sia intra-, sia extracellulari, e per tale motivo è ragionevole ipotizzarli come un "ponte" tra danno intracellulare e danno extracellulare nella progressione e sviluppo di patologie intestinali infiammatorie croniche (IBD) (Taniguchi et al., 2016).

Nella ricerca di terapie adeguate alle malattie gastrointestinali di origine infiammatoria, gli studi scientifici sono stati in gran parte dedicati allo studio di bioprodotti di origine vegetale. Grazie alla loro biodiversità gli organismi marini sembrano essere una buona fonte di molecole bioattive in grado di esercitare proprietà benefiche per la salute. Pertanto, la ricerca di nuove

sostanze biologicamente attive è una sfida attuale per una prevenzione e gestione più efficace e sicura e un trattamento non invasivo delle IBD.

Obiettivo della presente tesi è stato quello di investigare il possibile ruolo protettivo della *Posidonia oceanica* contro il danno glico-ossidativo indotto dall'esposizione cronica ad alte concentrazioni di glucosio, in cellule intestinali.

La *Posidonia oceanica* è una fanerogama comune nel bacino del Mar Mediterraneo dove forma vaste praterie lungo le coste ricoprendo un ruolo ecologico fondamentale per la produzione di materiale organico e di ossigeno; è inoltre luogo di riparo e nursery per molte specie animali e vegetali e contribuisce al mantenimento dell'equilibrio dei litorali contenendo l'erosione costiera (Pergent et al., 1994; Boudouresque et al., 2006; Fonseca et al., 2007). È stata recentemente studiata nel dettaglio la sua composizione, e particolare attenzione è stata rivolta ai composti bioattivi come i polifenoli. Il profilo polifenolico di POE è stato precedentemente caratterizzato e le catechine sono i composti presenti in maggiori quantità, seguite da altri composti come acido gallico, acido clorogenico, epicatechina e acido ferulico (Barletta et al., 2015). I risultati, in linea con studi precedenti (Morresi et al, 2019), hanno dimostrato che il trattamento ad alte concentrazioni di glucosio (50mM) induce una significativa riduzione della vitalità cellulare ed un significativo aumento della

formazione di ROS intracellulari. Inoltre, le cellule trattate con HG hanno mostrato un aumento significativo degli AGEs, dimostrato dall'aumento dell'espressione 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.

La co-incubazione dell'estratto POE per 24 ore ha indotto un significativo aumento della vitalità cellulare, con una conseguente riduzione della formazione di ROS intracellulari rispetto alle HG-cellule. Inoltre, le cellule trattate con HG in presenza di POE hanno mostrato una diminuzione significativa degli AGEs, dimostrato dalla diminuzione dell'espressione delle proteine modificate con glicolaldeide (GA-modified protein). Questi risultati dimostrano quindi il ruolo attivo di POE nei confronti dell'esposizione cronica ad elevate concentrazioni di glucosio.

Lo studio ha indagato l'effetto della POE sulle proprietà antiossidanti cellulari e l'attenzione è stata rivolta all'enzima paraoxonasi-2 (PON2). PON2 è espressa nella maggior parte dei tessuti esaminati e studi di localizzazione subcellulare suggeriscono una preponderanza dell'enzima a livello della membrana mitocondriale. Poiché i mitocondri sono una notevole fonte di stress ossidativo, la predominante localizzazione di PON2 nei mitocondri supporta

un ruolo di prevenzione verso il danno ossidativo e nei processi apoptotici (Altenhofer et al., 2010; Liu et al., 1996). PON2 è un enzima ampiamente espresso anche nel tratto digestivo dove esercita un ruolo antiossidante e anti-apoptotico contrastando i processi ossidativi e infiammatori a livello della mucosa intestinale (Rothem et al., 2007; Levy et al., 2007). Studi precedenti hanno dimostrato che il silenziamento di PON2 predispone le cellule intestinali alla perossidazione lipidica e allo sviluppo di una risposta infiammatoria esacerbata tramite l'attivazione del fattore di trascrizione NF-kB (Precourt et al., 2012). Al contrario, l'aggiunta di PON2 purificato a cellule Caco-2 permeabilizzate riduce la perossidazione lipidica (Ajith T.A. and Vinodkumar P., 2016). Inoltre, alcuni polimorfismi di PON2 costituiscono un fattore protettivo nei confronti dello sviluppo di malattie dell'intestino (IBD), in particolare il morbo di Crohn e la colite ulcerosa (Sanchez et al., 2006).

I risultati, ottenuti nella presente tesi, hanno evidenziato una riduzione dei livelli di PON2 nelle cellule trattate con elevate concentrazioni di glucosio. Il trattamento con l'estratto POE è in grado di indurre una up-regolazione dell'espressione dell'enzima in cellule trattate con elevate concentrazioni di glucosio.

Poiché la PON2 svolge un ruolo nei processi apoptotici, abbiamo indagato l'effetto della POE sull'attivazione della caspasi-3. La caspasi-3, una molecola

esecutiva chiave a valle dell'apoptosi, svolge un ruolo in molte vie di segnalazione apoptotica e può scindere, attraverso la sua attività proteasica, molte proteine bersaglio, come le proteine del citoscheletro, portando ai tipici cambiamenti morfologici associati all'apoptosi. Pertanto, la caspasi-3 è considerata un importante indicatore di apoptosi (Porter A.G. and Janicke R.U., 1999). I dati ottenuti evidenziano che il trattamento con elevate concentrazioni di glucosio porta all'attivazione della caspasi come evidenziato da un aumento dell'espressione proteica della caspasi-3 attivata (cleaved), di circa tre volte rispetto alla condizione di controllo. Il trattamento con POE è associato ad una significativa riduzione dell'attivazione della caspasi-3 nelle cellule HG, indicando un effetto protettivo contro l'apoptosi indotta da stress glico-ossidativo.

La funzione principale dell'intestino tenue è l'assorbimento dei nutrienti e i principali trasportatori del glucosio nelle cellule intestinali sono: SGLT1, un co-trasportatore (simporto) del glucosio sodio-dipendente, ad alta affinità, che si trova nella membrana del versante luminale degli enterociti, e GLUT2, un trasportatore del glucosio a bassa affinità principalmente localizzato sul versante basolaterale, ma che in condizioni di alte concentrazioni di glucosio può essere espresso anche sulla membrana apicale per permettere la diffusione facilitata dello zucchero. È stato suggerito che SGLT1 e GLUT2 potrebbero svolgere anche un ruolo importante anche nella rilevazione del glucosio

intestinale e nella secrezione di incretine (GIP e GLP-1), ormoni che hanno la funzione di controllare la glicemia aumentando la secrezione di insulina e diminuendo quella di glucagone (Röder et al., 2014). I nostri dati hanno dimostrato che lo stress glico-ossidativo indotto dal trattamento con glucosio altera l'espressione dei principali trasportatori del glucosio SGLT1 e GLUT2, facendo diminuire la loro espressione. Il trattamento con POE è associato all'aumento dell'espressione dei livelli di entrambi i trasportatori, rispetto alla condizione HG. Questi risultati sono in accordo con studi precedenti, che hanno riportato una diminuzione dell'attività degli SGLT nella membrana a spazzola di ratti diabetici (Bauer et al., 2017).

Inoltre, utilizzando cellule LLC-PK1 (cellule epiteliali renali suine), è stato riportato che incubazioni prolungate con alto contenuto di glucosio inducono una diminuzione sia dell'attività che del numero degli SGLT espressi (Moran et al., 1983). È stata anche dimostrata una stretta relazione tra iperglicemia, stress ossidativo e SGLT attraverso meccanismi che coinvolgono la deplezione di ATP e un'alterazione delle pompe Na^+/K^+ che portano ad uno squilibrio di ioni nei compartimenti intra ed extracellulare (Andreoli et al., 1993).

L'effetto positivo della POE sulle cellule intestinali è stato confermato dai nostri dati che hanno dimostrato un'aumentata espressione di proteine coinvolte nella regolazione dell'integrità della barriera intestinale come ZO-1 (Zonula

occludens protein 1) nelle cellule trattate in condizioni di iperglicemia. ZO-1 è una componente delle giunzioni strette (TJ, tight junction) che connettono tra loro gli enterociti e svolge quindi un ruolo cruciale nel mantenimento della struttura delle TJ e della funzione di barriera epiteliale (Lagha, A.B. and Grenier, D., 2019).

Precedenti studi hanno dimostrato che la *Posidonia oceanica* è una fonte di metaboliti secondari bioattivi (Vasari et al., 2021). Pertanto, suggeriamo che i composti polifenolici presenti nella pianta possano svolgere un ruolo chiave nei meccanismi molecolari coinvolti nell'effetto protettivo della *Posidonia oceanica* contro lo stress glico-ossidativo nelle cellule trattate con alte concentrazioni di glucosio. In un precedente studio, è stato dimostrato un ruolo protettivo dei polifenoli della mela contro il danno glico-ossidativo indotto dall'esposizione cronica al glucosio nelle cellule Caco-2. È stato riportato che i composti fenolici possono ridurre lo stress glico-ossidativo attraverso molte vie, tra cui una minor produzione di ROS durante il processo di glicazione, l'intrappolamento di specie dicarboniliche reattive e un aumento generale della capacità antiossidante e dei livelli di glutazione (Cianfruglia et al., 2020).

Studi precedenti hanno dimostrato che i composti bioattivi presenti nella POE sono in grado di inibire i processi di glicazione non enzimatica *in vivo* in ratti diabetici (Gokce G. and Haznedaroglu M.Z., 2007). Inoltre, l'attività

antiossidante, antiradicalica e antiinfiammatoria dei polifenoli dalle foglie di PO è stata precedentemente riportata attraverso alcuni studi effettuati *in vitro* sulla linea di macrofagi murini RAW264.7 attivati dal lipopolisaccaride (LPS): una riduzione dei livelli di iNOS (ossido nitrico sintetasi inducibile), di COX-2 (cicloossigenasi 2) e del fattore di trascrizione NF-kB (Vasarri et al., 2020). È ampiamente dimostrato che i polifenoli (come catechine e acidi fenolici che sono molto abbondanti in POE) sono in grado di modulare l'espressione genica, sia, come appena detto, agendo sui fattori di trascrizione come NF-kB, sia attraverso l'aumento di espressione e/o la produzione di numerose proteine delle TJ tra cui zonula occludens protein 1 (ZO-1), la cui alterazione può comportare un aumento della permeabilità paracellulare creando disfunzioni e malattie croniche dell'apparato digerente (IBD) (Lagha A.B. and Grenier D., 2019; Valdez et al., 2020).

In conclusione, la co-incubazione di POE in cellule intestinali sottoposte a trattamento ad alte concentrazioni di glucosio, è associata al ripristino dei parametri ROS, AGEs, espressione di PON2 alterati dalla condizione di stress glico-ossidativo. Inoltre, il trattamento con POE induce una modulazione positiva dell'espressione di proteine coinvolte nell'integrità della barriera intestinale e nell'assorbimento dei nutrienti (ZO-1, GLUT-2, SGLT1).

Questi risultati suggeriscono che la POE potrebbe avere un impatto sulle patologie cronico-degenerative indotte da stress glico-ossidativo, giocando un ruolo attivo nella prevenzione della disfunzione delle cellule intestinali.

BIBLIOGRAFIA

- **Ajith, T.A., Vinodkumar, P.** Advanced Glycation End Products: Association with the Pathogenesis of Diseases and the Current Therapeutic Advances. *Curr Clin Pharmacol* 11, 118-127, doi:10.2174/1574884711666160511150028 (2016)
- **Allaire JM, Crowley SM, Law HT, Chang SY, Ko HJ, Vallance BA.** The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol.* 39(9):677-696. doi: 10.1016/j.it.2018.04.002. (2018)
- **Altenhofer, S., Witte, I., Teiber, J.F., Wilgenbus, P., Pautz, A., Li, H., Daiber, A., Witan, H., Clement, A.M., Forstermann, U.** One enzyme, two functions: PON2 prevents mitochondrial superoxide formation and apoptosis independent from its lactonase activity. *J Biol Chem*, 285, 24398-24403, doi:10.1074/jbc.M110.118604 (2010)
- **Andrade N, Silva C, Martel F.** The effect of oxidative stress upon intestinal sugar transport: an in vitro study using human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Toxicol Res (Camb)*. 7(6):1236-1246. doi: 10.1039/c8tx00183a (2018)
- **Andreoli, S.P., McAteer, J.A., Seifert, S.A., Kempson, S.A.** Oxidant-induced alterations in glucose and phosphate transport in LLC-PK1 cells: mechanisms of injury. *Am J Physiol*, 265, F377-384, doi:10.1152/ajprenal.1993.265.3.F377 (1993)

- **Armstrong JA, Cash N, Soares PM, Souza MH, Sutton R, Criddle DN.** Oxidative stress in acute pancreatitis: lost in translation? *Free Radic Res.* 47(11):917-33. doi: 10.3109/10715762.2013.835046 (2013).
- **Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S.** Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014:360438. doi: 10.1155/2014/360438 (2014)
- **Baek J, Lee MG.** Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. *Redox Rep.* 21(4):164-9. doi: 10.1179/1351000215Y.0000000015 (2016)
- **Barletta, E., Ramazzotti, M., Fratianni, F., Pessani, D., Degl'Innocenti, D.** Hydrophilic extract from *Posidonia oceanica* inhibits activity and expression of gelatinases and prevents HT1080 human fibrosarcoma cell line invasion. *Cell Adhes. Migr.* 9, 422–431. <https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1008330> (2015)
- **Batanouny, K.H.** *Wild Medicinal Plants in Egypt*; Academy of Scientific Research and Technology: Cairo, Egypt (1999)
- **Bauer PV, Duca FA, Waise TMZ, Rasmussen BA, Abraham MA, Dranse HJ, Puri A, O'Brien CA, Lam TKT.** Metformin Alters Upper Small Intestinal Microbiota that Impact a Glucose-SGLT1-Sensing Glucoregulatory

Pathway. *Cell Metab.* 27(1):101-117.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2017.09.019

(2018)

- **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).
- **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)
- **Berfad, M.A., Alnour, T.M.S.** Phytochemical analysis and antibacterial activity of the 5 different extracts from the seagrasses *Posidonia oceanica*. *J. Med. Plant. Stud.* 2, 15–18 (2014)
- **Bernard P, Pesando D.** Antibacterial and antifungal activity of extracts from the rhizomes of the mediterranean seagrass *posidonia oceanica* (L.) Delile. *Botanica Marina*; 32:85-88; <http://dx.doi.org/10.1515/botm.1989.32.2.85> (1989)
- **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)
- **Boudouresque C.F., Meinesz A.** Découverte de l’herbier de Posidonie. *Cahier/Parc National de Port-Cros, Fr.*, 4: 1-81 (1982)
- **Boudouresque C.F., Bernard G., Bonhomme P., Charbonnel E., Diviacco G., Meinesz A., Pergent G., Pergent-Martini C., Ruitton S., Tunesi L.** Préservation et Conservation des herbiers à *Posidonia oceanica*. RAMOGE pub.: 1-202. (2006)
- **Boudouresque C.F., Jeudy de Grissac A., Meinesz A.** Relations entre la sédimentation et l’allongement des rhizomes orthotropes de *Posidonia oceanica* dans la baie d’Elbu (Corse). In: Boudouresque C.F., Jeudy deGrissac A., Olivier J. edits. *International Workshop on Posidonia oceanica beds.*, GIS Posidonie publ., Fr., 1: 185-191(1984)
- **Bourquard, N., Ng, C.J., Reddy, S.T.** Impaired hepatic insulin signalling in PON2-deficient mice: a novel role for the PON2/apoE axis on the macrophage inflammatory response. *Biochem J*, 436, 91-100, doi:10.1042/BJ20101891 (2011)
- **Brennan FM, Maini RN, Feldmann M.** Cytokine expression in chronic inflammatory disease. *Br Med Bull* 51:368–384 (1995)

- **Brownlee M.** Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 13;414(6865):813-20. doi: 10.1038/414813a (2001)
- **Buia M.C., Gambi M.C., Zupo V.** Structure and functioning of Mediterranean seagrass ecosystems: an overview. *Biologia Marina Mediterranea* 7: 167-190 (2000)
- **Cai R, Chen S, Jiang S.** Chlorogenic acid inhibits non-enzymatic glycation and oxidation of low density lipoprotein. *25;47(1):27-34* (2018)
- **Cannac M, Ferrat L, Barboni T, Pergent G, Pasqualini V.** The influence of tissue handling on the flavonoid content of the aquatic plant *Posidonia oceanica*. *J Chem Ecol*; 33:1083-8; <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-007-9290-5> (2007)
- **Cariello L, Zanetti L.** Effect of *Posidonia oceanica* extracts on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Botanica Marina*; 22:129-31; <http://dx.doi.org/10.1515/botm.1979.22.6.359> (1979)
- **Castell, J., and Gmez-Lechn, M.** *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*. Elsevier, 1966. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-163390-5.X5000-5>
- **Caye G., Meinez A.** Observations sur la floraison et la fructification de *Posidonia oceanica* dans la Baie de Villefranche et en Corse du sud. In:

- Boudouresque CF, Jeudy de Grissac A, Olivier J (eds) Int Workshop on Posidonia oceanica Beds 1. GIS Posidonie, Marseille: 193-201 (1984)
- **Chen X, Zhong Z, Xu Z, Chen L, Wang Y.** 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radic Res.* 44(6):587-604. doi: 10.3109/10715761003709802 (2010)
 - **Cheng YC, Sheen JM, Hu WL, Hung YC.** Polyphenols and Oxidative Stress in Atherosclerosis-Related Ischemic Heart Disease and Stroke. *Oxid Med Cell Longev.* 2017:8526438. doi: 10.1155/2017/8526438 (2017)
 - **Choi SW, Benzie IF, Ma SW, Strain JJ, Hannigan BM.** Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect? *Free Radic Biol Med.* 44(7):1217-31. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.005 (2008)
 - **Chuyen NV.** Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: on the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. *Mol Nutr Food Res.*;50(12):1140-9. doi: 10.1002/mnfr.200600144 (2006)
 - **Cianfruglia L, Morresi C, Bacchetti T, Armeni T, Ferretti G.** Protection of Polyphenols against Glyco-Oxidative Stress: Involvement of Glyoxalase Pathway. *Antioxidants (Basel)*; 9(10):1006. doi:10.3390/antiox9101006 (2020)

- **Cornara, L., Pastorino, G., Borghesi, B., Salis, A., Clericuzio, M., Marchetti, C., Damonte, G., Burlando, B.** Posidonia oceanica (L.) Delile Ethanolic Extract Modulates Cell Activities with Skin Health Applications. *Mar. Drugs*, 16, 21; doi:10.3390/md16010021 (2018)
- **Crascì L, Lauro MR, Puglisi G, Panico A.** Natural antioxidant polyphenols on inflammation management: Anti-glycation activity vs metalloproteinases inhibition. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 13;58(6):893-904. doi: 10.1080/10408398.2016.1229657 (2018)
- **Cumby BC, Hermayer KL.** Current concepts in targeted therapies for the pathophysiology of diabetic microvascular complications. *Vasc Health Risk Manag*. 3(6):823-32 (2007)
- **Daenen K, Andries A, Mekahli D, Van Schepdael A, Jouret F, Bammens B.** Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.*;34(6):975-991. doi: 10.1007/s00467-018-4005-4 (2019)
- **Dandekar A, Mendez R, Zhang K.** Cross talk between ER stress, oxidative stress, and inflammation in health and disease. *Methods Mol Biol*. 2015;1292:205-14. doi: 10.1007/978-1-4939-2522-3_15 (2015)
- **Davalli P, Mitic T, Caporali A, Lauriola A, D'Arca D.** ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related

Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2016:3565127. doi: 10.1155/2016/3565127 (2016)

- **Den Hartog C.** The seagrasses of the world. North Holland Publishing Company, Amsterdam (1970)
- **Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P.** Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients*. 19;13(1):273. doi: 10.3390/nu13010273 (2021)
- **Dixon RA, Pasinetti GM.** Flavonoids and isoflavonoids: from plant biology to agriculture and neuroscience. *Plant Physiol*. 154(2):453-7. doi: 10.1104/pp.110.161430 (2010)
- **Dokladny K, Zuhl MN, Moseley PL.** Intestinal epithelial barrier function and tight junction proteins with heat and exercise. *J Appl Physiol*;120(6):692-701. doi: 10.1152/jappphysiol.00536.2015 (1985)
- **Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F.** Hyperglycemia-induced mitochondrial super-oxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97:12222 – 6 (2000)

- **Dumay O, Costa J, Desjobert JM, Pergent G.** Variations in the concentration of phenolic compounds in the seagrass *Posidonia oceanica* under conditions of competition. *Phytochemistry*; 65:3211-20 (2005)
- **Duni A, Liakopoulos V, Roumeliotis S, Peschos D, Dounousi E.** Oxidative Stress in the Pathogenesis and Evolution of Chronic Kidney Disease: Untangling Ariadne's Thread. *Int J Mol Sci.* 29;20(15):3711. doi: 10.3390/ijms20153711 (2019)
- **E. Turk, MG. Martín; EM. Wright,** Structure of the human Na⁺/glucose cotransporter gene SGLT1. *J Biol Chem*, vol. 269, n. 21, pp. 15204-9 (1994)
- **El Din, N.G.S.; El-Sherif, Z.M.** Nutritional value of *Cymodocea nodosa* and *Posidonia oceanica* along the western Egyptian Mediter- ranean coast. *Egypt. J. Aquat. Res.* 39, 153–165 (2013)
- **Eng QY, Thanikachalam PV, Ramamurthy S.** Molecular understanding of Epigallocatechin gallate (EGCG) in cardiovascular and metabolic diseases. *J Ethnopharmacol.* 210:296-310. doi: 10.1016/j.jep.2017.08.035 (2018)
- **Farid, M.M., Marzouk, M.M., Hussein, S.R., Elkhateeb, A., Abdel-Hameed, E.S.** Comparative study of *Posidonia oceanica* L.: LC/ESI/MS analysis, cytotoxic activity and chemosystematic significance. *J. Mater. Environ. Sci.* Volume 9, Issue 6, Page 1676-1682
<https://doi.org/10.26872/jmes.2018.9.6.187> (2018)

- **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)
- **Fonseca M.S., Koehl M.A.R., Kopp B. S.** Biomechanical factors contributing to self-organization in seagrass landscapes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 340 :227–246 (2007)
- **Fu Y, Zhang Y, Soladoye OP, Aluko RE.** Maillard reaction products derived from food protein-derived peptides: insights into flavor and bioactivity. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 60(20):3429-3442. doi: 10.1080/10408398.2019.1691500 (2020)
- **Giraud G.** Sur une methode de mesure et de comptage des structures foliaires de *Posidonia oceanica* (Linnaeus) Delile. *Bulletin du muséum d’histoire naturelle Marseilles*, 39: 33-39 (1979)
- **Gokce G, Haznedaroglu MZ.** Evaluation of antidiabetic, antioxidant and vasoprotective effects of *Posidonia oceanica* extract. *J Ethnopharmacol*; 115:122- 30; <http://dx.doi.org/10.1016/j> (2007)
- **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).

- **Grosso A. e Marra M.** Polifenoli, biodisponibilità e nutrizione.
- **Grune T, Sommerburg O, Siems WG.** Oxidative stress in anemia. Clin Nephrol; 53(1 Suppl):S18-22 (2000)
- **Gugnoni, M., Sancisi, V., Manzotti, G., Gandolfi, G., Ciarrocchi, A.** Autophagy and epithelial-mesenchymal transition: An intricate interplay in cancer. Cell Death Dis., 7, e2520 (2016)
- **Halliwell B, Zaho K, Whiteman M:** The gastrointestinal tract: A major site of antioxidant action? J Free Radical Res.; 33(6):819-830. (2000)
- **Hammami S, Salem AB, Ashour ML, Cheriaa J, Graziano G, Mighri Z.** A novel methylated sesquiterpene from seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile. Nat Prod Res; 27:1265-70; <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2012.725401> (2012)
- **Harman, D.** About “Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009”. Biogerontology 10, 783 <https://doi.org/10.1007/s10522-009-9253-z> (2009).
- **Haznedaroglu MZ, Zeybek U.** HPLC Determination of Chicoric Acid in Leaves of *Posidonia oceanica*. Pharm Biol; 45: 745-8; <http://dx.doi.org/10.1080/13880200701585717> (2007)
- **Heglmeier, A., Zidorn, C.** Secondary metabolites of *Posidonia oceanica* (Posidoniaceae). Biochem. Syst. Ecol. 38, 964–970 (2010)

- **Heip C.** Un océan de diversité. *Biofutur*, 179, 12-17 (1998)
- **Herrera E, Barbas C.** Vitamin E: action, metabolism and perspectives, in *J Physiol Biochem*, vol. 57, n. 2, pp. 43-56 (2001)
- **Hnasko TS, Hnasko RM.** The Western Blot. *Methods Mol Biol.* 1318:87-96. doi: 10.1007/978-1-4939-2742-5_9 (2015)
- **Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MC, Rahu N.** Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev.* 2016:7432797. doi: 10.1155/2016/7432797 (2016)
- **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)
- **Ivanov IV, Mappes T, Schaupp P, Lappe C, Wahl S.** Ultraviolet radiation oxidative stress affects eye health. *J Biophotonics*;11(7):e201700377. doi: 10.1002/jbio.201700377 (2018)
- **Kaneto H, Matsuoka TA, Katakami N, Kawamori D, Miyatsuka T, Yoshiuchi K, Yasuda T, Sakamoto K, Yamasaki Y, Matsuhisa M.** Oxidative stress and the JNK pathway are involved in the development of type 1 and type 2 diabetes. *Curr Mol Med.* 7(7):674-86. doi: 10.2174/156652407782564408 (2007)

- **Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL.** Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 18;19(11):42. doi: 10.1007/s11883-017-0678-6 (2017)
- **Kellett GL, Brot-Laroche E.** Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. *Diabetes.* 54(10):3056-62. doi: 10.2337/diabetes.54.10.3056 (2005)
- **Kessenbrock, K.; Plaks, V.; Werb, Z.** Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell,* 141, 52–67 (2010)
- **Khan M, Liu H, Wang J, Sun B.** Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advance glycation end products: A comprehensive review. *Food Res Int.* 130:108933. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108933 (2020)
- **Khan SR.** Stress oxidative: nephrolithiasis and chronic kidney diseases. *Minerva Med;*104(1):23-30 (2013)
- **Klaunig JE.** Oxidative Stress and Cancer. *Curr Pharm Des;* 24(40):4771-4778. doi: 10.2174/1381612825666190215121712 (2018)
- **Kwaan HC, McMahon B.** The role of plasminogen- plasmin system in cancer. *Cancer Treat Res;* 148:43-66; [http://dx.doi.org/ 10.1007/978-0-387-79962-9_4](http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-79962-9_4) (2009)

- **Lagha, A.B.; Grenier, D.** Tea polyphenols protect gingival keratinocytes against TNF-alpha-induced tight junction barrier dysfunction and attenuate the inflammatory response of monocytes/macrophages. *Cytokine*, 115, 64-75, doi:10.1016/j.cyto.2018.12.009 (2019)
- **Lapolla A, Fedele D, Traldi P.** Glyco-oxidation in diabetes and related diseases. *Clin Chim Acta.* 24;357(2):236-50. doi: 10.1016/j.cccn.2005.03.032 (2005)
- **Lecointre G., Le Guyader H.** Classification phylogénétique du vivant. Bélin publ., Paris, 1-543 (2001)
- **Lehmann A, Hornby PJ.** Intestinal SGLT1 in metabolic health and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1;310(11):G887-98. doi: 10.1152/ajpgi.00068.2016 (2016)
- **Levy E, Trudel K, Bendayan M, Seidman E, Delvin E, Elchebly M, Lavoie JC, Precourt LP, Amre D, Sinnott 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(6):G1252-61. doi: 10.1152/ajpgi.00369.2007 (2007)
- **Loftus, E. V. Jr.** Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126, 1504–1517 (2004)

- **Lotti, G., Paradossi, C.** Chemical composition of *Posidonia oceanica* leaves [sea algae]. *Rivista della Societa Italiana di Scienza dell'Alimentazione*, 0391-4887. http://aims.fao.org/aos/agrovoc/c_13439 (1979)
- **Luc K, Schramm-Luc A, Guzik TJ, Mikolajczyk TP.** Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *J Physiol Pharmacol.* 70(6). doi: 10.26402/jpp.2019.6.01 (2019)
- **Ma L, Gao HQ, Li BY, Ma YB, You BA, Zhang FL.** Grape seed proanthocyanidin extracts inhibit vascular cell adhesion molecule expression induced by advanced glycation end products through activation of peroxisome proliferators-activated receptor gamma. *J Cardiovasc Pharmacol*; 49(5):293-8. doi: 10.1097/FJC.0b013e31803c5616 (2007)
- **Mackness, B., Beltran-Debon, R., Aragonés, G., Joven, J., Camps, J. and Mackness, M.** Human tissue distribution of paraoxonases 1 and 2 mRNA. *IUBMB Life*, 62: 480–482. doi: 10.1002/iub.347 (2010)
- **Marnett LJ.** Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* 8;424(1-2):83-95. doi: 10.1016/s0027-5107(99)00010-x (1999)
- **Mathew B, Suresh J, Mathew GE, Parasuraman R, Abdulla N.** Plant secondary metabolites- potent inhibitors of monoamine oxidase isoforms. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 14(1):28-33. doi: 10.2174/1871524914666140826111930 (2014)

- **Mazzella L., Scipone M.C., Fresi E., Buia M.C., Russo G.F., De Mario R., Lorenti M., Rando A.** Le praterie sommerse del Mediterraneo. La Buona Stampa S.p.a, Ercolano (IT): 59 pp. (1986)
- **McLeod, E., Chmura, G.L., Bouillon, S., Salm, R., Björk, M., Duarte, C.M., Lovelock, C.E., Schlesinger, W.H., Silliman, B.R.** A blueprint for blue carbon: toward an improved understanding of the role of vegetated coastal habitats in sequestering CO₂. *Frontiers in Ecology and the Environment* 9, 552–560 (2011)
- **Micheli, L., Vasarri, M., Barletta, E., Lucarini, E., Ghelardini, C., Degl’Innocenti, D., Di Cesare Mannelli, L.** Efficacy of *Posidonia oceanica* Extract against Inflammatory Pain: In Vivo Studies in Mice. *Mar. Drugs*, 19, 48. [https:// doi.org/10.3390/md19020048](https://doi.org/10.3390/md19020048) (2021)
- **Misurcova, L.; Machu, L.; Orsavova, J.** Seaweed minerals as nutraceuticals. *Adv. Food Nutr. Res.* 64, 371–390 (2011)
- **Mitra S, Deshmukh A, Sachdeva R, Lu J, Mehta JL.** Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy. *Am J Med Sci.* 342(2):135-42. doi: 10.1097/MAJ.0b013e318224a147 (2011)
- **Molenaar, H., Barthelemy D., De Reffy E P., Meinesz A., Mialet I.** Modelling architecture and growth patterns of *Posidonia oceanica*, *Aquatic Botany*, 66: 85-99 (2000)

- **Moliner R., Picard J.** Recherches sur les herbiers de Phanérogames marines du littoral méditerranéen français. *Annales de l'institut océanographique*, 27(3): 157-234 (1952)
- **Molodecky, N.A., and Kaplan G.G.** Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Hepatol. (N.Y.)* 6, 339–346 (2010).
- **Montefalcone M.** Ecosystem health assessment using the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*: a review. *Ecological Indicators*, 9: 595-604 (2009)
- **Moran, A., Turner, R.J., Handler, J.S.** Regulation of sodium-coupled glucose transport by glucose in a cultured epithelium. *J Biol Chem*, 258, 15087-15090 (1983)
- **Morresi C, Cianfruglia L, Sartini D, Cecati M, Fumarola S, Emanuelli M, Armeni T, Ferretti G, Bacchetti T.** Effect of High Glucose-Induced Oxidative Stress on Paraoxonase 2 Expression and Activity in Caco-2 Cells. *Cells*. 8(12):1616. doi: 10.3390/cells8121616 (2019)
- **Ndrepepa G.** Myeloperoxidase - A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*. 493:36-51. doi: 10.1016/j.cca.2019.02.022 (2019)

- **Nihal T, Sedat V, Ferda S, Gokce P.** Contents and Antioxidant and Antibacterial Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Activities of Black Tea. *Molecules*, 12(3), 484-496 (2007)
- **Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N.** Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun.* 9;338(1):668-76. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.072 (2005)
- **Novak E.A. and Mollen K.P.** Mitochondrial dysfunction in inflammatory bowel disease. *Front. Cell Dev. Biol.* (2015)
- **Ornatowski W, Lu Q, Yegambaram M, Garcia AE, Zemskov EA, Maltepe E, Fineman JR, Wang T, Black SM.** Complex interplay between autophagy and oxidative stress in the development of pulmonary disease. *Redox Biol*; 36:101679. doi: 10.1016/j.redox.2020.101679 (2020)
- **Padayatty S, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta S, Levine M.** Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention, in *J Am Coll Nutr*, vol. 22, n. 1, pp. 18-35 (2003)
- **Peng CH, Chyau CC, Chan KC, Chan TH, Wang CJ, Huang CN.** Hibiscus sabdariffa polyphenolic extract inhibits hyperglycemia, hyperlipidemia, and glycation-oxidative stress while improving insulin resistance. *J Agric Food Chem.* 28;59(18):9901-9. doi: 10.1021/jf2022379 (2011)

- **Percário S, Moreira DR, Gomes BA, Ferreira ME, Gonçalves AC, Laurindo PS, Vilhena TC, Dolabela MF, Green MD.** Oxidative stress in malaria. *Int J Mol Sci.* 3;13(12):16346-72. doi: 10.3390/ijms131216346 (2012)
- **Pergent G., Romero J., Pergent-Martini C., Mateo M.A., Boudouresque C.F.** Primary production, stocks and fluxes in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Marine Ecology Progress Series*, 106: 139-146 (1994)
- **Pergent-Martini C, Pergent G.** Spatiotemporal dynamics of *Posidonia oceanica* beds near a sewage outfall (Mediterranean-France) in: *Seagrass Biology: proceedings of an international workshop*. Eds John Kuo, Ronald C. Phillips, Diana I. Walker, Hugh Kirkman. Rottneest Island, Western Australia, pp 299-306 (1996)
- **Phull AR, Nasir B, Haq IU, Kim SJ.** Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis. *Chem Biol Interact.* 1;281:121-136. doi: 10.1016/j.cbi.2017.12.024 (2018)
- **Piva, G., Fracassetti, D., Tirelli, A., Mascheroni, E., Musatti, A., Inglese, P., Piergiovanni, L., Rollini, M.** Evaluation of the antioxidant/antimicrobial performance of *Posidonia oceanica* in comparison with three commercial

- natural extracts and as a treatment on fresh-cut peaches (*Prunus persica* Batsch). *Postharvest. Biol. Tec.* 124, 54–61 (2017)
- **Porter, A.G.; Janicke, R.U.** Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, 6, 99-104, doi:10.1038/sj.cdd.4400476 (1999)
 - **Precourt, L.P.; Marcil, V.; Ntimbane, T.; Taha, R.; Lavoie, J.C.; Delvin, E.; Seidman, E.G.; Beaulieu, J.F.; Levy, E.** Antioxidative properties of paraoxonase 2 in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 303, G623-634, doi:10.1152/ajpgi.00039.2012 (2012)
 - **Procaccini G., Maltagliati F.** Methodological approaches to the analysis of genetic diversity in benthic organisms. In: Gambi., M.C., Dappiano., M. (Eds.), *Methods for sampling and study of Mediterranean marine benthos.* *Bio Mar Med* pp. 481–519 (2004)
 - **Pytliak M, Vargovà V, Mechùrovà V.** Matrix metallo- proteinases and their role in oncogenesis: a review. *Onkologie*; 35:49-53; <http://dx.doi.org/10.1159/000336304> (2012)
 - **Rasheed Z, Anbazhagan AN, Akhtar N, Ramamurthy S, Voss FR, Haqqi TM.** Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits advanced glycation end product-induced expression of tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase-13 in human chondrocytes. *Arthritis Res Ther*;11(3):R71. doi: 10.1186/ar2700 (2009)

- **Rasheed Z, Haqqi TM.** Update on Targets of Biologic Therapies for Rheumatoid Arthritis. *Curr Rheumatol Rev.* 1;4(4):246. doi: 10.2174/157339708786263915 (2008)
- **Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G.** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med;* 20(7):933-56. doi: 10.1016/0891-5849(95)02227-9 (1996)
- **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)
- **Röder PV, Geillinger KE, Zietek TS, Thorens B, Koepsell H, Daniel H.** The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. *PLoS One.* 9(2):e89977. doi: 10.1371/journal.pone.0089977 (2014)
- **Rohr MW, Narasimhulu CA, Rudeski-Rohr TA, Parthasarathy S.** Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Adv Nutr.* 11(1):77-91. doi: 10.1093/advances/nmz061 (2020)
- **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, 730-739, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.003 (2007)

- **Rotini, A., Chiesa, S., Manfra, L., Borrello, P., Piermarini, R., Silvestri, C., Cappucci, S., Parlagreco, L., Devoti, S., Pisapia, M., Creo, C.; Mezzetti, T., Scarpato, A., Migliore, L.** Effectiveness of the “Ecological Beach” Model: Beneficial Management of Posidonia Beach Casts and Banquette. *Water*, 12, 3238. <https://doi.org/10.3390/w12113238> (2020)
- **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, doi:10.1136/gut.2006.107953 (2006)
- **Sarmah S, Pahari S, Das S, Belwal VK, Jana M, Singha Roy A.** Non-enzymatic glycation of human serum albumin modulates its binding efficacy towards bioactive flavonoid chrysin: A detailed study using multi-spectroscopic and computational methods. *J Biomol Struct Dyn*; 39(2):476-492. doi: 10.1080/07391102.2019.1711196 (2021)
- **Scalbert A, Zamora-Ros R.** Bridging evidence from observational and intervention studies to identify flavonoids most protective for human health. *Am J Clin Nutr.* x101(5):897-8. doi: 10.3945/ajcn.115.110205 (2005)
- **Shanli Peng, Genyi Zhang.** Influence of Tea Polyphenols on the Formation of Advanced Glycation End Products (AGEs) in vitro and in vivo. *Journal of*

Food and Nutrition Research, Vol. 2, No. 8, 524-531 DOI:10.12691/jfnr-2-8-15 (2014)

- **Shen Y, Liu X, Shi J, Wu X.** Involvement of Nrf2 in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Int J Biol Macromol.* 15;125:496-502. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.190 (2019)
- **Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S.** Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules.* 22;24(8):1583. doi: 10.3390/molecules24081583 (2019)
- **Singh, V.P., Bali, A., Singh, N., Jaggi, A.S.** Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 18, 1–14. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.1.1> (2014)
- **Smith BJ.** SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods Mol Biol.*1:41-55. doi: 10.1385/0-89603-062-8:41 (1984)
- **Sopjani M.** The AMP activated protein kinase in the regulation of sodium coupled transporters (SGLT1, EAAT3 & EAAT4) and eryptosis (2010)
- **Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME.** Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev;* 12(1):376-90. doi: 10.1016/j.arr.2012.10.004 (2013)

- **Sternlicht MD, Werb Z.** How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 17:463-516. doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.463 (2001)
- **Taniguchi N, Kizuka Y, Takamatsu S, Miyoshi E, Gao C, Suzuki K, Kitazume S, Ohtsubo K.** Glyco-redox, a link between oxidative stress and changes of glycans: Lessons from research on glutathione, reactive oxygen and nitrogen species to glycobiology. *Arch Biochem Biophys*. 595:72-80. doi: 10.1016/j.abb.2015.11.024 (2016)
- **Tessier FJ.** The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathol Biol (Paris)*. 58(3):214-9. doi: 10.1016/j.patbio.2009.09.014 (2010)
- **Thaiss CA, Levy M, Grosheva I, Zheng D, Soffer E, Blacher E, Braverman S, Tengeler AC, Barak O, Elazar M, Ben-Zeev R, Lehavi-Regev D, Katz MN, Pevsner-Fischer M, Gertler A, Halpern Z, Harmelin A, Aamar S, Serradas P, Grosfeld A, Shapiro H, Geiger B, Elinav E.** Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Science*. 23;359(6382):1376-1383. doi: 10.1126/science.aar3318 (2018)
- **Thaiss M et al.** Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection *Science* (2019)

- **Thorens B.** GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia*. 58(2):221-32. doi: 10.1007/s00125-014-3451-1 (2015)
- **Tian T, Wang Z, Zhang J.** Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. *Oxid Med Cell Longev*; 2017:4535194. doi: 10.1155/2017/4535194 (2017)
- **Tsimihodimos V, Filippas-Ntekouan S, Elisaf M.** SGLT1 inhibition: Pros and cons. *Eur J Pharmacol*. 5;838:153-156. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.09.019 (2018)
- **Valdez, J.C.; Cho, J.; Bolling, B.W.** Aronia berry inhibits disruption of Caco-2 intestinal barrier function. *Arch Biochem Biophys*, 688, 108409, doi:10.1016/j.abb.2020.108409 (2020)
- **Vasarri, M., Barletta, E., Ramazzotti, M., Degl’Innocenti, D.** In vitro anti-glycation activity of the marine plant *Posidonia oceanica* (L.) T Delile. 0378-8741/Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112960> (2020)
- **Vasarri, M.; Leria, M.; Barletta, E.; Ramazzotti, M.; Marzocchinia, R.; Degl’Innocenti, D.** Anti-inflammatory properties of the marine plant *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *J. Ethnopharmacol*, 247, 112252. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112252> (2020)
- **Vasarri, M.; De Biasi, A.M.; Barletta, E.; Pretti, C.; Degl’Innocenti, D.** An Overview of New Insights into the Benefits of the Seagrass *Posidonia*

oceanica for Human Health. *Mar. Drugs*,19,476. [https://doi.org/](https://doi.org/10.3390/md19090476)

10.3390/md19090476 (2021)

- **Viso, A.C.; Pesando, D.; Bernard, P.; Marty, J.C.** Lipid Components of the Mediterranean Seagrass *Posidonia-Oceanica*. *Phytochemistry*, 34, 381–387 (1993)
- **Voyer LE, Alvarado C.** Reacción de Maillard. Efectos patogénicos. *Medicina (B Aires)*. 79(2):137-143 (2019)
- **Waharte F.** Dynamique du cytosquelette de la bordure en brosse des entérocytes: Etude par FRAP à deux photons (2002)
- **Walle T.** Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? *Semin Cancer Biol.* 17(5):354-62. doi: 10.1016/j.semcancer.2007.05.002 (2007)
- **Wang X, Quinn P.** Vitamin E and its function in membranes, in *Prog Lipid Res*, vol. 38, n. 4, pp. 309-36 (1999)
- **Wang, Q., Wang, H., Jia, Y., Ding, H., Zhang, L., Pan, H.** Luteolin reduces migration of human cell line via inhibition of the p-IGF-IR/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Oncol. Lett.* 14, 3545–3551 (2017)
- **Wellmann C.H., Osterloff P.L., Mohuddin U.** Fragments of the earliest land plants. *Nature*, 425: 282-285 (2003)

- **Wen L, Jiang Y, Yang J, Zhao Y, Tian M, Yang B.** Structure, bioactivity, and synthesis of methylated flavonoids. *Ann N Y Acad Sci.* 1398(1):120-129. doi: 10.1111/nyas.13350 (2017)
- **Wen S, Liao T.** Ephedrine causes liver toxicity in SD rats via oxidative stress and inflammatory responses. *Hum Exp Toxicol.* 40(1):16-24. doi: 10.1177/0960327120943938 (2021)
- **Witte, I., Foerstermann, U., Devarajan, A., Reddy, S.T., Horke, S.** Protectors or Traitors: The Roles of PON2 and PON3 in Atherosclerosis and Cancer. *J Lipids* 342806, doi:10.1155/2012/342806 (2012)
- **X. Liu, C. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, X. Wang,** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c, *Cell* 86 (1): 147-57 (1996)
- **Xia N, Daiber A, Förstermann U, Li H.** Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol.* 174(12):1633-1646. doi: 10.1111/bph.13492 (2017)
- **Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C.** The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients.* 10(11):1618. doi: 10.3390/nu10111618 (2018)
- **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. *Phytother. Res. Ptr*, 25, 659–667 (2011)
- **Zhang Q, Ames JM, Smith RD, Baynes JW, Metz TO.** A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *J Proteome Res.* 8(2):754-769. doi:10.1021/pr800858h (2009)

Siti web

- https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/sigma/cb_86010202
- <https://www.atcc.org/products/htb-37>
- <https://www.abcam.com/protocols/sample-preparation-for-western-blot#lysis-buffer>
- <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-quantitation/tools-for-protein>
- <https://www.bio-rad.com/it-it/product/chemidoc-xrs-system?ID=NINJHRKG4>
- <https://www.bio-rad.com/it-it/sku/1610374-precision-plus-protein-dual-color-standards-500-ul?ID=1610374>
- <https://www.rcsb.org/>

RINGRAZIAMENTI

Vorrei dedicare questo spazio a chi, con dedizione e pazienza, ha contribuito alla realizzazione di questo elaborato.

Un ringraziamento particolare va alla mia relattrice, la Professoressa Tiziana Bacchetti, che mi ha seguita, con disponibilità e professionalità, per la realizzazione dell'elaborato, fin dalla scelta dell'argomento.

Ringrazio di cuore la Dott.ssa Camilla Morresi e la Dott.ssa Luisa Bellachioma per i loro preziosi consigli, insegnamenti e per avermi affiancata durante tutto il percorso sperimentale e di stesura della tesi.

Ringrazio infinitamente mia madre e mio padre, per il loro immenso supporto datomi durante questi anni.

Un ringraziamento speciale a tutti i miei compagni di corso, con cui ho trascorso bellissimi momenti e, in particolare, a Camilla e ad Agnese, per essermi state accanto in qualsiasi momento con il loro supporto e i loro preziosi consigli, condividendo insieme qualsiasi momento di vita universitaria.

Grazie, infine, a tutte le persone che mi stanno accanto quotidianamente e che mi danno la forza per raggiungere tutti i miei obiettivi.

Ilaria Guidoni