



DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA
CURRICULUM SCIENZE DELLA NUTRIZIONE

DIABETE E HDL DISFUNZIONALI

Effetto della glicazione non enzimatica
sulle proprietà funzionali delle lipoproteine ad alta densità

Tesi di laurea di:
VALERIA DI TOMASO

Relatrice:
Chiar.ma Prof. GIANNA FERRETTI

Correlatrici:
Prof.ssa Tiziana Bacchetti
Dott.ssa Camilla Morresi

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

SOMMARIO

SOMMARIO.....	4
ABSTRACT.....	6
1 - INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI -	8
1.1 Proprietà strutturali e funzionali delle HDL	8
1.2 Composizione lipidica e apoproteica	10
1.3 Ruoli delle HDL.....	16
1.3.1 Trasporto del colesterolo.....	17
1.3.2 Proprietà antiossidanti.....	19
1.4 Alterazioni delle HDL nelle patologie umane	24
1.4.1 Diabete e glicazione delle HDL	25
1.4.2 Ossidazione delle HDL	36
1.4.3 Aterosclerosi	37
1.5 Scopo della tesi	40
2 - CAMPIONI E METODOLOGIE -	42
2.1 Separazione delle HDL	42
2.2 Quantificazione del contenuto in colesterolo delle HDL.....	42
2.3 Quantificazione delle proteine delle HDL	43
2.4 Glicazione delle HDL	45
2.4.1 Incubazione delle HDL con metilgliosale.....	45
2.4.2 Incubazione delle HDL con fruttosio.....	45
2.4.3 Incubazione delle HDL con ribosio	45
2.5 Analisi della fluorescenza intrinseca del triptofano.....	46
2.6 Analisi dei prodotti avanzati di glicazione (AGEs)	46
2.7 Valutazione della ipercromicità	48
2.8 Valutazione delle proprietà antiossidanti delle HDL mediante saggio della rodamina	49
2.9 Verifica della glicazione mediante TNBS.....	50
2.10 Valutazione dell'attività lattonasica della PON1	53

2.11 Analisi statistica	54
3 - RISULTATI SPERIMENTALI -.....	55
3.1 Analisi dei prodotti avanzati di glicazione (AGEs)	55
3.2 Analisi dei livelli di gruppi amminici liberi.....	59
3.3 Analisi della fluorescenza intrinseca del triptofano	61
3.4 Valutazione della ipercromicità	64
3.5 Valutazione delle proprietà antiossidanti delle HDL mediante saggio della rodamina	65
3.6 Studio dell'attività lattonasica della <i>Paraoxonasi-1</i>	70
4 - DISCUSSIONE -	71
5 - CONCLUSIONI -	80
BIBLIOGRAFIA.....	82

ABSTRACT

Il diabete mellito è una delle patologie con maggiore incidenza nella popolazione mondiale e causa di complicazioni ad alta mortalità che interessano vari distretti, in particolare il sistema cardiocircolatorio. L'iperglicemia cronica tipica del diabete accelera, mediante glicazione non enzimatica delle proteine, la formazione dei prodotti di glicazione avanzata (AGEs), composti coinvolti nello squilibrio di molteplici processi fisiologici. Tra le proteine soggette a glicazione vi sono quelle che costituiscono le HDL, le lipoproteine ad alta densità, note per il loro ruolo protettivo contro l'insorgenza di malattie cardiovascolari. Diversi studi *in vitro* hanno dimostrato l'efficacia del metilgliosale, del fruttosio e del ribosio nel glicare le proteine plasmatiche e intracellulari, causandone l'alterazione della struttura e delle funzioni. Oltre al glucosio, anche le concentrazioni dei suddetti composti glicanti risultano elevate nei soggetti affetti da diabete. Per comprendere gli effetti dell'iperglicemia cronica sulle lipoproteine ad alta densità, sono state disposte delle incubazioni di HDL isolate dal plasma con diverse concentrazioni di metilgliosale, fruttosio e ribosio e per un periodo massimo di 14 giorni. La presenza di AGEs nei campioni di HDL glicate è stata analizzata mediante lettura dell'emissione della fluorescenza a 413 nm. Le modificazioni strutturali delle componenti proteiche delle HDL sono state verificate attraverso l'analisi della variazione dell'emissione di fluorescenza del triptofano a 340 nm e dell'assorbanza a 280 nm (saggio dell'ipercromicità). L'avvenuta glicazione è stata confermata dalla quantificazione di gruppi amminici

liberi (non glicati), impiegando il composto TNBS. Infine, per dimostrare che la glicazione rende le HDL disfunzionali, sono stati eseguiti il test dell'ossidazione della diidrorodamina e l'analisi dell'attività dell'enzima paraoxonasi-1 delle HDL.

Questa ricerca ha confermato l'efficienza del metilgliosale (1 mM) come agente glicante delle lipoproteine ad alta densità. A concentrazioni maggiori (5 e 20 mM) anche fruttosio e ribosio hanno mostrato un effetto sulla struttura e sulla funzione delle HDL, non comportando, però, aumenti significativi nei livelli di AGEs. Sono necessarie, dunque, maggiori indagini per evidenziare i prodotti di glicazione avanzata che potenzialmente si formano dopo l'incubazione delle HDL con fruttosio e ribosio.

In conclusione, lo studio della glicazione condotta *in vitro* delle HDL si conferma un utile modello sperimentale per evidenziare modificazioni strutturali e funzionali delle HDL e per comprendere meglio i meccanismi molecolari che sono coinvolti nell'eziologia di complicanze cardiovascolari osservate nei pazienti diabetici.

1 - INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI -

Le lipoproteine ad alta densità, note anche come HDL (*High Density Lipoproteins*), sono una classe di lipoproteine plasmatiche responsabili di diversi processi alla base del mantenimento di un corretto stato di salute. Il ruolo protettivo è da attribuire a vari ruoli funzionali esercitati da questa classe lipoproteica. Tuttavia, le HDL in circolo sono sensibili a diversi fattori metabolici che provocano alterazione della loro composizione lipidica o apoproteica. Tali HDL vengono definite disfunzionali.

Lo scopo di questa tesi è quello di focalizzare l'attenzione su una delle possibili alterazioni a carico delle HDL, in particolare la glicazione che si verifica in soggetti diabetici in condizioni di iperglicemia. Diverse molecole possono contribuire alla glicazione (glucosio, gliosale, metilgliosale). L'alterazione composizionale subita in conseguenza della glicazione può comportare la riduzione delle loro proprietà antiossidanti e antiinfiammatorie e la loro conseguente partecipazione ai meccanismi molecolari alla base della insorgenza di patologie dismetaboliche e loro complicanze.

1.1 Proprietà strutturali e funzionali delle HDL

La struttura delle HDL è identica a quella di tutte le altre lipoproteine. Le HDL mature sono costituite da un nucleo idrofobico composto da lipidi apolari (trigliceridi e colesterolo esterificato) circondati da un monostato di fosfolipidi e colesterolo libero,

con inclusioni di molecole proteiche denominate apoproteine. Nel plasma umano, le HDL sono costituite da una popolazione altamente eterogenea di particelle di dimensioni comprese tra 5 e 17 nm e con una densità tra 1,063 e 1,210 g/ml [Kudinov VA et al., 2020]. La biogenesi delle HDL (*Figura 1*) [Kwok-Leung Ong et al., 2022] è un processo complesso e coinvolge diverse proteine plasmatiche [Zannis et al., 2004] e verrà trattata più nel dettaglio nel *paragrafo 1.3.1*. La prima fase della biogenesi delle HDL prevede la secrezione di apoA-I principalmente da parte del fegato e dell'intestino [Zannis et al., 1985]. L'apoA-I secreta interagisce funzionalmente con ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter*) e questa interazione porta al trasferimento di fosfolipidi cellulari e colesterolo all'apoA-I povera di lipidi. L'apoA-I, caricata di lipidi, viene gradualmente convertita in particelle discoidali arricchite di colesterolo non esterificato. L'esterificazione del colesterolo libero da parte dell'enzima lecitina/colesterolo aciltransferasi (LCAT) converte le particelle di HDL da discoidali a sferiche [Zannis et al. 2006]. Mutazioni specifiche nell'apoA-I interrompono passaggi specifici nel processo della biogenesi delle HDL e generano distinti fenotipi di HDL aberranti.

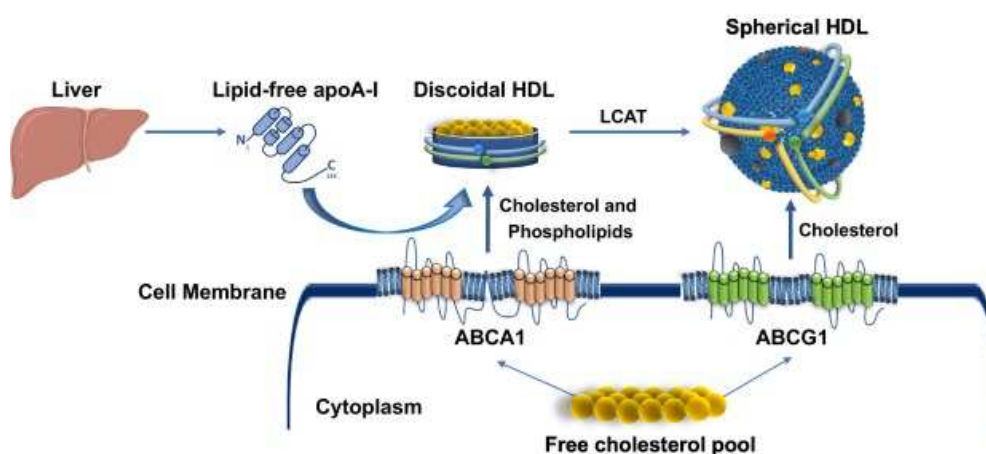


Figura 1: Biogenesi delle HDL

1.2 Composizione lipidica e apoproteica

Ricerche condotte negli ultimi anni hanno dimostrato che nelle particelle HDL possono essere presenti più di 200 diversi lipidi e oltre 85 proteine (*Tabella 1*) [Kudinov VA et al., 2020]. La composizione lipidica delle HDL isolate da soggetti normolipidemicici è stata studiata mediante FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*). È stata riportata l'eterogeneità basata sulla composizione di fosfolipidi e sfingolipi di cinque principali sottopopolazioni di HDL isolate da soggetti normolipidemicici. La fosfatidilcolina (PC) è il principale fosfolipide plasmatico (circa il 32-35% in moli dei lipidi totali) nelle HDL. Il PC è un lipide strutturale che si distribuisce tra le sottopopolazioni di HDL ed è arricchito in frazioni di acidi grassi polinsaturi. La lisofosfatidilcolina è un prodotto della degradazione della PC da parte delle fosfolipasi, tra cui la fosfatidilcolina-sterolo O-aciltransferasi (LCAT) e la fosfolipasi A2 (PLA2). La sfingomieline è il principale sfingolipide nelle HDL circolanti (5,6-6,6% molare della concentrazione lipidica totale). I suoi livelli sono inferiori del 30% in HDL piccole e dense rispetto a HDL di dimensioni maggiori. Tra i lisosfingolipidi, S1P (sfingosina-1-fosfato) svolge un ruolo chiave nella biologia vascolare. Più del 90% degli sfingolipidi circolanti si trovano nelle HDL e nelle frazioni contenenti albumina, dove S1P si associa a particelle HDL piccole e dense (arricchimento fino a dieci volte superiore rispetto alle HDL leggere).

Tabella 1a: Principali componenti lipidiche delle HDL

CLASSE LIPIDICA	CONTENUTO NELLE HDL (mol % di lipidi totali)
Fosfolipidi	37.4–49.3
Fosfatidilcolina	32–35
PC-plasmalogeno	2.2–3.5
LysoPC	1.4–8.1
Fosfatidiletalonamina	0.70–0.87
PE-plasmalogeno	0.54–0.87
Fosfatidilinositolo	0.47–0.76
Cardiolipina	0.077–0.201
Fosfatidilisterina	0.016–0.030
Fosfatidilglicerolo	0.004–0.006
Acido fosfatidico	0.006–0.009

Tabella 1b: Altre componenti lipidiche delle HDL

Sfingolipidi	5.7–6.9
Sfingomieline	5.6–6.6
Ceramide	0.022–0.097
Lipidi neutri	46.7–54.0
Esteri del colesterolo	35–37
Colesterolo libero	8.7–13.5
Trigliceridi	2.8–3.2
Digliceridi	0.17–0.28
Lipidi minori	
Acidi grassi liberi	16:0, 18:0, 18:1 ^a
PC contenente isoprostano	ND (IPGE2/D2-PC (36:4))

La composizione in apoproteine delle HDL è molto più complessa rispetto ad altre classi di lipoproteine (Tabella 2). È importante sottolineare che la composizione del proteoma delle HDL può dipendere dal metodo di isolamento. Infatti, l'ultracentrifugazione in soluzioni saline altamente concentrate ad alta forza ionica può rimuovere alcune proteine dalle HDL, mentre altri metodi di isolamento delle HDL (gel filtrazione, cromatografia di immunoaffinità, precipitazione) forniscono HDL ampiamente contaminate da proteine plasmatiche o sottopongono le HDL a condizioni non fisiologiche in grado di modificare la loro struttura e/o composizione (ad es. pH estremo e forza ionica coinvolti nella separazione per immunoaffinità).

Tabella 2a: Apolipoproteine associate alle HDL e loro funzioni

PROTEINE	PRINCIPALI FUNZIONI	KDa
Apolipoproteine		
ApoA-I	Apolipoproteina strutturale e funzionale principale. Interagisce con i recettori cellulari, attiva la lecitina-colesterolo aciltransferasi (LCAT) e presenta attività antiaterogenica.	28
ApoA-II	Apolipoproteina strutturale e funzionale.	17
ApoA-IV	Apolipoproteina strutturale e funzionale.	46
ApoC-I	Modulatore dell' attività di CETP, attivatore LCAT.	6.6
ApoC-II	Attivatore di LPL.	8.8
ApoC-III	Inibitore di LPL e della lipasi epatica.	8.8
ApoC-IV	Regolatore del metabolismo dei TG.	11
ApoD	Responsabile del legame e del trasporto di piccole molecole idrofobiche.	19
ApoE	Apolipoproteina strutturale e funzionale, ligando per LDL-R e LRP.	34
ApoF	Inibitore di CETP.	29
ApoJ	Legame di molecole idrofobiche e interazione con recettori cellulari.	70
ApoM	Lega piccole molecole idrofobe, soprattutto la sfingosina 1-fosfato e fosfolipidi ossidati.	25

Tabella 2b: Enzimi e proteine associati alle HDL e loro funzioni

Enzimi		
LCAT	Esterificazione del colesterolo in esteri di colesterolo.	63
PON1	Lattonasi Calcio-dipendente. Ruolo antiossidante.	43
PAF-AH (LpPLA2)	Idrolizza i fosfolipidi ossidati a catena corta. I macrofagi sono la fonte più importante dell'enzima circolante.	53
GSPx-3 (glutazione selenopersidasi 3)	Un componente del sistema di protezione contro il danno ossidativo delle molecole. Catalizza la reazione redox dei perossidi (perossido di idrogeno all'acqua o perossidi lipidici agli alcoli corrispondenti) con glutazione.	22
Proteine trasportatrici di lipidi		
PLTP	Conversione di HDL in particelle sempre più grandi, trasporto di LPS.	78
CETP	Scambio di CE e TG e omoscambio di PL tra HDL e lipoproteine contenenti ApoB.	74
Proteine della fase acuta		
Amiloide sierica A1	Proteina principale della fase acuta.	12
Amiloide sierica A4	Proteina minore in fase acuta.	15
Alpha-2-HSglycoprotein	Reagente negativo in fase acuta.	39
Catena alpha del fibrinogeno	Precursore della fibrina, cofattore nell'aggregazione piastrinica.	95
Componenti del complemento		
C3	Attivazione del complemento.	187
Inibitori delle proteinasi		
Alpha-1-antitripsina	Inibitore delle serin proteasi.	

L'ApoA-I circolante rappresenta una proteina anfipatica ed è sintetizzata e secreta dal fegato e dall'intestino tenue. L'apolipoproteina A-I è la principale proteina strutturale e funzionale delle HDL [Duriez et al., 1999]. Essa esercita diversi ruoli, come l'interazione con i recettori cellulari, l'attivazione della LCAT e le è stato attribuito anche un effetto antiossidante.

L'ApoA-II è la seconda maggiore apolipoproteina HDL (circa il 15-20% delle proteine HDL totali) [Shimano et al., 2009, 29]. L'ApoA-II è più idrofobica dell'ApoA-I e circola come un omodimero composto da due catene polipeptidiche identiche ed è sintetizzata prevalentemente nel fegato ma anche nell'intestino.

L'ApoA-IV è una l'apolipoproteina più idrofila che scambia facilmente tra le lipoproteine e circola in forma libera. L'ApoA-IV contiene tredici ripetizioni in tandem di 22 amminoacidi, nove delle quali presentano domini alfa-elica molte di queste eliche sono anfipatiche e possono fungere da domini leganti i lipidi. ApoA-IV è sintetizzata nell'intestino ed è secreta nel circolo sanguigno con i chilomicroni [Qu et al., 2019].

L'ApoCs è una famiglia di piccole apolipoproteine sintetizzate principalmente nel fegato. ApoC-I è la più piccola apolipoproteina che si associa sia con HDL che con VLDL e si scambia prontamente tra di loro. ApoC-I è coinvolta nell'attivazione di LCAT e inibisce la lipasi epatica e la proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CETP) [Kim et al, 2008].

L'ApoD è una glicoproteina principalmente associata alle HDL [Rassart et al., 2000]. Questa proteina è espressa in molti tessuti, tra cui fegato, rene, mammella, polmone, intestino. Non possiede una tipica struttura apolipoproteica e appartiene alla famiglia delle lipocaline, che comprende anche proteine leganti il retinolo, come la

lattoglobulina e l'uteroglobulina. Le lipocaline sono piccole proteine di trasferimento dei lipidi con identità di sequenza amminoacidica, ma presentano una struttura terziaria comune. Inoltre, ApoD trasporta piccoli

ligandi idrofobici. Nel plasma, l'ApoD compone omodimeri ed eterodimeri legati al disolfuro con ApoA-II.

L'ApoE è un componente glicoproteico strutturale e funzionale [Utermann et al., 1975]. L'apoE agisce come ligando per i recettori ApoB/ApoE e assicura l'interazione tra le lipoproteine e i glicosaminoglicani della superficie cellulare. L'ApoE è sintetizzata in molti tessuti, tra cui fegato, tessuti endocrini, sistema nervoso centrale e macrofagi.

1.3 Ruoli delle HDL

L'elevato numero di proteine associate alle HDL, insieme all'ampio spettro di funzioni, determinano la multifunzionalità di questa classe di lipoproteine e il loro contributo ai vari processi biologici (*Figura 2*). Oltre al loro ruolo nel trasporto inverso del colesterolo, è stato dimostrato che le HDL esercitano proprietà antiossidanti, modulano le risposte infiammatorie, le reazioni vasomotorie e la coagulazione del sangue, nonché mediano la risposta immunitaria. Le proteine e gli enzimi coinvolti nel ruolo pleiotropico delle HDL sono riassunti nella *Tabella 2*. Mentre le apolipoproteine e gli enzimi sono ampiamente riconosciuti come componenti funzionali chiave delle HDL, il ruolo delle proteine minori, principalmente quelle coinvolte nella regolazione del sistema del complemento, ha ricevuto una crescente attenzione solo di recente, principalmente come risultato dei progressi nelle tecnologie proteomiche. Nei

prossimi paragrafi verranno approfonditi il ruolo delle HDL nell'efflusso del colesterolo e le proprietà antiossidante e antiinfiammatorie.

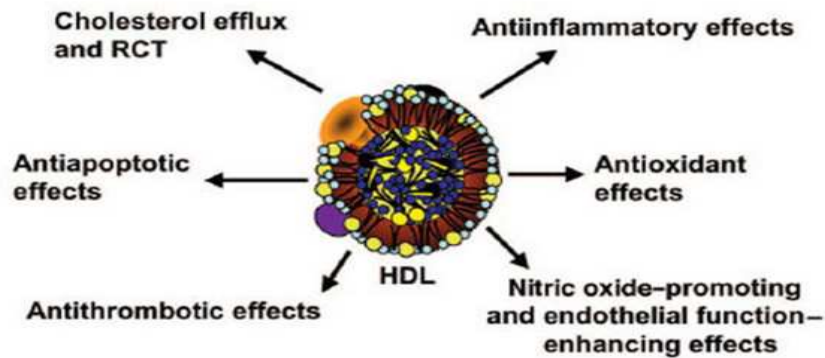


Figura 2: Ruoli funzionali delle HDL

1.3.1 Trasporto del colesterolo

La principale funzione svolta dalle HDL è il trasporto inverso del colesterolo (RCT: *reverse cholesterol transport*). Attraverso questo processo, il colesterolo dai tessuti periferici viene trasferito, ad opera dell'ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter, sub-family A, member 1*), alle HDL neoformate di forma discoidale, sulle quali la ApoA-I funge da accettore. Studi su animali modello, hanno evidenziato che l'aterosclerosi è aumentata in topi in cui il gene *ApoA-I* era scarsamente espresso. Tali dati confermano il ruolo della ApoA-I nel trasporto inverso del colesterolo. Durante il loro percorso nel circolo ematico, le HDL acquisiscono ulteriore colesterolo attraverso altri trasportatori di membrana, sempre appartenenti alla superfamiglia dei trasportatori di cassette leganti ATP, come ABCG1 e ABCG4. L'effetto cardioprotettivo delle HDL è attribuito in parte alla loro capacità di mobilizzare il colesterolo dai macrofagi della parete arteriosa (Figura 3) [Pownall et al., 2021], sui

quali ABCA1 e ABCG1 risultano altamente indotti quando il contenuto di colesterolo è in eccesso [Alto et al., 2008]. Al carico di colesterolo proveniente dai tessuti extraepatici, si aggiunge il colesterolo libero, che viene esterificato dall'enzima LCAT. A seguito dell'accumulo di colesterolo, le HDL aumentano le loro dimensioni e assumono una forma sferica, divenendo delle particelle mature (HDL₃ e HDL₂). Queste ultime vengono captate dal recettore SCARB1 (*scavenger receptor class B type*) sulla membrana degli epatociti, a cui rilasciano il colesterolo attraverso l'intervento delle lipasi. Il deficit di SCARB1 e l'espressione transgenica di LCAT nei topi ha portato ad aumenti significativi dei livelli di HDL ricche di colesterolo e del rischio di aterosclerosi, a causa della compromissione del meccanismo di RCT dai macrofagi [Berard et al., 1997]. Nel fegato, il colesterolo viene impiegato in diversi destini metabolici, tra cui la sintesi degli acidi biliari, successivamente secreti nella bile.

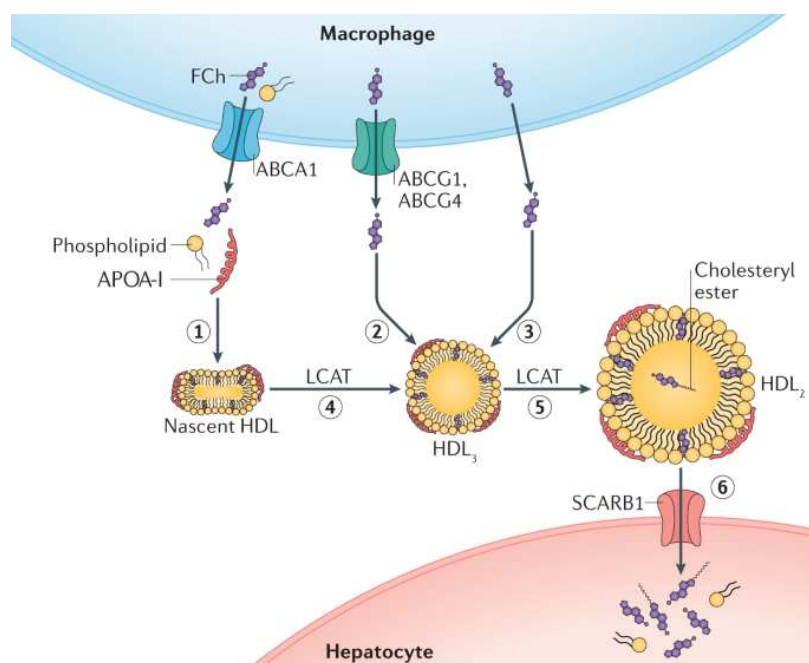


Figura 3: Trasporto inverso del colesterolo mediato dalle HDL

1.3.2 Proprietà antiossidanti

Le principali proteine delle HDL (ApoA-I e ApoA-II) e diversi enzimi associati alle HDL, contribuiscono al ruolo antiossidante delle lipoproteine ad alta densità. Tra gli enzimi, un ruolo antiossidante è attribuito alla paraoxonasi. La famiglia dei geni della paraoxonasi (PON), collocati sul braccio lungo del cromosoma 7 (7q21-7q22), comprende tre forme, PON1, PON2 e PON3. A differenza della paraoxonasi-3, che è principalmente presente all'interno delle cellule, PON1 e PON2 circolano nel flusso sanguigno legati alle HDL. PON1 è la forma maggiormente studiata: si tratta di una proteina costituita da 354 amminoacidi e con un peso molecolare di 43 kDa [Litvinov et al., 2012], sintetizzata nel fegato e trasferita sulle HDL dopo che queste sono aderite alla superficie dell'epatocita [Shokri et al., 2020]. La PON1 catalizza l'idrolisi di un'ampia gamma di substrati, tra cui organofosfati (es. il paraoxone che è il principale metabolita dell'insetticida *parathion* e da cui deriva il nome dell'enzima), gas nervini, lattoni, tiolactoni ed esteri aromatici [Levy et al., 2019] *in vitro*. Tuttavia, il suo substrato fisiologico non è ben definito.

L'analisi della struttura dell'enzima PON1, ottenuta mediante la tecnica della cristallografia a raggi X, ha permesso di identificare un'architettura a β -propeller, formato da sei foglietti beta ciascuno con quattro filamenti antiparalleli, e un canale centrale in cui sono alloggiati due ioni Ca^{2+} (Figura 4a). Lo ione calcio situato nella parte piú interna svolge un ruolo cruciale nel mantenimento della stabilit  conformazionale della PON1; l'altro ione, invece, si trova nel sito attivo dell'enzima e prende parte alle reazioni come cofattore. Molto importanti per il contatto con le HDL sono anche le tre regioni a α elica (Figura 4b) alla base del sito catalitico [Harel et al., 2004]. Questo enzima   legato alle HDL attraverso l'interazione dell'N-terminale idrofobico con i fosfolipidi e con l'ApoA-I. Per questo motivo, la composizione proteica ApoA delle HDL   essenziale per il legame con l'enzima PON1 [Sorenson et al., 1999]. *In vitro*, lo studio delle HDL ricostituite ha dimostrato che l'ApoA-I, a differenza della ApoA-II, stabilizza il legame HDL-PON1 [Gaidukov et al., 2005].

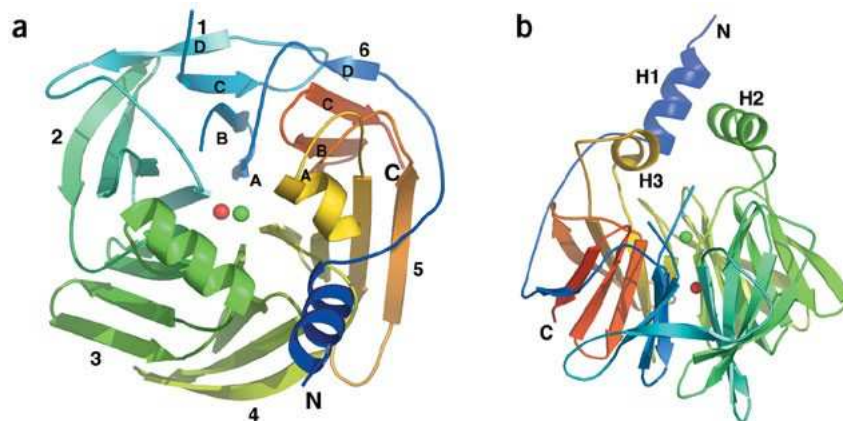


Figura 4: Struttura terziaria della Paraoxonasi-1. (a) Struttura β -propeller della PON1 e ioni Ca^{2+} nel canale centrale. (b) Le tre alfa eliche coinvolte nel legame con le HDL.

La PON1 è in grado di proteggere le LDL e le membrane biologiche dalla perossidazione lipidica. Si è ipotizzato che il ruolo protettivo sia da attribuire alla capacità di idrolizzare i lipidi ossidati come schematizzato in *Figura 5*.

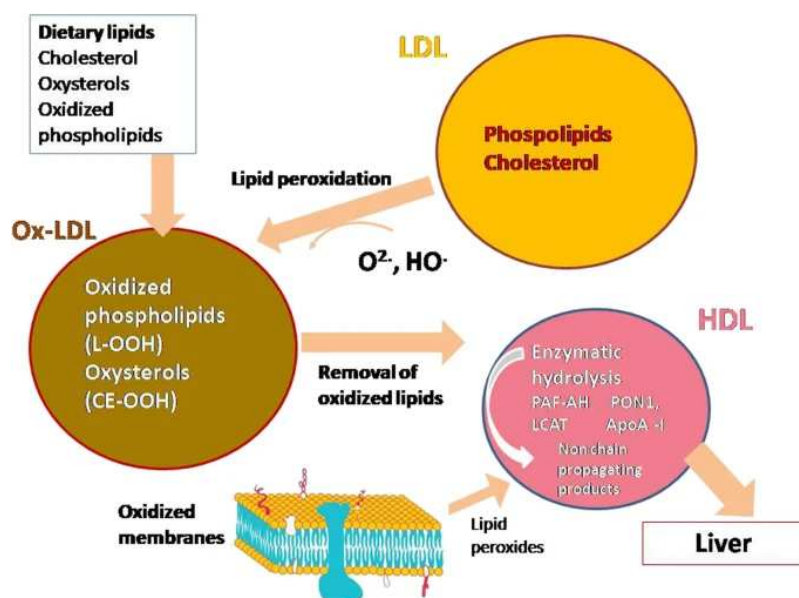


Figura 5: Ruolo delle HDL nel metabolismo degli idroperossidi lipidici

Studi condotti su modelli animali hanno consentito di confermare il ruolo protettivo svolto dalla PON1 nei confronti dello sviluppo dell'aterosclerosi. Infatti, topi transgenici *knockout* per il gene della PON1 hanno sviluppato aterosclerosi se alimentati con una dieta aterogena e le loro HDL, a differenza di quelli *wild-type*, non erano in grado di prevenire l'ossidazione delle LDL nelle cellule della parete arteriosa in coltura [Shih et al., 2000]. La funzione antiossidante della PON1, associata al meccanismo di trasporto delle molecole ossidate verso il fegato, garantisce un minor rischio di insorgenza o progressione dell'aterosclerosi [Mazzuferi et al., 2021]. Oltre

a queste proteine, anche la LCAT e il fattore di attivazione piastrinica acetil idrolasi (PAF-AH) possono contribuire all'attività antiossidante delle HDL [Brites et al., 2017]. Le Paraoxonasi agiscono a livello di molti substrati non correlati tra loro dal punto di vista strutturale (*Figura 6*). Come detto sopra, il ruolo fisiologico di PON-1 sembra essere quello di offrire protezione contro la tossicità di alcuni organofosfati; perciò, questi ultimi rappresentano un importante substrato dell'enzima e sono impiegato *in vitro* per valutarne l'attività. Nonostante non sia stato ancora definito quale sia il substrato “naturale” dell'enzima, la paraoxonasi mostra affinità per diversi composti [Taler-Verčič et al. 2020]. Le attività attribuite alla paraoxonasi sono:

- **Attività paraoxonastica:** il termine “paraoxonasi” deriva dalla capacità di questo enzima di idrolizzare il *paraoxone* (dietyl 4-nitrofenil fosfato), che in un primo momento era stato definito come esterasi. Il paraoxone è considerato un composto estremamente instabile e tossico, soprattutto per via inalatoria; per questo motivo le soluzioni di paraoxone devono essere maneggiate sotto cappa e da personale che abbia preso le dovute misure di precauzione. Al contatto con la pelle può determinare insorgenza di neoplasie.
- **Attività esterasica:** i substrati di questa attività sono gli esteri aromatici, tra cui si ricorda il fenilacetato. Quest'ultimo non è considerato tossico quanto il paraoxone, ma comunque è consigliata l'osservanza di adeguate misure di sicurezza e di essere maneggiato sotto cappa a flusso laminare. La velocità di idrolisi di PON-1 risulta essere superiore quando viene impiegato il fenilacetato come substrato piuttosto che il paraoxone.
- **Attività lattonasica:** i substrati sono rappresentati da un ampio spettro di lattoni, come: il 5-tiobutil butirrolattone, considerato non tossico, e la

diidrocumarina. Questa attività verrà approfondita nel capitolo sulle metodiche.

- **Attività omocisteina-lattonasica:** la paraoxonasi-1 è in grado di idrolizzare l'omocisteina tiolattone, che si forma a partire dall'omocisteina per mezzo dell'enzima metionali-tRNA sintetasi. Questo ruolo è particolarmente importante, in quanto l'omocisteina-tiolattone è un metabolita tossico dell'omocisteina. È stato stato dimostrato, infatti, che l'omocisteina-lattone aumenti il rischio di infarto del miocardio nei pazienti con malattia coronarica e promuova l'accumulo di amiloide beta, marker distintivo dell'Alzheimer [Jakubowski, 2023]. Inoltre, l'omocisteina-tiolattone provoca la N-omocisteinilazione delle proteine e, di conseguenza, la loro alterazione attraverso la formazione del legame ammidico con i gruppi amminici delle lisine [Yilmaz, 2012].

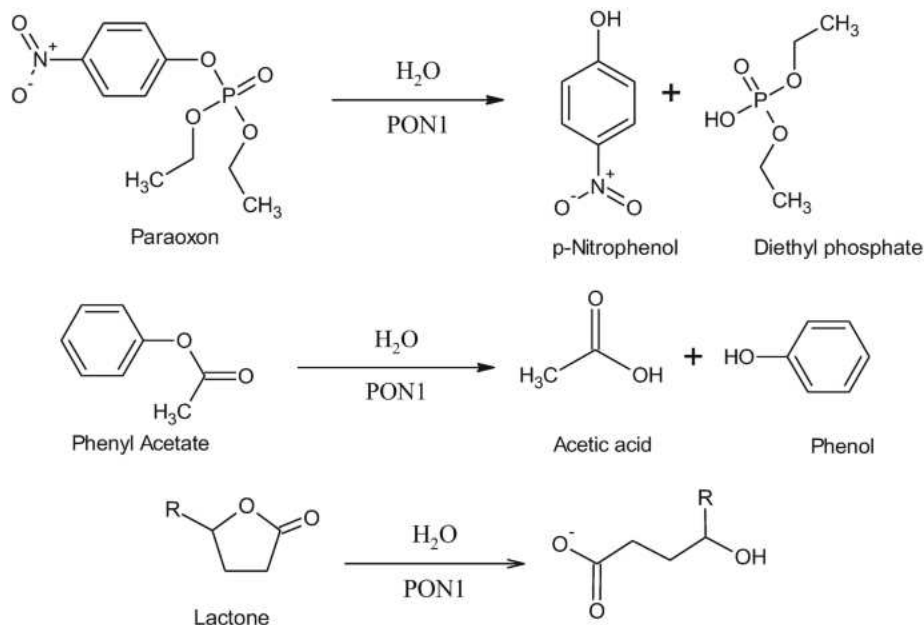


Figura 6: Substrati della Paraoxonasi-1

1.4 Alterazioni delle HDL nelle patologie umane

È ampiamente risaputo che il ruolo sia fisiologico che in condizioni patologiche delle HDL vada ben oltre il trasporto del colesterolo. Infatti, con il termine “funzionalità” delle HDL ci si riferisce ad una moltitudine di ruoli da esse esercitate [Kontush et al., 2015] e attribuite, come detto in precedenza, alle proteine associate alla loro superficie. Oltre ai ruoli precedentemente presentati, le HDL possono far aumentare la biodisponibilità di ossido nitrico (NO) endoteliale, una proprietà che consente di ridurre non solo lo stress ossidativo e l’infiammazione, ma anche l’espressione di marcatori di adesione da parte dell’endotelio e la migrazione dei monociti. Numerosi cambiamenti strutturali e funzionali delle HDL possono provocare la sua trasformazione da particella anti-aterogena ad un’equivalente pro-infiammatorio (*Figura 7*) [Bonizzi et al., 2021]. Come già citato, le molteplici funzioni delle HDL dipendono dalle componenti strutturali delle HDL, cioè proteine e lipidi complessi. Diversi studi suggeriscono che le lipoproteine ad alta densità siano suscettibili all’ossidazione, alla glicazione e all’omocistein-glicazione. Una vasta letteratura dimostra che, durante la loro vita in circolo, le HDL possono subire modificazioni composizionali che ne alterano struttura e funzioni. Queste modifiche a carico delle HDL possono avvenire a seguito di processi infiammatori o a causa di specifiche condizioni dovute a patologie in corso [Ferretti et al., 2006, 184]; inoltre, anche fattori genetici possono alterare la corretta funzionalità delle HDL. Dal paragrafo successivo verranno descritte le alterazioni composizionali evidenziate in pazienti diabetici e le loro rilevanze fisiopatologiche.

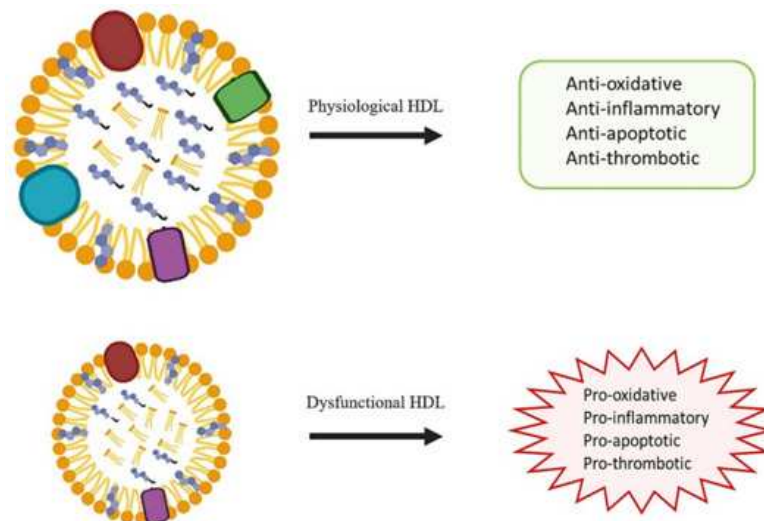


Figura 7: HDL normali e disfunzionali

1.4.1 Diabete e glicazione delle HDL

Il diabete mellito è una malattia endocrina comune caratterizzata da iperglicemia¹ e predispone a complicazioni croniche. Responsabile di questa patologia è una mancanza totale o parziale di secrezione di insulina da parte delle cellule β delle isole pancreatiche di *Langherans* o la resistenza all'insulina delle cellule bersaglio. A seconda, quindi, dell'assenza o della ridotta produzione di insulina, si parla di diabete di tipo 1 (o insulino dipendente, DMT1) e diabete di tipo 2 (o insulino indipendente, DMT2). Il diabete di tipo 1 colpisce circa il 10-15% delle persone affette da diabete e si presenta principalmente durante l'infanzia [Taplin et al., 2008]. La distruzione autoimmune delle cellule beta pancreatiche potrebbe essere dovuta a fattori genetici o ambientali. Il diabete mellito di tipo 2, invece, è la forma più comune della malattia e la fascia d'età più colpita è quella oltre i quarant'anni. Lo stile di vita è il principale

¹ L'iperglicemia è la condizione in cui si riscontrano dei valori di glucosio nel sangue a digiuno superiori a 126 mg/dl.

agente eziologico della malattia, seppure vi sia una forte predisposizione genetica. Il tratto metabolico distintivo del diabete mellito è l'iperglicemia, da cui si innesca una serie di eventi a cascata che portano alla comparsa di complicazioni, come la cardiopatia ischemica, la vasculopatia cerebrale, l'arteriopatia periferica, la nefropatia e la retinopatia. L'iperglicemia cronica causa la glicazione non enzimatica di varie molecole, con conseguente accumulo di prodotti finali di glicazione avanzata (AGEs) nei tessuti corporei. Queste molecole complesse svolgono un ruolo cruciale nell'insorgenza delle complicanze associate al diabete. L'esempio più rappresentativo del processo di glicazione innescato dalla glicemia elevata è l'emoglobina glicata (HbA1c). La glicazione è correlata a molteplici reazioni ossidative e non ossidative, collettivamente definite come *reazione di Maillard* con generazione dei prodotti avanzati di glicazione (*Figura 8*) [Wautier et al., 2004]. La reazione di Maillard (o di glicazione non enzimatica) procede attraverso diverse fasi [Twarda-Clapa et al., 2022]:

- *Fase precoce*: il glucosio o altri zuccheri riducenti, come il fruttosio, il pentosio, il galattosio e lo xilulosio, reagiscono con un gruppo amminico libero di diverse molecole, quali proteine, acidi nucleici e lipidi per formare un composto aldiminico instabile e reversibile, la base di Schiff. Attraverso una serie di riarrangiamenti, questa base dà origine a composti intermedi, detti "di Amadori" (o "di Heyns" in presenza di un chetoso, come il fruttosio). L'equilibrio tra i livelli di basi di Schiff e prodotti di Amadori viene raggiunto in ore o settimane [Aronson, 2004]. Questo riarrangiamento prevede il trasferimento della frazione zuccherina dall'atomo di carbonio a quello di azoto dell'amminoacido, ottenendo così le chetosammine.

- *Fase intermedia:* i prodotti di Amadori formati nello step precedente vanno incontro a una serie di reazioni: attraverso processi di disidratazione, frammentazione e ossidazione, questi prodotti si decompongono in una varietà di composti carbonilici molto reattivi, come arabinosio e metilgliosale, che agiscono come propagatori della reazione reagendo con i gruppi amminici liberi.
- *Fase tardiva:* i carbonili possono subire un'ulteriore condensazione con i gruppi amminici disponibili delle lisine e delle arginine, dando composti irreversibili e molto stabili : gli AGEs (*Advanced Glycation End-Products*).

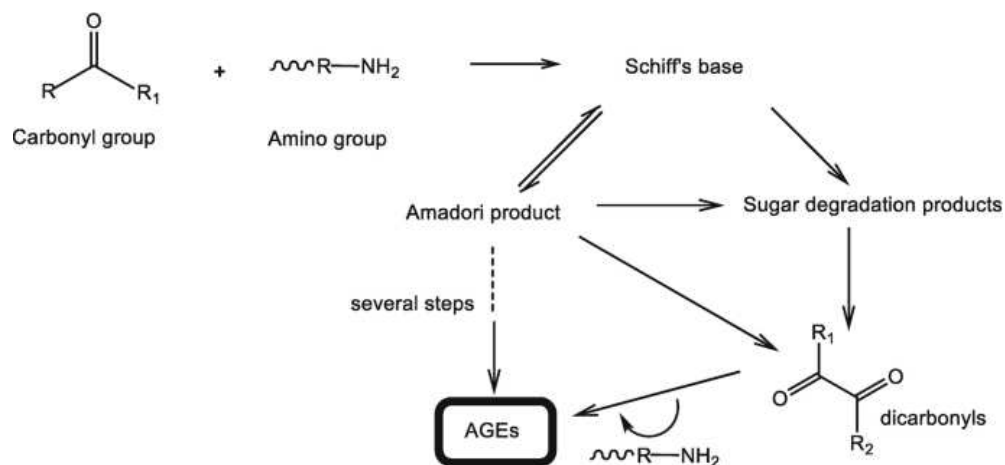


Figura 8: Schema delle fasi principali della reazione di Maillard

È stato dimostrato che il processo di glicazione non enzimatica contribuisce alle alterazioni delle apoproteine a causa delle reazioni tra zuccheri riducenti e metilgliosale (MGO) con residui aminoacidici, come la lisina e l'arginina. Il metilgliosale è un composto dicarbonilico altamente reattivo che si forma principalmente come sottoprodotto della glicolisi, ma anche durante la perossidazione

lipidica e la degradazione proteica [Allaman et al., 2015]. È un potente agente glicante e un precursore predominante nella formazione degli AGEs. I prodotti di glicazione avanzata sono coinvolti nello sviluppo e nella progressione di molteplici condizioni, tra cui:

- **Stress ossidativo:** l'interazione tra AGEs e recettori di membrana RAGEs (*Receptors of AGEs*) attiva la NADPH ossidasi, enzima transmembrana che catalizza la reazione di riduzione dell'ossigeno ad anione superossido (O_2^-), una delle specie più reattive dell'ossigeno (ROS) [Schleicher and Friess, 2007].
- **Danno tissutale:** il normale tasso fisiologico di accumulo di AGEs lungo le pareti arteriose aumenta con l'avanzare dell'età; tuttavia, la loro formazione risulta accelerata nei soggetti diabetici. Gli AGEs possono danneggiare la parete vascolare anche attraverso meccanismi recettore-indipendenti. Infatti, i prodotti di glicazione mediano lo sviluppo di cross-links tra le molecole costituenti la matrice extracellulare (MEC), compromettendo la funzionalità delle arterie [Kosmopoulos et al., 2019]. Il collagene è considerato uno delle principali molecole della MEC e un noto bersaglio della glicazione non enzimatica. È stato dimostrato che il collagene glicato modifica l'attività delle cellule endoteliali e può, dunque, svolgere un ruolo nella formazione della placca aterosclerotica [Yuen et al., 2010].
- **Infiammazione:** il legame degli AGEs ai recettori RAGEs innesca la via di segnalazione del NF- κ B, un fattore di trascrizione che stimola la sintesi di citochine infiammatorie, come TNF- α , IL-1 β e IL-6, e molecole di adesione coinvolte nel processo aterosclerotico [Yue et al., 2022].

Nei soggetti diabetici, l'iperglicemia cronica determina una maggiore produzione di **MGO**. Sebbene la concentrazione di MGO nei tessuti sia di molto inferiore a quella del glucosio, il metilgliosale è circa 20.000 volte più reattivo del glucosio [Thornalley et al., 2005]. Ne consegue che il metilgliosale causa una più rapida glicazione dei vari substrati, ma ciò è tollerabile *in vivo* grazie ad un'efficiente disintossicazione del MGO che lo mantiene nel plasma a concentrazione circa 50.000 volte inferiore a quella del glucosio [Thornalley et al., 2014]. Un meccanismo noto per la degradazione del metilgliosale è il sistema della gliossilasi, composto da due enzimi, la gliossilasi 1 (Glo1) e la gliossilasi 2 (Glo2), che agiscono in sequenza convertendo MGO in D-lattosio. In caso di diabete, però, le concentrazioni di MGO e gli AGEs da esso derivanti aumentano nel plasma e nei siti di sviluppo delle complicanze. In aggiunta all'iperglicemia, anche lo stress ossidativo, l'ipossia e l'infiammazione possono portare ad un aumento della sintesi di MGO, attraverso l'inibizione dell'enzima Glo1 (*Figura 9*) [Schalkwijk et al., 2020]. Il metilgliosale, come mostrato anche in figura, si forma principalmente all'interno delle cellule, ma una frazione minore fuoriesce aumentando anche la glicazione delle proteine extracellulari. Analizzando più nel dettaglio la reazione di glicazione, a differenza del glucosio che si lega principalmente ai residui di lisina presenti sulla catena laterale delle proteine, il metilgliosale reagisce con il gruppo $-NH_2$ delle arginine.

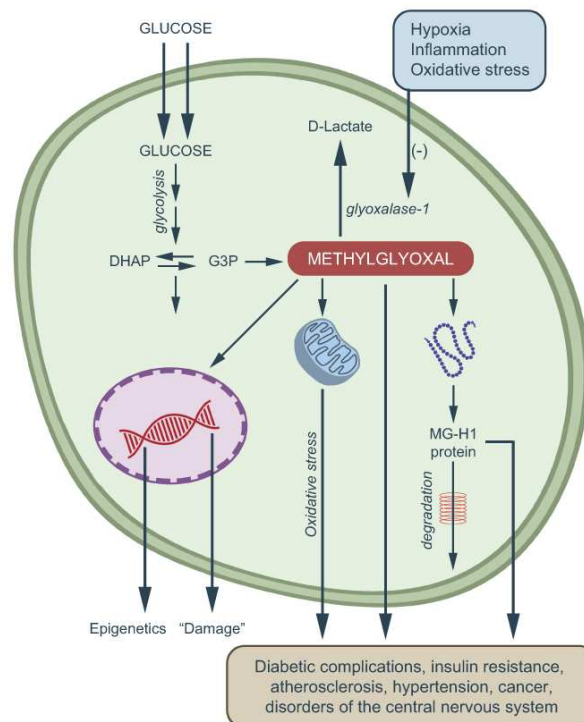


Figura 9: Metabolismo del metilgliosale

La maggior parte degli studi sulla suscettibilità delle proteine alla glicazione spontanea si è concentrata sulla glicazione non enzimatica da parte del glucosio, in quanto esso rappresenta lo zucchero più abbondante nel sangue. Vista la rilevanza fisiopatologica delle HDL, numerosi studi hanno investigato *in vitro* gli effetti della glicazione sulle loro proprietà strutturali e funzionali. La glicazione, *in vitro*, di ApoA-I altera la conformazione dell'apoproteina nelle regioni fondamentali per l'attivazione di LCAT [Ferretti et al., 2001], riduce la sua capacità di promuovere l'efflusso del colesterolo da macrofagi, l'inibizione dell'espressione di molecole di adesione e la formazione dei ROS [Bacchetti et al., 2014]. La glicazione *in vitro* può essere innescata incubando le proteine di interesse con diverse molecole, come il glucosio o metaboliti del metabolismo dei carboidrati. Studi precedenti condotti incubando per tre giorni le HDL

con glucosio (50 e 100 mM) hanno portato a un significativo aumento dei livelli dei prodotti di perossidazione lipidica, come le sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARS) e i dieni coniugati rispetto a HDL incubate in assenza di agenti glicanti. Questi dati dimostrano che la glicosilazione è associata anche alla perossidazione lipidica, da cui deriva il termine “glico-ossidazione”. HDL incubate con glucosio mostrano anche modifiche delle loro proprietà fisico-chimiche e alterazioni di enzimi associati alle HDL, quali PON1, LCAT e la proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CEPT). Questi risultati sperimentali suggeriscono che l'iperglicemia cronica riscontrata nei soggetti diabetici sia responsabile del deterioramento strutturale e funzionale delle HDL (*Figura 10*).

Le HDL glicate, quindi, sono descritte come lipoproteine ad alta densità disfunzionali, poiché si comportano in modo diverso rispetto alle HDL normali. *In vitro*, l'esposizione delle cellule endoteliali all'HDL glicate induce apoptosi, scatenando disfunzioni mitocondriali e aumento dello stress ossidativo [Matsunaga et al., 2001; Du et al., 2017].

Figura 10: Confronto tra HDL normali e in soggetti diabetici

Inoltre, HDL glicate sono meno efficaci nel contrastare l'effetto delle LDL ossidate sulla vasodilatazione endotelio-dipendente e stimolano la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari lisce vascolari [Matsunaga et al., 2001].

Un aumento dei livelli intracellulari dei marcatori della glicosilazione contribuisce anche all'accumulo di lipidi cellulari a causa della riduzione della rimozione del colesterolo cellulare mediante apoA-I in una via dipendente da ABCA1 [Du et al., 2015]. In diversi studi è stato osservato che la glicazione delle lipoproteine, riscontrata nel diabete mellito, aumenta il rischio di progressione tumorale [Passarelli et al., 2005]. Per esempio, HDL isolate da pazienti diabetici si comportano come HDL disfunzionali e hanno una maggiore capacità di promuovere la proliferazione, la migrazione e l'invasione delle cellule del tumore al seno attraverso Akt, ERK, e i pathways della proteina chinasi p38 attivata dai mitogeni [Pan et al., 2012]. Queste osservazioni sono state trovate anche utilizzando HDL glicate *in vitro*, rispetto alle HDL normali. Il pre-trattamento con HDL di soggetti diabetici, glicate e ossidate, ha anche promosso il potenziale metastatico delle cellule del tumore al seno in modelli animali e ha aumentato la loro capacità di adesione alle cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVECs) e l'attaccamento alla matrice extracellulare *in vitro*, rispetto al normale HDL. Questi effetti erano dovuti principalmente all'elevata attività della creatina fosfochinasi (PCK), che, a sua volta, comportava la secrezione di integrine che sono importanti nella promozione della metastasi del cancro al seno [Zheng et al., 2005].

Negli ultimi anni altri monosaccaridi si sono dimostrati in grado di provocare modificazioni della struttura di diverse proteine. La capacità di glicazione è determinata in maniera rilevante dalla struttura dei monosaccaridi. Le molecole che si

presentano in proporzione maggiore nella forma a catena aperta e quelli che possiedono la struttura furanosica sono altamente reattivi. Per questo motivo, il **fruttosio** è ritenuto dieci volte più reattivo del glucosio [Takeuchi et al., 2010]. Si stima che l'incubazione di fruttosio e proteine *in vitro* produca dieci volte più AGEs rispetto al glucosio. A differenza del metilgliosale, il principale target della glicazione del fruttosio è la lisina. Anche se *in vivo* la formazione dei prodotti avanzati di glicazione derivati dal fruttosio (Fru-AGEs) è stata a lungo ipotizzata, non sono state ancora riportate prove sperimentali per la loro formazione. La *Figura 11* riassume alcune tappe riferite alla glicazione provocata dal glucosio o dal fruttosio e la relazione con gli apporti nutrizionali. Infatti, il fruttosio è molto usato come dolcificante in alimenti del settore dolciario o in bevande zuccherate, dove è aggiunto come sciroppo di glucosio-fruttosio.

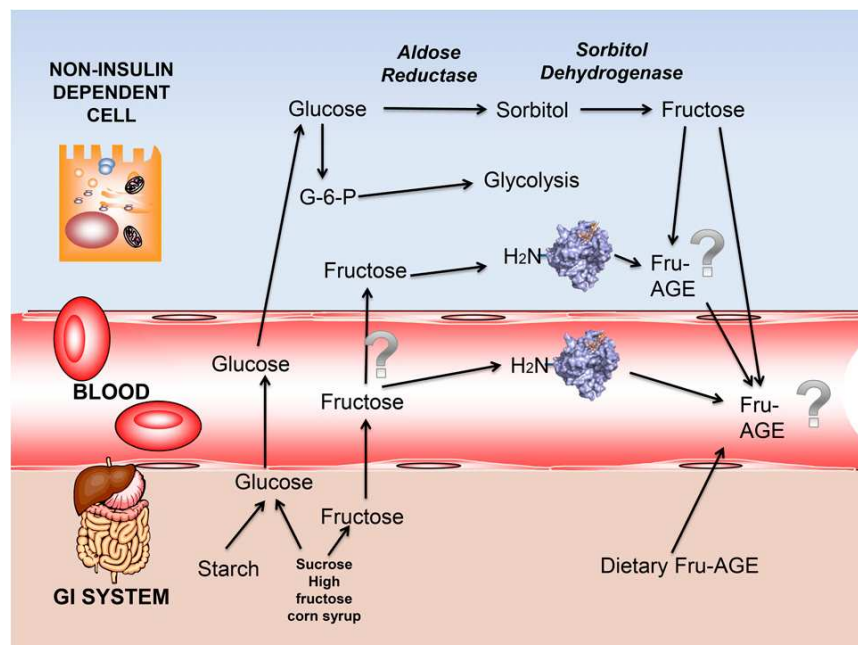


Figura 11: Sintesi endogena di fruttosio e potenziale formazione dei prodotti di fruttosilazione

La fase iniziale della reazione di Maillard con il fruttosio, ossia la condensazione del gruppo carbonilico dello zucchero con gli amminoacidi, è piuttosto simile a quella del glucosio. Nei passaggi successivi non si assiste al riarrangiamento della base di Schiff nel composto di Amodori più stabile, bensì si ottengono due prodotti distinti, detti “Heyns”, che subiscono ulteriori reazioni, quali il riarrangiamento, la disidratazione e la condensazione. Il contributo del fruttosio come agente glicante di origine intracellulare è stato suggerito come il risultato della via metabolica dei polioli [Gugliucci, 2017], che consiste nella conversione del glucosio in sorbitolo, ad opera dell’aldoso reduttasi, e la conseguente trasformazione, catalizzata dall’enzima sorbitolo deidrogenasi, del sorbitolo in fruttosio, con riduzione del NAD^+ a NADH. In condizioni normali di glicemia la via dei polioli è inattiva o funziona solo in minima parte; al contrario, in condizioni iperglicemiche, la via glicolitica è saturata dal glucosio e quest’ultimo viene indirizzato alla pathway dei polioli. La concentrazione ematica di fruttosio in pazienti diabetici può arrivare a $12 \pm 3,8 \mu\text{M/l}$, rispetto ai soggetti sani ($7,7 \pm 1,6 \mu\text{M/l}$) [Kawasaki et al., 2002].

Sebbene gli AGE derivati dal fruttosio possano formarsi a livello intracellulare come conseguenza della via dei polioli, solo pochi studi lo hanno misurato direttamente. Inoltre, dopo numerosi studi clinici mirati all’aldoso reduttasi, l’evidenza di un ruolo critico della formazione endogena di AGE del fruttosio nelle complicanze diabetiche a livello del tessuto bersaglio (endotelio, glomerulo o neurale) è scarsa, se non del tutto assente [Obrosova et al., 2005]. Come detto sopra, livelli alti di fruttosio possono derivare anche da un eccessivo introito con la dieta: soggetti diabetici tenderebbero a prediligere il fruttosio come dolcificante, spesso abusandone proprio per soddisfare la

voglia di dolce. Il fruttosio esogeno entra nel processo della glicolisi a livello dei triosi fosfati, bypassando i controlli a livello della fosfofruttochinasi (PFK)². Nel fegato, l'enzima fruttochinasi fosforila il fruttosio nella prima posizione del carbonio; il fruttosio-1-P che si forma viene scisso dall'aldolasi B in gliceraldeide e diidrossiacetone fosfato. Per cui, se il fruttosio è presente in eccesso viene immesso comunque nella glicolisi e rappresenta, dunque, una fonte non regolata di triosi da cui si deriva il metilgliosale [Aragno e Mastrocola, 2017]. Alcuni studi hanno dimostrato che anche il **D-ribosio** ha un ruolo attivo nella glicazione delle proteine, contribuendo alla produzione degli AGEs ad elevata citotossicità. Come componente chiave di numerose biomolecole tra cui RNA, ATP e riboflavina, il D-ribosio partecipa a numerosi processi biochimici. La concentrazione sierica di ribosio è pari a 0,01-0,1 mM nei soggetti sani, ma raggiunge livelli maggiori nei pazienti diabetici [Chen et al., 2019]. In uno studio di Wei e collaboratori [Wei et al., 2009] la glicazione dell'albumina sierica bovina (BSA) con ribosio è risultata significativamente più rapida e intensa rispetto a quella innescata da altri zuccheri. Il ribosio *in vitro* si è dimostrato in grado di glicare l'emoglobina. L'incremento dei livelli di D-ribosio nei pazienti diabetici potrebbe essere collegato ad una ridotta attività dell'enzima transchetolasi (TKT) [Yu et al., 2019]. Nella fase non ossidativa della via metabolica dei pentoso fosfati la TKT catalizza il trasferimento di un'unità dicarboniosa dallo

² La fosfofruttochinasi (PFK) è una transferasi che catalizza la fosforilazione del fruttosio-6-fosfato a fruttosio-1,6-bisfosfato ed è un enzima chiave per la regolazione della glicolisi. Il fruttosio-2,6-bisfosfato è considerato il principale attivatore della PFK: la sua sintesi è catalizzata da un'altra forma della fosfofruttochinasi, la PFK-2.

xilulosio-5-fosfato al ribosio-5-fosfato con produzione di un trioso fosfato, la gliceraldeide-3-fosfato, e uno zucchero a sette atomi di carbonio, il sedoeptulosio-7-fosfato. Per cui, l'inibizione della transchetolasi comporterebbe un accumulo di ribosio. Un'attenzione crescente è rivolta al ribosio e alle potenziali alterazioni metaboliche nei pazienti affetti da diabete insulino dipendente [Yu et al., 2019]; pertanto nella parte sperimentale verrà indagata la capacità di questo monosaccaride di provocare la glicazione delle HDL.

1.4.2 Ossidazione delle HDL

L'ossidazione delle HDL può essere innescata dall'incubazione con ioni metallici (ioni di rame), acido ipocloroso e altri agenti. In condizioni patologiche associate allo stress ossidativo, le HDL possono diventare disfunzionali, indipendentemente dai loro livelli nel plasma, a causa di cambiamenti composizionali e funzionali delle lipoproteine. Ad esempio, in pazienti con malattie cardiovascolari, diabete mellito o malattia renale cronica, la funzione delle HDL è compromessa, in quanto mostrano funzioni protettive significativamente ridotte, e piuttosto acquisiscono caratteristiche pro-aterogeniche. Lo stress ossidativo delle HDL porta alla perossidazione lipidica e alla modificazione proteica, influenzando significativamente la funzionalità delle HDL. Utilizzando diversi modelli sperimentali di HDL ossidate, lo è stato dimostrato che l'ossidazione coinvolge componenti strutturali sia della superficie (proteine, fosfolipidi, e colesterolo) che del core (estere di colesterolo) e comporta modificazioni composizionali nei lipidi e nelle apolipoproteine delle HDL. Di conseguenza, l'ossidazione delle HDL aumenta i livelli dei marcatori di perossidazione lipidica

inclusi dieni coniugati e sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBAR). Inoltre, alterazioni delle proprietà fisico-chimiche delle HDL, quali fluidità e ordine molecolare, sono descritti in OX-HDL. È stato riportato che la modifica delle HDL ossidate può compromettere le sue funzioni ateroprotettive. La mieloperossidasi, il radicale anionico superossido (O_2^-) e H_2O_2 sono potenziali candidati per la generazione di HDL ossidate *in vivo*. L'ipoclorito può essere rilasciato mediante attivazione dei globuli bianchi durante stati pro-infiammatori che si verificano in presenza di diverse patologie. Zheng et al. ha mostrato la rilevanza clinica di tali alterazioni e che l'ApoA-I è un bersaglio di modificazioni catalizzate dalla mieloperossidasi (MPO). Le HDL ossidate esercitano anche un effetto citotossico su cellule in coltura come HAEC e macrofagi. Le alterazioni di Ox-HDL sono state anche correlate a modifiche degli enzimi presenti sulle HDL come PON e LCAT. Le interazioni tra ox-HDL e cellule tumorali sono state precedentemente studiate utilizzando HDL ossidate *in vitro*. Si è visto che HDL ossidate *in vitro* con ipoclorito stimola la proliferazione cellulare, la migrazione, l'invasione e l'adesione delle cellule del cancro al seno. I meccanismi molecolari coinvolgono l'attivazione del pathway della protein chinasi C (PKC), che regola numerose risposte cellulari, tra cui la proliferazione cellulare e la risposta infiammatoria. Queste HDL modificate hanno promosso, *in vivo*, la metastasi delle cellule del carcinoma mammario, di quello polmonare ed epatico, a differenza delle HDL normali.

1.4.3 Aterosclerosi

L'aterosclerosi è una malattia infiammatoria cronica delle tonica intima delle arterie, la cui patogenesi si identifica nel danno endoteliale e nell'accumulo di LDL ossidate.

Data la sua natura infiammatoria, l'aterosclerosi è caratterizzata da un accumulo di macrofagi e linfociti T nell'intima arteriosa e da un'aumentata concentrazione plasmatica di marker infiammatori. All'interno della parete arteriosa, i monociti, che vi erano aderiti³, si differenziano in macrofagi ed esprimono sulla loro superficie una gamma di recettori "scavenger", alcuni dei quali hanno la capacità di legare e interiorizzare le LDL ossidate (modificate) [Holme et al., 2020]. Le cellule schiumose che ne derivano sono considerate le cellule distintive dell'aterosclerosi. I principali meccanismi attraverso cui le HDL sono in grado di ridurre il rischio aterogeno sono il trasporto inverso del colesterolo LDL e l'attività antiossidante (vd. Paragrafo 1.3.2). Diversi studi hanno dimostrato che le HDL inibiscono l'espressione delle molecole di adesione della superficie delle cellule endoteliali attivate *in vitro*, mediante l'inattivazione della sfingosina chinasi delle cellule endoteliali; si tratta di un enzima che catalizza un passaggio chiave nel processo in cui il TNF- α stimola l'espressione delle molecole di adesione delle cellule endoteliali. Questa inibizione della sfingosina chinasi ha un effetto a valle inibendo la traslocazione nucleare di NF- κ B [Barter et al., 2004]. HDL modificate possono, dunque, attivare il pathway di segnalazione mediato da NF- κ B, portando ad una maggiore sintesi delle proteine coinvolte nel reclutamento delle cellule immunitarie nello spazio sub endoteliale. Inoltre, viene meno anche la capacità delle HDL di inibire il rilascio di citochine infiammatorie, quali TNF- α e IL-1 β . Le HDL sono in grado di aumentare la biodisponibilità di ossido nitrico (NO), una molecola vasodilatatrice, inducendo la fosforilazione della serina 1177 dell'enzima

³ Il reclutamento dei monociti sull'endotelio vasale è garantito dall'espressione di proteine di adesione sia sulla superficie dei monociti sia da parte delle cellule endoteliali attivate. Queste ~~molecole~~ ³⁸ presenti nei siti di sviluppo dell'aterosclerosi sono VCAM-1, ICAM-1 e la E-selectina.

monossido di azoto sintasi, che promuove la sintesi di NO [Denimal et al., 2023]. Le HDL isolate da pazienti diabetici sono risultate meno capaci di attivare l'enzima NO-sintasi [Denimal et al., 2017], comportando un minor effetto protettivo nei confronti dell'aterosclerosi.

1.5 Scopo della tesi

Il seguente progetto di tesi è consistito nell'indagare gli effetti della glicazione non enzimatica sulle proteine associate alle lipoproteine ad alta densità (HDL), al fine di comprendere meglio le modificazioni strutturali e funzionali che coinvolgono le HDL in relazione all'iperglicemia cronica associata al diabete. Dall'esame della letteratura emerge infatti che la glicazione è una modifica composizionale che è responsabile di comportamenti disfunzionali delle HDL. Alterazioni delle proprietà antiossidanti delle HDL e la loro diminuita capacità nel trasporto inverso del colesterolo potrebbero essere degli ulteriori meccanismi determinanti il maggior rischio per i soggetti affetti da diabete, in particolare quello di tipo 2, di sviluppare malattie cardiovascolari; queste sono considerate la principale comorbidità associata al diabete, nonché causa di morte nella maggior parte dei pazienti. La glicazione delle HDL e delle proteine plasmatiche è stata studiata soprattutto utilizzando il glucosio e il metilgliosale. Quest'ultimo è descritto come il principale agente glicante e i suoi effetti sono stati investigati in diverse condizioni sperimentali. A differenza del metilgliosale, la letteratura scientifica risulta piuttosto carente di studi sulla fruttosilazione delle proteine o sugli effetti del ribosio. Nella parte sperimentale, pertanto, l'effetto di tali molecole verrà confrontato per studiare la suscettibilità delle HDL alla glicazione indotta da esse. La glicazione verrà studiata a diverse concentrazioni di metilgliosale, fruttosio e ribosio. Si valuterà l'effetto del tempo di incubazione (3, 7 14 giorni) così da seguire l'andamento del processo di glicazione. Per quanto riguarda le condizioni sperimentali, verranno seguiti protocolli di studi precedenti. Ponendo l'attenzione sul diabete, è stato ritenuto interessante esaminare se elevate concentrazioni di fruttosio, che possono presentarsi a causa di alterazioni metaboliche o a seguito di un maggior

introito alimentare, sono altrettanto dannose per la funzionalità delle HDL. Anche il ribosio è descritto come agente glicante e diverse proteine si sono dimostrate suscettibili alla glicazione da esso innescata; pertanto, ne è stata testata l'azione sulle HDL. La verifica dell'avvenuta glicazione e le alterazioni delle proteine saranno valutate mediante analisi della fluorescenza del triptofano, valutazione dell'ipercromicità e dosaggio dei prodotti avanzati di glicazione (AGEs) e diminuzione dei livelli di lisine disponibili. A queste indagini verranno affiancate valutazioni dell'attività antiossidante delle HDL trattate nelle diverse condizioni sperimentali, mediante test della rodamina e studio dell'attività dell'enzima PON1. Come verrà spiegato più approfonditamente nei capitoli successivi, questi markers permetteranno di valutare le modificazioni strutturali delle lipoproteine in esame, la compromissione del loro potere antiossidante e la formazione di composti di glicazione avanzata responsabili di alterazioni strutturali e funzionali delle HDL.

2 - CAMPIONI E METODOLOGIE -

2.1 Separazione delle HDL

L'isolamento delle HDL da campioni di plasma è stato effettuato mediante precipitazione con polietilenglicole (PEG), in accordo con studi precedenti [Briggs et al., 1981]. Per le analisi è stato impiegato plasma congelato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, stoccato nei laboratori del Dipartimento DiSVA. I campioni di plasma erano stati prelevati da soggetti normolipemici, non affetti da diabete e adoperati in studi precedenti. Per la preparazione di 50 ml di "separation buffer" sono stati impiegati Na_2HPO_4 (7 g/l) e NaCl (9 g/l). La soluzione così ottenuta è stata addizionata di 0,92 g di glicerolo, solubilizzata e portata a pH 10 con NaOH. Infine, sono stati aggiunti 10 g di PEG. 4 ml di campione di plasma sono stati incubati per 20 minuti con 4 ml della soluzione contenente il PEG e, successivamente, centrifugati per 20 minuti a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $10'249\text{ rpm}$. Infine, è stato prelevato il surnatante contenente le lipoproteine di interesse. I campioni sono stati stoccati a -20° C per gli esperimenti successivi.

2.2 Quantificazione del contenuto in colesterolo delle HDL

Per la determinazione quantitativa del contenuto in colesterolo delle HDL isolate dai campioni plasmatici, è stato utilizzato il kit *Chema* (*Chema Diagnostica*). Tale metodica permette agli esteri del colesterolo di essere idrolizzati dalla colesterolo esterasi, formando colesterolo ed acidi grassi. Il colesterolo viene ossidato dalla

colesterolo ossidasi, formando colest-4-ene-3-one ed H₂O₂. Il perossido di idrogeno reagisce con p-clorofenolo e 4-aminoantipirina (4-AAP) in presenza di perossidasi, formando un composto cromoforo chinoneiminico colorato in rosso. L'assorbanza, misurata a 510 nm, è proporzionale alla quantità di colesterolo presente nel campione [Li et al., 2019]. Il reagente impiegato è costituito da: tampone di Good 50 mM a pH 7.20, sodio colato 8 mM, colesterolo esterasi (CHE) ≥ 400 U/l, colesterolo ossidasi (CHOD) ≥ 200 U/l, perossidasi (POD) ≥ 500 U/l, 4-AAP 0.6 mM, 4-clorofenolo 2 mM. Il protocollo sperimentale prevede la preparazione della soluzione standard (1 ml di reagente + 10 µl di standard), la cui concentrazione di colesterolo è nota e pari a 200 mg/dl, e della soluzione campione (1 ml di reagente + 10 µl di campione). Le soluzioni sono state mescolate e lasciate in incubazione a 37 °C per 5 minuti. Di seguito, è stata effettuata la lettura spettrofotometrica dell'assorbanza (A) a 510 nm delle soluzioni contro il bianco (1 ml di reagente + 10 µl di acqua distillata). Infine, per risalire alla concentrazione di colesterolo, espressa in mg/dl o µg/ml, è stata applicata la seguente formula: $\frac{A_{campione}}{A_{standard}} \times 200 \text{ mg/dl}$ (valore dello standard).

La concentrazione di colesterolo del campione di HDL isolate è risultato in media di circa di 29,78 mg/dl.

2.3 Quantificazione delle proteine delle HDL

La concentrazione proteica delle HDL precedentemente isolate è stata ricavata mediante il saggio dell'acido bicinconinico (BCA). La soluzione di BCA è costituita dal reagente A (1 g di BCA, 2 g di carbonato di sodio, 0,16 g di tartrato di sodio, 0,4 g di NaOH e 0,95 g di bicarbonato di sodio, portati a 100 ml con acqua distillata) a pH 11,25 e dal reagente B (0,4 g di solfato di rame in 10 ml di acqua distillata), in rapporto

50:1. Per la retta standard di taratura (*Figura 12*) è stata impiegata albumina sierica bovina (BSA) 2 mg/ml. La BSA è stata diluita 1:2 in 200 µl acqua deionizzata per 6 volte (1000 µg/ml – 500 µg/ml – 250 µg/ml – 125 µg/ml – 62,5 µg/ml – 31,25 µg/ml). In ciascun pozzetto della piastra sono stati disposti, in doppio, 25 µl delle diluizioni di albumina, 25 µl di campione di HDL diluito, 25 µl di bianco (acqua distillata) e a essi sono stati aggiunti 200 µl soluzione di BCA (preparata al momento). Dopo un'incubazione di 30 minuti a 37 °C in termostato, è stata eseguita la lettura dell'assorbanza a 562 nm.

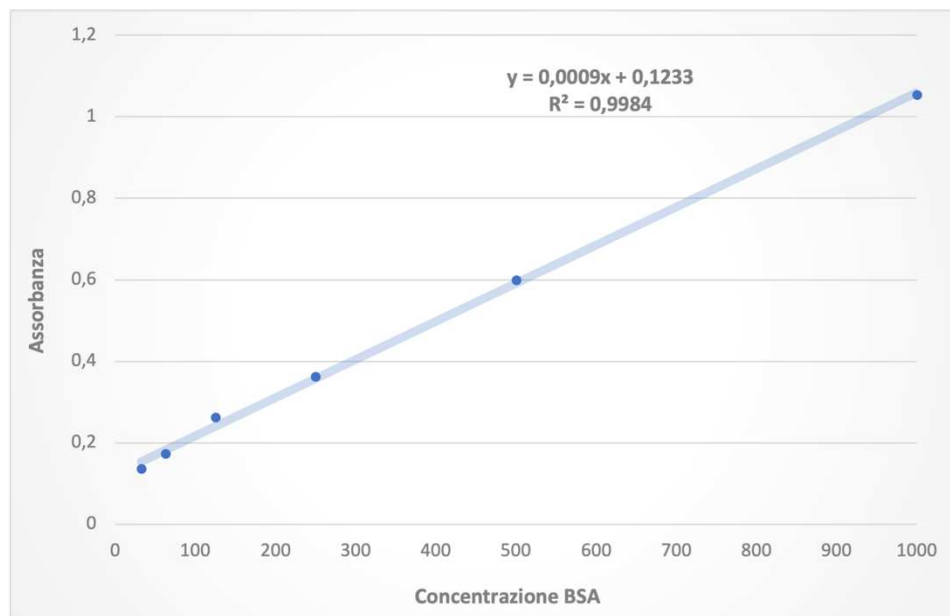


Figura 12: Retta di taratura per la determinazione della [proteine]delle HDL isolate

La concentrazione delle proteine nel campione di HDL preparato è pari a 23'492 µg/ml.

2.4 Glicazione delle HDL

2.4.1 Incubazione delle HDL con metilgliosale

Le HDL, precedentemente isolate, sono state incubate con MGO a concentrazioni crescenti (10 μ M, 100 μ M e 1000 μ M) per diversi tempi di incubazione a 37 °C in bagno termostatico. In fase iniziale, l'incubazione è stata condotta con diverse concentrazioni di HDL (da 100 μ g/ml a 500 μ g/ml di proteine). Il tampone usato per le incubazioni è stato il PBS (10 mM, pH 7,4) contenente sodio azide 0,02% (3,05 mM), così da impedire la contaminazione microbica durante il periodo di incubazione. Le varie concentrazioni di MGO da usare nelle incubazioni sono state ottenute da diluizioni di una soluzione stock di MGO 0,02 M.

2.4.2 Incubazione delle HDL con fruttosio

Seguendo la stessa procedura stabilita per l'incubazione delle HDL con il metilgliosale, è stato valutato anche il potere glicante del fruttosio, a concentrazioni crescenti (5,54 μ M, 5 mM e 20 mM) in accordo con la letteratura in cui il fruttosio è stato usato per glicare vari tipi di proteine [Mou et al., 2021]. Le incubazioni a 37 °C sono state condotte per vari periodi e, al termine, alcuni campioni sono stati conservati in congelatore per i saggi successivi.

2.4.3 Incubazione delle HDL con ribosio

Gli effetti della glicazione sulle lipoproteine ad alta densità sono stati testati anche con ribosio a concentrazione 20 mM, basandoci su uno studio di Lixian Mou e collaboratori [Mou et al., 2021]. Le incubazioni sono state eseguite a 37 °C per diversi periodi come descritto per gli altri agenti glicanti.

2.5 Analisi della fluorescenza intrinseca del triptofano

La fluorescenza dei residui di triptofano è ampiamente usata nello studio della struttura delle proteine [Hellman and Schneider, 2019], incluse quelle associate alle HDL in cui il triptofano è presente. La fluorescenza dei vari campioni di HDL è stata determinata a temperatura ambiente eccitando i campioni di HDL a 280 nm e registrando lo spettro di emissione tra 300 e 400 nm. Il massimo di emissione osservato è stato di 340 nm. La concentrazione ottimale per le valutazioni è risultata di circa 100 µg/ml. I campioni di HDL incubati con i vari agenti glicanti alla concentrazione di 500 µg/ml di proteine sono stati pertanto diluiti 1:4. Il fluorimetro adoperato nelle analisi è il Perkin Elmer Luminescence Spectrometer LS50B, mentre il software è Winlab. L'intensità di fluorescenza del triptofano è stata espressa in unità arbitrarie (A.U.).

2.6 Analisi dei prodotti avanzati di glicazione (AGEs)

È noto che alcuni prodotti avanzati di glicazione sono fluorescenti ed è possibile, quindi, studiarne i livelli in campioni biologici mediante rilevazione della fluorescenza [Perrone et al., 2020]. Gli AGEs sono molecole eterogenee, distinguibili in non fluorescenti e fluorescenti (*Figura 13*). La proprietà degli AGEs di assorbire ed emettere fluorescenza con diversi massimi di emissione è dovuta alla presenza nella loro struttura di cromofori.

Advanced Glycation End Products (AGEs)

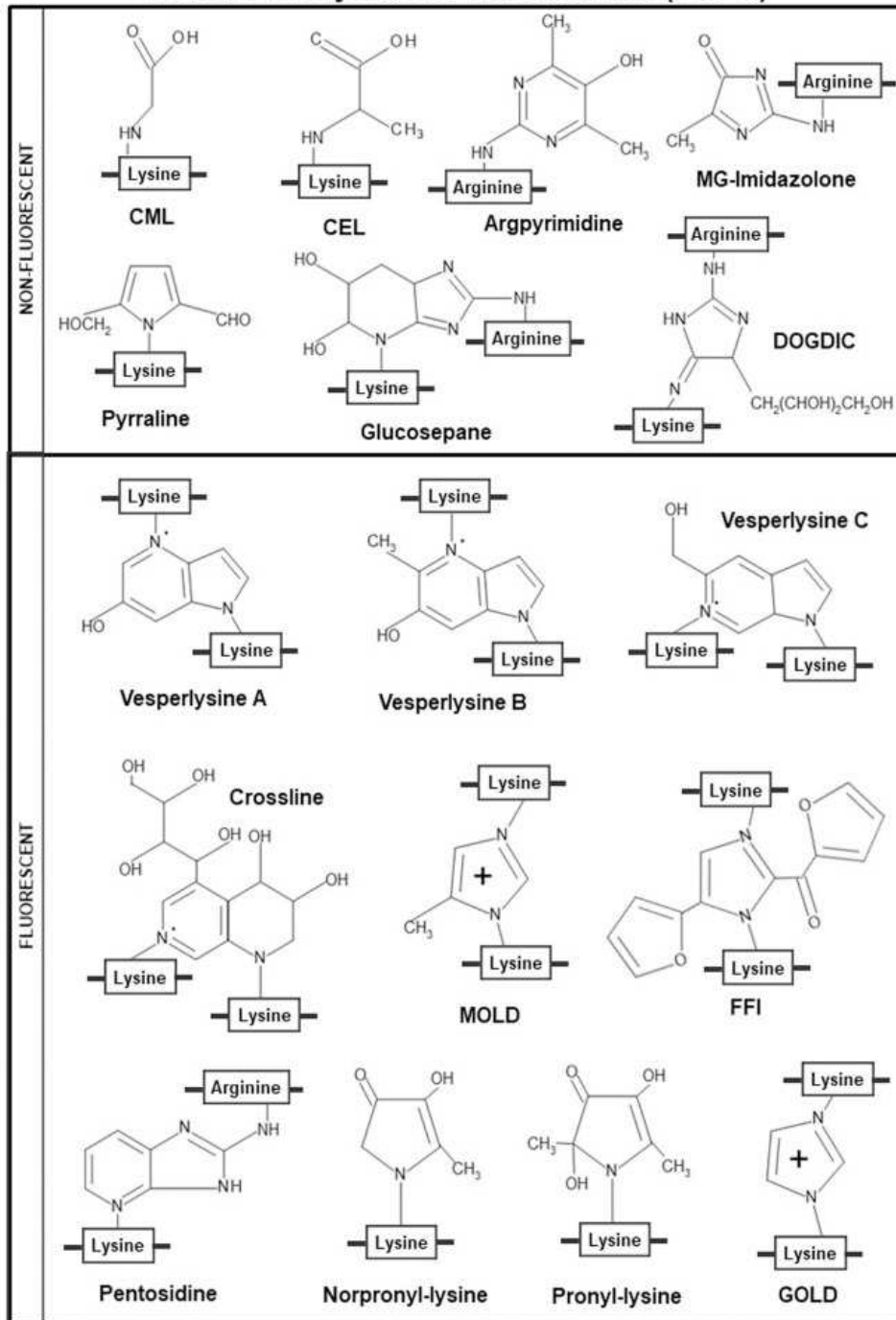


Figura 13: Prodotti avanzati di glicazione fluorescenti e non fluorescenti.

Abbreviazioni: CML (N-carboxymethyl-lysine), CEL (N-carboxyethyl-lysine), DOGDIC (3-deoxyglucosone-derived imidazolium cross-link, MOLD (methylglyoxal-lysine dimer), FFI (2-(2-furoyl)-4(5)-furanyl-1H-imidazole, GOLD (Methyl-glyoxal-lysine dimmer).

Le lunghezze d'onda di emissione della fluorescenza degli AGEs variano da circa 380 nm (impiegato per rilevare la pentosidina ad esempio) a circa 460 nm [Séro et al., 2013]. La fluorescenza dei prodotti avanzati di glicazione è stata analizzata nei campioni incubati (nelle diverse condizioni sperimentali) impostando la lunghezza d'onda di eccitazione a 340 nm e registrando lo spettro di emissione tra 370 e 500 nm. Nei vari campioni si è osservato un massimo di intensità di fluorescenza (espressa in unità arbitrarie, A.U.) a 413 nm.

2.7 Valutazione della ipercromicità

La misurazione spettrofotometrica dell'assorbanza delle proteine a 280 nm è dovuta agli amminoacidi aromatici triptofano, tirosina e fenilalanina ed è un metodo semplice, seppur soggetto a interferenze, per determinare aspetti strutturali delle proteine. Per cui, il monitoraggio dei cambiamenti dell'assorbanza a questa lunghezza d'onda consente di studiare eventuali modificazioni strutturali delle proteine sottoposte al trattamento della glicazione rispetto alle HDL incubate in assenza di agenti glicanti. Inoltre, questa metodica consente di verificare la presenza di aggregati proteici, che si formano a seguito della glicazione. Infatti, i prodotti della glicazione possono essere classificati in “addotti proteici”, quando lo zucchero si lega covalentemente allo specifico residuo amminoacidico, e si formano legami crociati tra più proteine (*crosslinking proteico*). In accordo con studi precedenti, è stata misurata l'assorbanza a 280 nm (spettrofotometro *Shimadzu UV 2401PC*) dei campioni di HDL glicate e dei campioni di controllo [Zaman et al., 2017].

2.8 Valutazione delle proprietà antiossidanti delle HDL mediante saggio della rodamina

Le proprietà redox e antiossidanti delle HDL sono state esaminate attraverso un metodo fluorimetrico cell-free basato sull'ossidazione della diidrorodamina 123 (DHR) a rodamina [Kelesidis et al., 2011], la quale è in grado di emettere fluorescenza (Figura 14) a 528 nm con un'eccitazione a 485 nm. La sonda tende a ossidarsi anche spontaneamente a contatto con l'ossigeno. In presenza di HDL, l'ossidazione della DHR dipende dalle proprietà delle lipoproteine. Alterazioni funzionali delle HDL aumentano l'ossidazione della sonda.

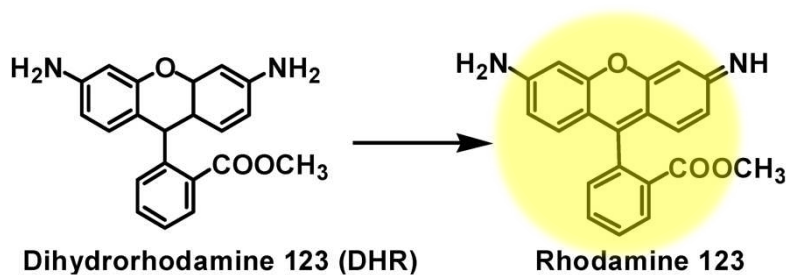


Figura 14: Ossidazione della diidrorodamina a rodamina

La soluzione stock di DHR 20 mM è stata diluita 1:1000 in una soluzione HBS (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) + Chelex 100, così da ottenere una “working solution” alla concentrazione 50 μ M (2 μ l stock DHR in 800 μ l di HBS + Chelex). In una fase preliminare le incubazioni sono state condotte a diverse concentrazioni di HDL per valutare le condizioni ottimali. Sono stati utilizzati in triplicato dei campioni di HDL contenenti diverse concentrazioni di colesterolo (1,25 μ g/ml – 2,5 μ g/ml – 5 μ g/ml), a cui è stato addizionato HBS fino a un volume finale di 150 μ l, seguiti da 25 μ l di “working solution” di DHR, per un volume finale di 175 μ l (concentrazione finale

di DHR pari a 7 μ M). Le valutazioni sono state eseguite sia in assenza che in presenza di 25 μ l di agente ossidante AAPH (2,2'-Azobis-2-methylpropionamide) 1 mM (concentrazione finale pari a 7 mM). A 37 °C l'AAPH subisce una decomposizione termica formando radicali perossilici (ROO•) che promuovono l'ossidazione. Sono stati preparati, sempre in triplicato, il bianco privo di ossidante (175 μ l di HBS + 25 μ l di DHR) e il bianco con AAPH (150 μ l di HBS + 25 μ l di DHR + 25 μ l di AAPH). Immediatamente dopo l'aggiunta della DHR, la piastra è stata protetta dalla luce e posta nel lettore di micropiastra a fluorescenza. Per ridurre il rumore di fondo, è stata impiegata una micropiastra nera. La fluorescenza è stata registrata ad intervalli di 2 minuti per 2 ore, impostando come lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione 485 e 538 nm rispettivamente [Kelesidis et al., 2011]. Il tasso di ossidazione è stato calcolato come il coefficiente angolare della retta di regressione dell'intensità di fluorescenza tra i 20 e i 120 minuti, espressa come FU/minuto (unità di fluorescenza al minuto). Il lettore utilizzato è il *BioTek.Synergy HT*. Per le analisi dei campioni incubati è stata impiegata la concentrazione 2,5 μ g/ml di colesterolo. Di conseguenza, sono stati effettuati i calcoli per la determinazione del volume di campione di HDL precedentemente incubate da aggiungere nei pozzetti, tale da contenere 2,5 μ g/ml di colesterolo. Il software di acquisizione e di analisi dei dati utilizzato è il *BioTek Gen5*.

2.9 Verifica della glicazione mediante TNBS

Tra gli amminoacidi più sensibili alla glicazione vi sono i residui di lisina e di arginina. Come rappresentato nella *Figura 15*, il primo step del processo di glicazione non enzimatica è una reazione di condensazione tra il gruppo carbonilico di uno zucchero riducente (o composti alternativi) con il gruppo amminico libero di un amminoacido.



Figura 15: Prima fase della reazione di glicazione non enzimatica

Per validare l'azione glicante dei vari composti sulle proteine delle HDL analizzate, è stato impiegato il saggio che prevede l'uso dell'acido 2,4,6-trinitrobenzensulfonico. Il TNBS è un reagente che in ambiente alcalino si lega alle lisine libere della proteina, formando un cromoforo, il trinitrofenil derivato, in grado di assorbire a 420 nm (Figura 16). L'intensità del colore prodotto sarà proporzionale alla concentrazione di gruppi amminici liberi.

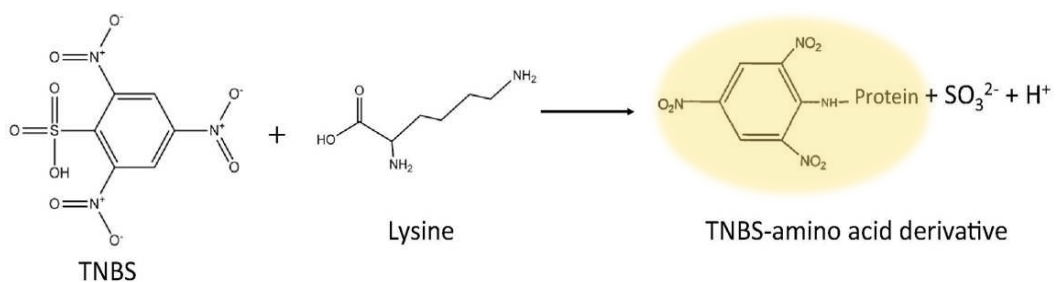


Figura 16: Formazione del cromogeno dal TNBS e l'amminoacido lisina

Il meccanismo attraverso cui il TNBS si lega ai residui di lisina prevede una reazione di sostituzione nucleofila. Il TNBS contiene tre gruppi $-\text{NO}_2$ attaccati a un anello benzenico e un gruppo $-\text{SO}_3\text{H}$; il gruppo solfonico è altamente elettrone-attrattore, rendendo i gruppi nitrili dei forti elettrofili. Il gruppo amminico della lisina, posto sulla catena laterale, è un nucleofilo in grado di reagire con gli $-\text{NO}_2$ elettrofili del TNBS [Mulchay et al., 2017]. L'assorbanza dell'addotto lisina-TNBS è direttamente

proporzionale alla concentrazione di lisine nel campione: in caso di avvenuta glicazione, quindi, le lisine disponibili per il legame con il TNBS dovrebbero essere di numero ridotto. Per questo saggio sono stati prelevati 70 μ l di campione di HDL glicate nelle varie condizioni sperimentali e 70 μ l di HDL controllo. Al campione sono stati addizionati NaHCO_3 al 4% fino ad arrivare a un volume finale di 1 ml e 50 μ l di TNBS 0,1%. La soluzione di TNBS viene preparata poco prima del saggio. Gli standards di valina (0,025 mM – 0,05 mM – 0,1 mM – 0,2 mM) sono stati allestiti a partire da uno stock di 2,5 mM, ottenendo la retta di taratura riportata nella *Figura 17*.

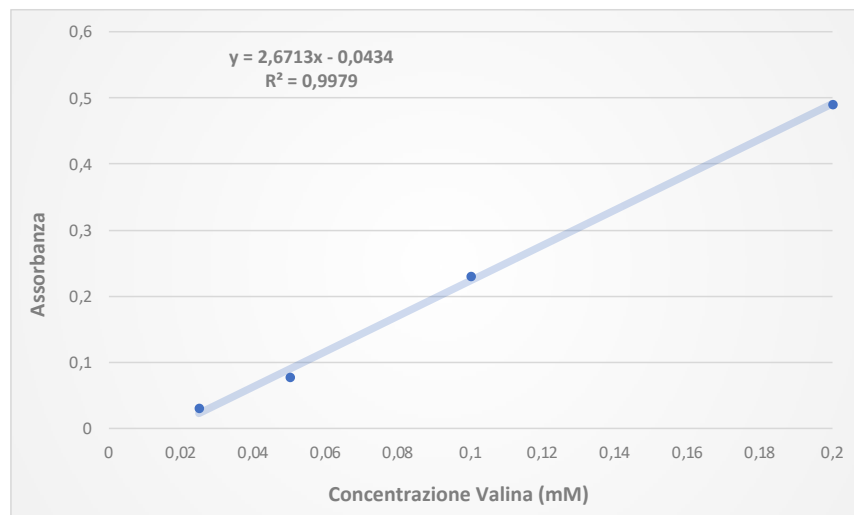


Figura 17: Retta di taratura per la determinazione del contenuto di $-\text{NH}_2$ liberi

Per far avvenire la reazione, i campioni sono stati incubati per circa 40 minuti a 37 °C e, al termine, è stata effettuata la lettura a 420 nm [Cayot and Tainturier, 1997]. Prima di eseguire l'analisi allo spettrofotometro (*Kontron Uvikon 941 Spectrophotometer*), è possibile migliorare i risultati aggiungendo 100 μ l di HCl 1 M e 100 μ l di SDS (sodio

dodecil solfato) 10%, che permettono di arrestare la reazione. I risultati sono stati espressi in nmol di gruppi -NH₂ per µg di proteine.

2.10 Valutazione dell'attività lattonasica della PON1

La paraoxonasi è un enzima principalmente noto per la sua capacità di idrolizzare gli esteri dell'acido fosforico, tra cui il pesticida parathion. *In vitro*, vari substrati possono essere utilizzati per studiare l'attività enzimatica. L'attività principale della PON1 risulta essere quella lattonasica (che consiste nell'idrolisi dei lattoni di varie strutture); pertanto, è stato usato un substrato che permette di valutare questa attività. Come anticipato nel paragrafo 1.3.2, tra i substrati della paraoxonasi vi è anche la diidrocumarina (3,4-diidro-2H-cromen-2-one), un composto ciclico caratterizzato da un anello benzenico fuso con uno lattonico. L'idrolisi della diidrocumarina produce il 3-(2-idrossifenil)propionato (*Figura 18*) [Marek et al., 2018]. Per garantire una maggiore attendibilità del test, è stata allestita una nuova incubazione di 500 µg/ml di proteine HDL in presenza di MGO 1000 µM, MGO 100 µM, fruttosio e ribosio 20 mM e per la durata di una settimana a 37 °C (vedi *Tabelle 4-5*). Prima di effettuare il saggio, è stata preparata una soluzione stock di diidrocumarina (DHC) 100 mM in DMSO (conservabile a 4 °C da due a quattro settimane). Lo stock è stato diluito 1:10 (50 µl di DHR in 5 ml) con il reaction buffer (Tris/HCl 50 mM a pH 7,5 + 1 mM CaCl₂), ottenendo una concentrazione finale pari a 1 mM. Utilizzando una piastra "greiner", sono stati aggiunti in ciascun pozzetto e in triplicato 50 µl di acqua deionizzata per il bianco e 50 µl di campione e, immediatamente prima di effettuare la lettura, 200 µl della soluzione di reaction buffer addizionata con DHR 1 mM. Il bianco consente di misurare l'auto-idrolisi della diidrocumarina. L'assorbanza è stata letta a

270 nm a 25 °C ogni 50 secondi per 8 minuti mediante il lettore *BioTek Synergy HT*. L'attività dell'enzima è stata calcolata come velocità di formazione del 3-(2-idrossifenil)propionato ($\epsilon = 1,295\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) espressa in U/mg di proteine. Un'unità (U) di attività di PON corrisponde a 1 μmol di diidrocumarina idrolizzata al minuto/mg di proteine.

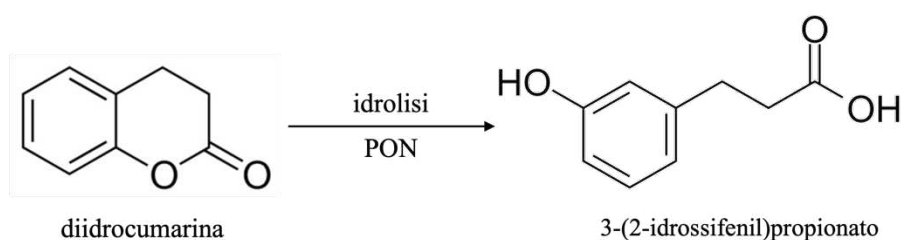


Figura 18: Attività lattonasica della PON1 in presenza di diidrocumarina come substrato

2.11 Analisi statistica

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato. I risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (D.S.). Le differenze tra i vari campioni e il controllo sono state valutate tramite *t*-test o test di U Mann-Whitney. Un valore di *p-value* $\leq 0,05$ è considerato statisticamente significativo. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il software *GraphPad Prism* (versione 9.5.1).

3 - RISULTATI SPERIMENTALI -

3.1 Analisi dei prodotti avanzati di glicazione (AGEs)

La lettura dell'intensità di emissione di fluorescenza a 413 nm ha permesso di analizzare la presenza di prodotti di glicazione fluorescenti avanzata nei campioni di HDL incubate nelle diverse condizioni sperimentali. Uno spettro rappresentativo è mostrato nella *Figura 19*. Come verrà meglio discusso nelle prossime pagine, è evidente la maggiore efficienza di glicazione del metilgliosale 1000 μM nella produzione di AGEs, rispetto a quella del fruttosio alla concentrazione più bassa (5,5 μM).

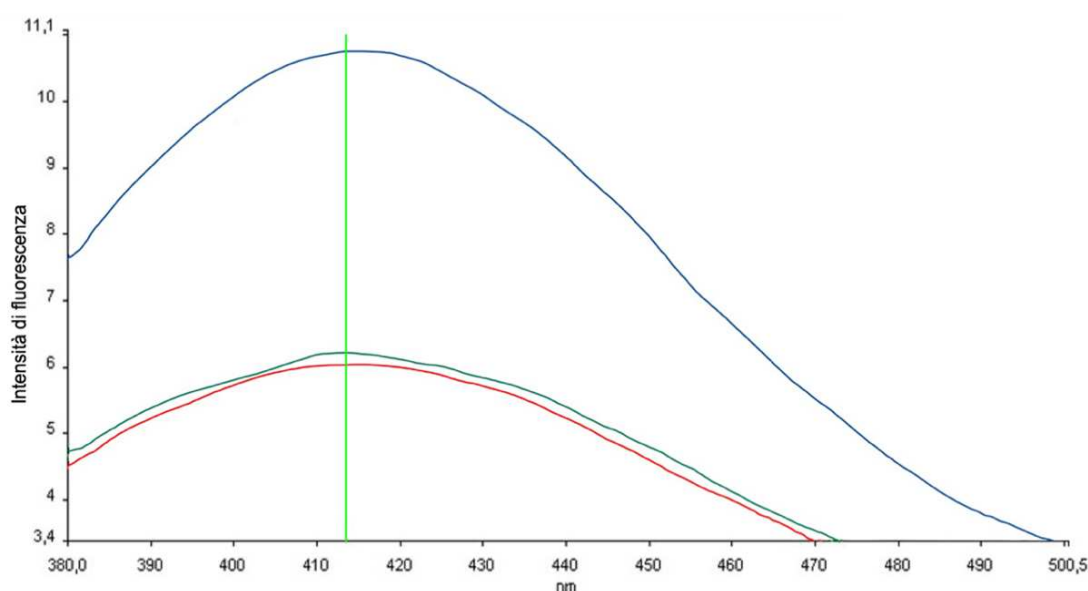


Figura 19: Spettro di emissione della fluorescenza degli AGEs in campioni di HDL con 100 $\mu\text{g/ml}$ di proteine incubati per 3 giorni a 37 °C con MGO 1000 μM e fruttosio 5,5 μM , rispetto al controllo. ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$)

In una fase preliminare sono stati indagati gli spettri di emissione utilizzando diverse lunghezze d'onda di eccitazione; infatti, dall'esame della letteratura emerge che alcuni AGEs fluorescenti hanno massimi di emissione a lunghezze d'onda diverse. Nelle nostre condizioni non sono stati rilevati AGEs fluorescenti diversi da quelli riportati in *Figura 19*.

I risultati più significativi sono relativi ai campioni trattati con MGO 1000 μM . Il metilgliosale, infatti, alla concentrazione più bassa (10 μM) non ha generato modifiche significative in entrambe le incubazioni eseguite, fornendo dei livelli di intensità di fluorescenza pressoché identici a quelli dei controlli anche dopo un'incubazione di 14 giorni. Inoltre, confrontando i livelli di intensità del controllo incubato e di quello conservato a 4 °C, è possibile affermare che l'incubazione a 37 °C comporta di per sé una leggera alterazione dei campioni.

Nei campioni di HDL contenenti 100 $\mu\text{g/ml}$ di proteine è stato registrato un incremento percentuale del 46% dell'intensità di fluorescenza in presenza di MGO più concentrato rispetto al controllo incubato (controllo 1). Dopo sette giorni di incubazione l'aumento è stato del 214% rispetto al controllo, per poi ridursi al 156% dopo due settimane (*Figura 20*). La medesima tendenza incrementale nella produzione degli AGEs, seppur più contenuta data la minore concentrazione, si è verificata nei campioni incubati con MGO 100 μM : anche in questo caso si nota un aumento a partire da sette giorni che sembra rimanere costante (+13,8% al terzo giorno di incubazione, +102% al settimo giorno, +75% al quattordicesimo giorno). Il trattamento con fruttosio 5,5 μM non ha provocato modifiche significative; pertanto, negli esperimenti successivi sono state adottate concentrazioni di fruttosio più alte (5 mM e 20 mM), in accordo con la letteratura in cui il fruttosio è stato impiegato per ottenere la glicazione di vari tipi di

proteine. L'aumento degli AGEs è risultato elevato in presenza di MGO anche nei campioni contenenti una concentrazione proteica maggiore di HDL (500 µg/ml): l'incremento con MGO 1000 µM e 100 µM è risultato maggiore rispetto ai campioni meno concentrati sin dal terzo giorno di incubazione (*Figura 21*). Il metilgliossale 10 µM, invece, non ha dato effetti significativi in entrambe le incubazioni, fornendo dei risultati di intensità di fluorescenza pressoché identici a quelli dei controlli.

Il trattamento di glicazione con fruttosio 5,5 µM (delle HDL con 500 µg/ml di proteine) ha provocato un incremento dell'intensità di fluorescenza a 413 nm del 22,87% dopo tre giorni e del 6% dopo una settimana. Un maggior aumento degli AGEs è stato osservato nelle HDL incubate con la concentrazione maggiore di fruttosio (20 mM), con un aumento percentuale di circa il 60% rispetto al controllo dopo una settimana di incubazione, senza dare particolari variazioni nelle prime fasi del processo di glicazione. Anche l'incubazione con ribosio 20 mM ha prodotto un incremento dell'intensità di fluorescenza rispetto alle HDL di controllo (*Figura 22*). L'aumento percentuale è risultato del 48% dopo tre giorni e di circa il 90% dopo una settimana. Il confronto dei dati ottenuti dimostra un effetto glicante che si colloca tra quello prodotto dalle concentrazioni di MGO 100 e 1000 µM.

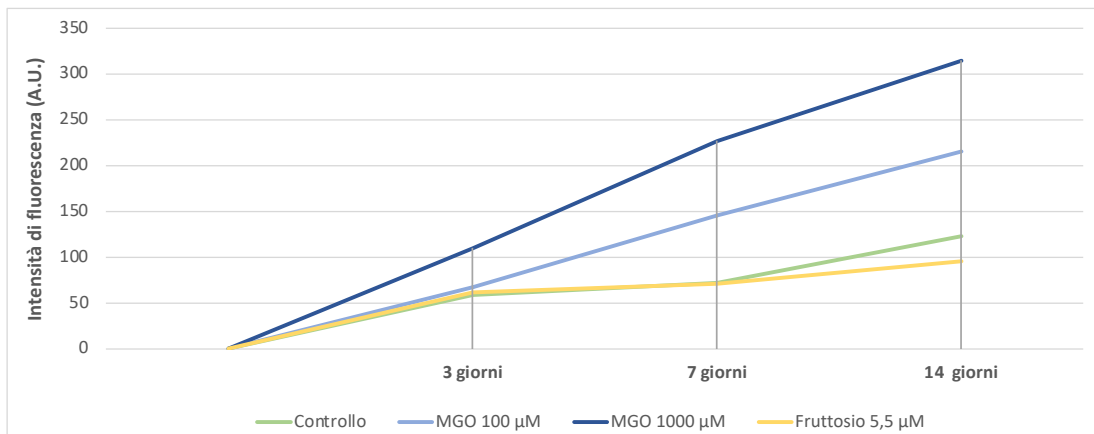


Figura 20: Aumento dei livelli di AGEs in campioni di HDL (100 µg/ml di proteine) incubati con MGO 100 µM, MGO 1000 µM e fruttosio 5,5 µM.

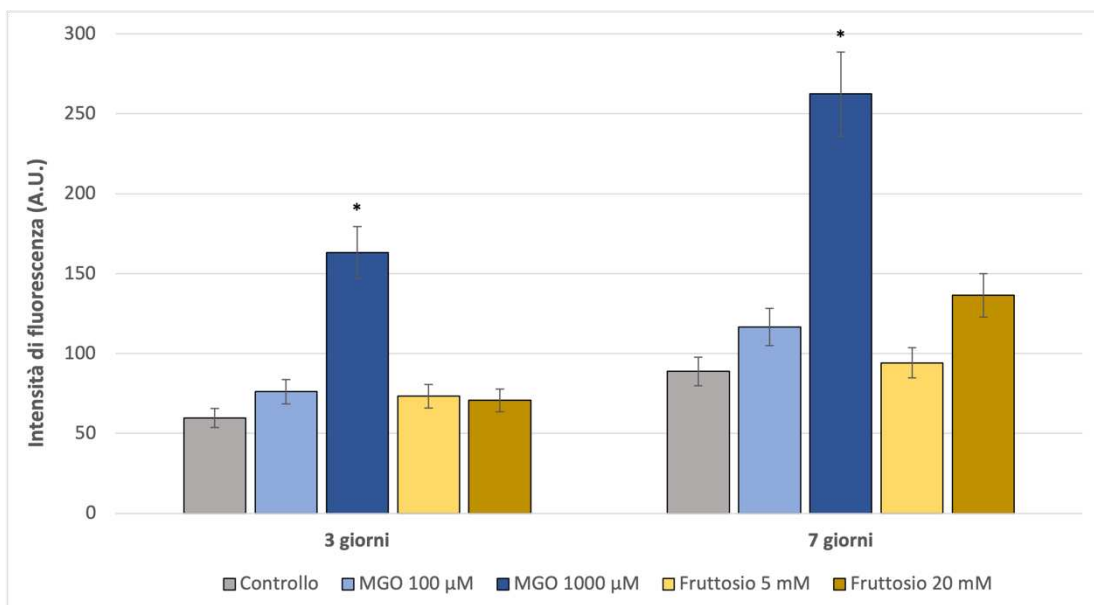


Figura 21: Aumento dei livelli di AGEs in campioni di HDL (500 µg/ml di proteine) incubati con MGO 100 µM, MGO 1000 µM, fruttosio 5 mM e 20 mM. (* p < 0,05 vs controllo)

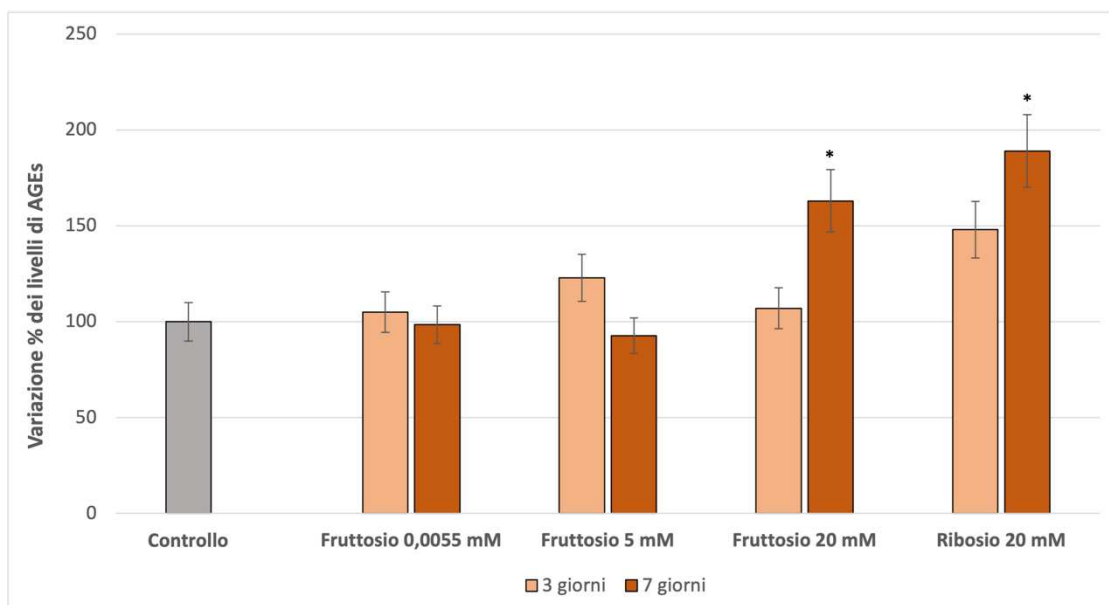


Figura 22: Variazioni percentuali dei livelli di AGEs in campioni di HDL incubati con fruttosio e ribosio, rispetto al controllo (100%). (* $p < 0,05$ vs controllo)

3.2 Analisi dei livelli di gruppi amminici liberi

Per verificare l'avvenuta glicazione proteica delle HDL incubate si è proceduto con l'analisi dei livelli di gruppi amminici liberi, quindi quelli non impegnati nel legame con i composti glicanti utilizzati o nei legami peptidici (vd. *Figura 15*). La reattività del TNBS con i gruppi $-NH_2$ delle lisine ha permesso di capire l'efficienza del trattamento dei campioni incubati, poiché questi residui amminoacidici sono fondamentali nel processo di glicazione non enzimatica poiché sono descritti come i target principali. In particolare, questo esperimento è stato utile per analizzare l'effetto del fruttosio 20 mM sulle lisine, che, come anticipato nel primo capitolo introduttivo, sarebbero il principale target della fruttosilazione. Una diminuzione dei valori di assorbanza indica un minor legame del TNBS alle lisine con formazione del composto cromogeno e quindi indica una avvenuta glicazione delle proteine. Facendo

riferimento alla retta di taratura (vd. paragrafo 2.9) e dopo aver eseguito gli opportuni calcoli, è stato ricavato il contenuto di nmol di NH_2 liberi su μg di proteine nei campioni con $500 \mu\text{g/ml}$ di proteine trattati per una settimana con MGO $1000 \mu\text{M}$, fruttosio e ribosio 20 mM e nel controllo conservato a 4°C (Figura 23). Rispetto al controllo non incubato, i campioni glicati hanno mostrato una riduzione media dei gruppi $-\text{NH}_2$ liberi del 70% dopo una settimana. Dunque, anche il fruttosio 20 mM è risultato efficace, al pari degli altri composti glicanti.

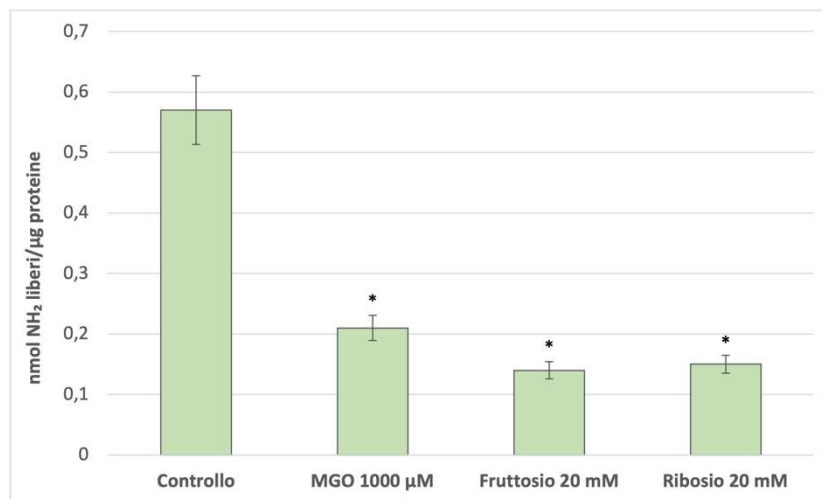


Figura 23: Livelli di $-\text{NH}_2$ non glicati dei campioni di HDL ($500 \mu\text{g/ml}$) incubati per una settimana con MGO $1000 \mu\text{M}$, fruttosio e ribosio 20 mM e del controllo.

(* $p < 0,01$ vs controllo)

3.3 Analisi della fluorescenza intrinseca del triptofano

Lo studio degli spettri di emissione della fluorescenza intrinseca del triptofano nei campioni di HDL incubati con i vari agenti glicanti è stato usato per evidenziare modificazioni della componente apoproteica. Uno spettro rappresentativo è mostrato nella *Figura 24*.

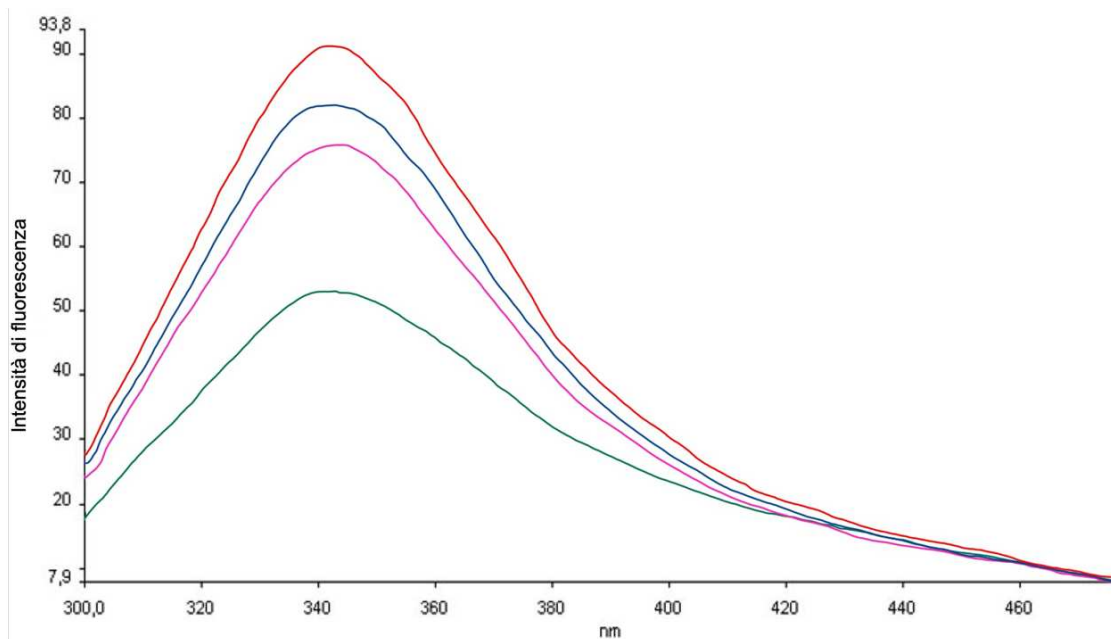


Figura 24: Spettro di emissione della fluorescenza intrinseca del triptofano in campioni di HDL con 100 $\mu\text{g/ml}$ di proteine incubati per 3 giorni a 37 °C con MGO 1000 μM , MGO 100 μM , MGO 10 μM e fruttosio 5,5 μM . ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$)

L'incubazione dei campioni con 1000 μM e 100 μM di MGO ha determinato una diminuzione dell'intensità di fluorescenza a 340 nm. Per le HDL con 100 $\mu\text{g/ml}$ di proteine la riduzione rispetto al controllo incubato è stata del 14% dopo tre giorni, per poi scendere a -54% dopo sette giorni e rimanere intorno a questo livello fino alla seconda settimana di incubazione (*Figura 25*). Nei campioni con 500 $\mu\text{g/ml}$ diluiti, la

riduzione dell'intensità della fluorescenza del triptofano è stata più importante dopo tre giorni, per poi rallentare nel corso del trattamento fino a 7 giorni. I dati sono stati confermati in altri esperimenti. La *Figura 26* riassume le medie dei dati acquisiti. Il metilgliosale si conferma un fattore determinante per la glicazione che si riflette in modificazioni dei microambienti che circondano i residui di triptofano delle proteine associate alle HDL.

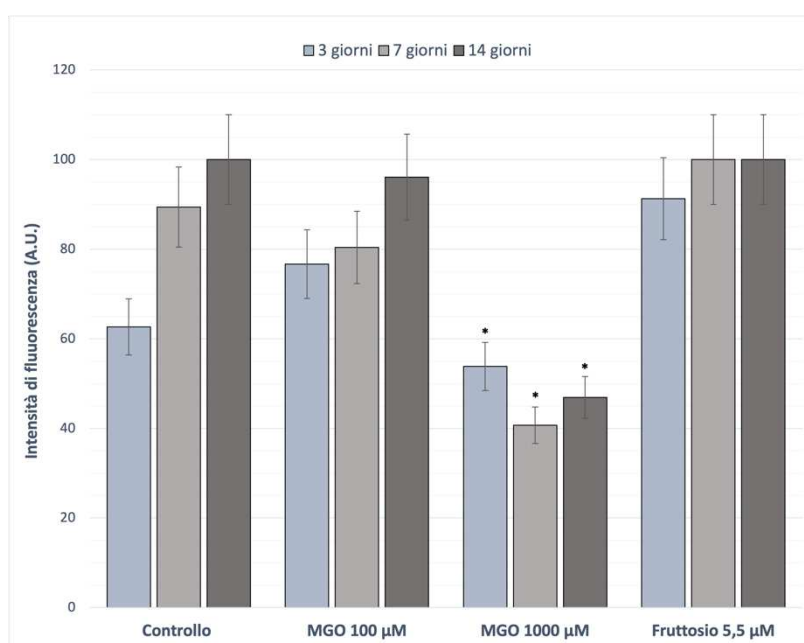


Figura 25: Livelli di intensità di emissione della fluorescenza del triptofano a 340 nm dei campioni con 100 µg/ml di proteine HDL incubati fino a 14 giorni con MGO 100 µM, MGO 1000 µM e fruttosio 5,5 µM e del controllo. (p < 0,01 vs. controllo)*

Anche per questa analisi, la concentrazione del metilgliosale si riconferma un fattore determinante l'effetto della glicazione sulle modificazioni strutturali delle proteine associate alle HDL.

Nel capitolo concernente la discussione dei risultati ottenuti, verranno fornite delucidazioni riguardo all'influenza della concentrazione delle proteine incubate e del tempo di incubazione sulla diminuzione dell'intensità di emissione.

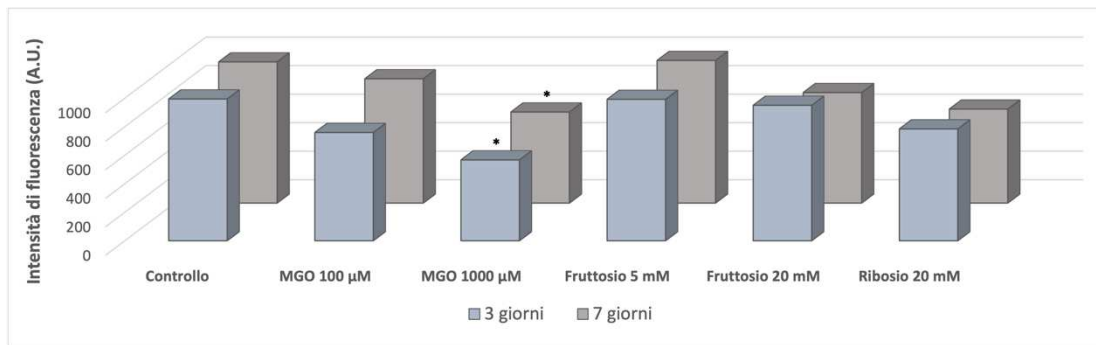


Figura 26: Livelli di intensità di emissione della fluorescenza del triptofano a 340 nm dei campioni con 500 µg/ml di proteine HDL incubati fino a 7 giorni con MGO 100 µM, MGO 1000 µM, fruttosio 5 mM e del controllo. (* $p < 0,01$ vs. controllo)

3.4 Valutazione della ipercromicità

L'analisi delle variazioni dell'assorbanza a 280 nm ha permesso di confermare l'esistenza di modificazioni nella struttura delle proteine legate alla HDL, a seguito della loro glicazione con MGO. Come negli altri esperimenti, il fruttosio si è mostrato piuttosto inefficace nell'alterare la struttura delle proteine in esame: infatti, i valori di assorbanza registrati sono pressoché invariati rispetto ai controlli. I seguenti grafici offrono una visione complessiva dei risultati relativi al saggio di ipercromicità nelle diverse condizioni sperimentali adottate (*Figure 27 e 28*).

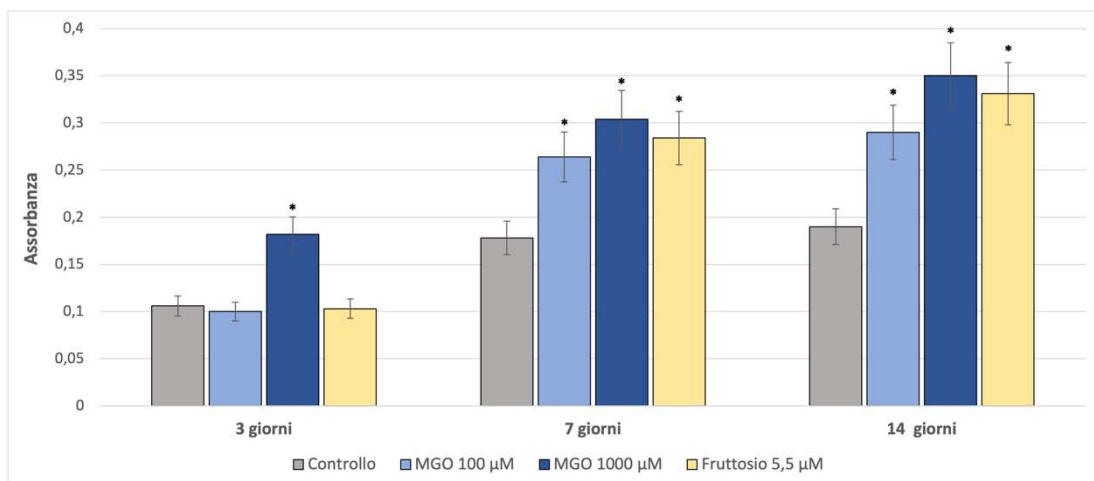


Figura 27: Variazioni dei livelli di assorbanza a 280 nm dei campioni con 100 µg/ml di proteine HDL incubati fino a 14 giorni con MGO 100 µM, MGO 1000 µM, fruttosio 5,5 µM e del controllo. (* $p < 0,05$ vs controllo)

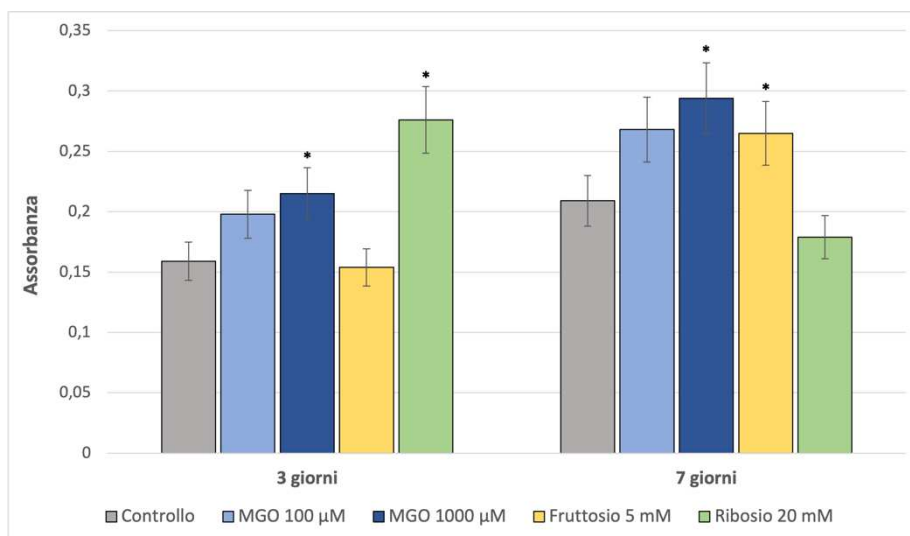


Figura 28: Variazioni dei livelli di assorbanza a 280 nm dei campioni con 500 µg/ml di proteine HDL incubati fino a 7 giorni con MGO 100 µM, MGO 1000 µM, fruttosio 5 mM e del controllo. (* $p < 0,05$ vs. controllo)

3.5 Valutazione delle proprietà antiossidanti delle HDL mediante saggio della rodamina

Come spiegato nel paragrafo 2.8, la diidrorodamina 123 (DHR) viene convertita in rodamina in presenza di ossigeno con conseguente emissione di fluorescenza a 538 nm se eccitata a 485 nm. Anche la sola DHR, se esposta all'aria, è in grado di auto ossidarsi [Kelesidis et al., 2011]. In presenza di HDL, l'ossidazione della DHR viene modulata e ciò si rifletterebbe con modifiche dell'intensità di fluorescenza nel tempo rispetto a un controllo privo di HDL. Ottenendo i valori medi della velocità di ossidazione della diidrorodamina 123 (RFU/min = unità relativa di fluorescenza al minuto) tra i 20 e 120 minuti di lettura, è stato possibile esaminare l'effetto delle HDL a seguito della loro glicazione rispetto a HDL non trattate. I campioni incubati con MGO 1000 µM hanno determinato un maggior livello di ossidazione della DHR, con un aumento del 98,37% rispetto al controllo nei campioni con 100 µg/ml di proteine e del 77,36% nei campioni

con 500 $\mu\text{g/ml}$ di proteine. I campioni trattati con concentrazioni crescenti di fruttosio (0,0055 mM, 5 mM e 20 mM), invece, non modificano l'emissione della fluorescenza della rodamina, il cui livello di ossidazione appare molto simile a quello dei controlli. L'aggiunta dell'agente ossidante AAPH (2,2'-Azobis-2-methylpropionamide) ha comportato un aumento della fluorescenza della rodamina (*Figure 31 e 32*) rispetto a quanto ottenuto in assenza di APPH (*Figure 29 e 30*). Infatti, l'AAPH è un agente chimico che genera radicali liberi durante l'incubazione. In presenza di HDL sia trattate sia non trattate non sono state osservate differenze significative della fluorescenza della rodamina. Un'immagine riassuntiva dei risultati ottenuti da questo saggio è la *Figura 33*.

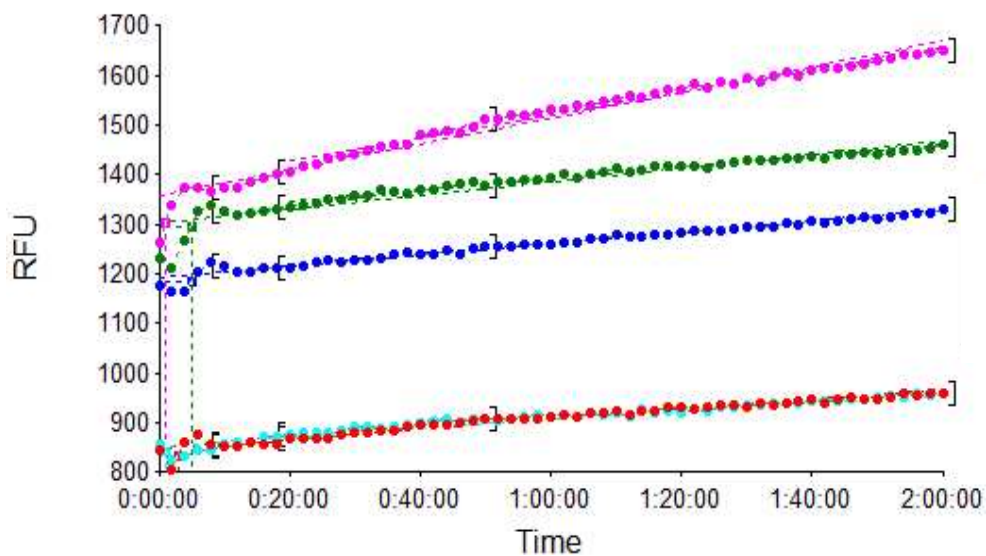


Figura 29: Tasso di variazione dell'emissione di fluorescenza della rodamina, espresso in FU/min, in presenza di campioni di HDL (500 $\mu\text{g/ml}$) glicati con MGO 1000 μM , MGO 100 μM e fruttosio 5 mM. In rosso è raffigurato il controllo e in azzurro il bianco.

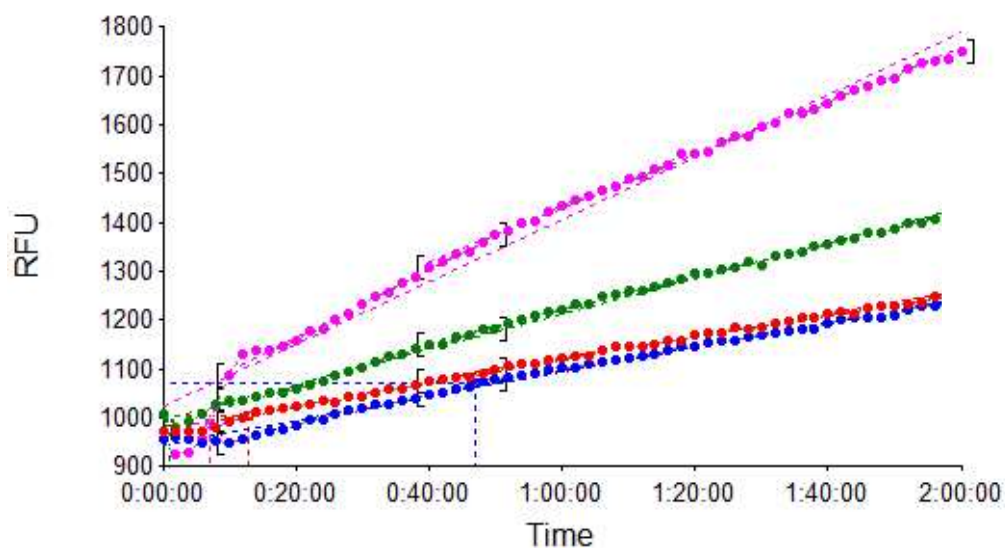


Figura 30: Tasso di variazione dell'emissione di fluorescenza della rodamina, espresso in FU/min, in presenza di campioni di HDL (100 $\mu\text{g/ml}$) glicati con MGO 1000 μM , MGO 100 μM e fruttosio 5,5 μM rispetto al controllo.

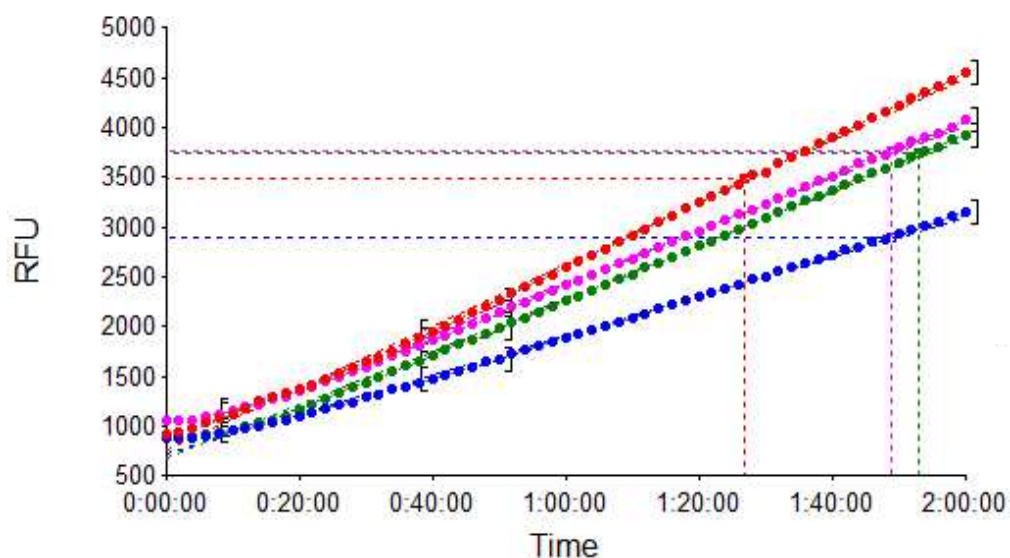


Figura 31: Tasso di variazione dell'emissione di fluorescenza della rodamina, espresso in FU/min, in presenza di campioni di HDL (500 $\mu\text{g/ml}$) glicati con fruttosio 20 mM e ribosio 20 mM, rispetto ai relativi controlli (*ctrl_{fruttosio}* e *ctrl_{ribosio}*), con aggiunta di AAPH.

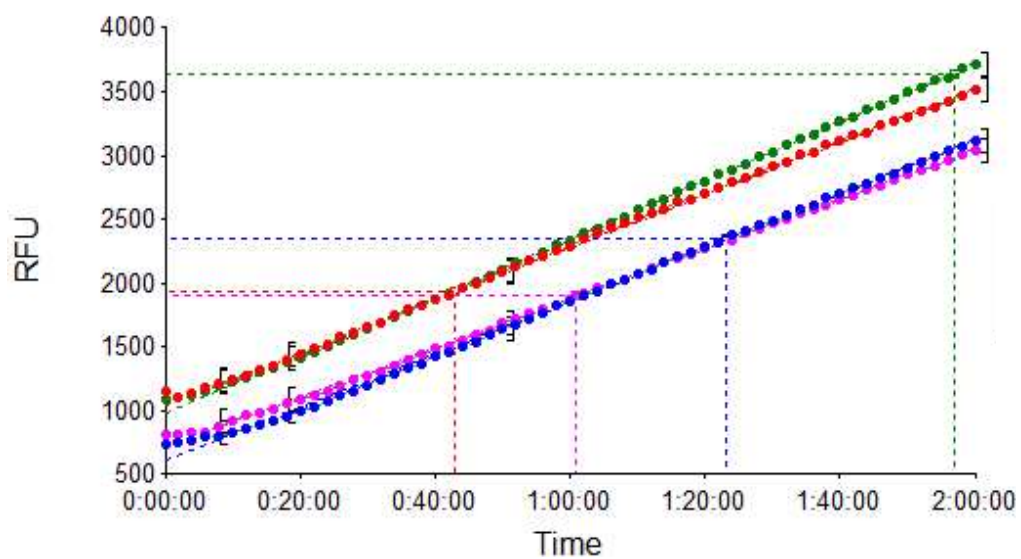


Figura 32: Tasso di variazione dell'emissione di fluorescenza della rodamina, espresso in FU/min, in presenza di campioni di HDL (500 $\mu\text{g/ml}$) glicati con MGO 1000 μM , MGO 100 μM , fruttosio 5 mM e del controllo, con aggiunta di AAPH.

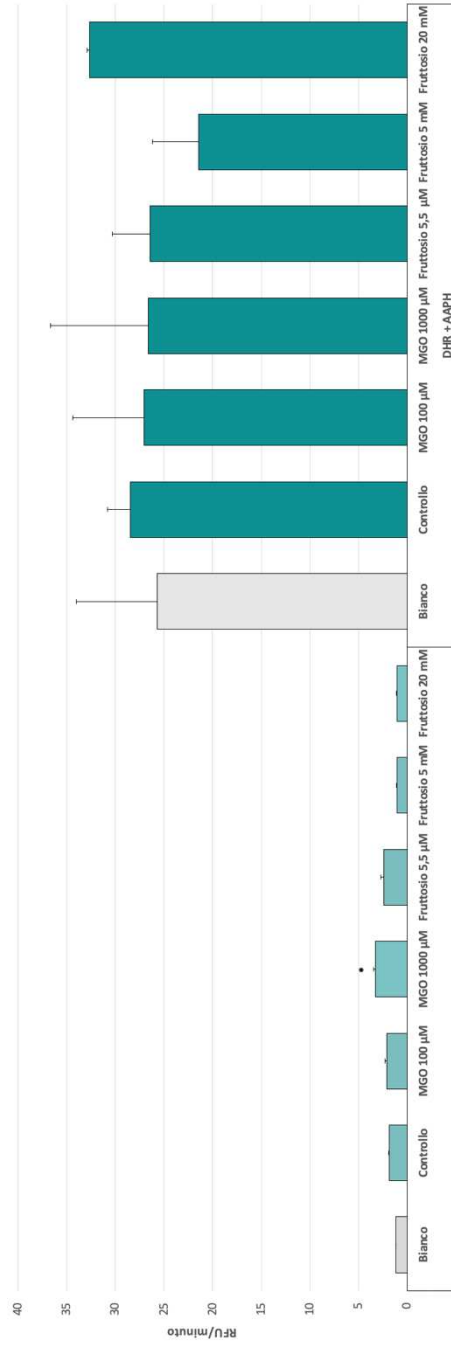


Figura 33: Livelli medi di RFU/minute della rodamina in assenza e in presenza di AAPH nei campione glicati e nei controlli. (* $p < vs.$ controllo)

3.6 Studio dell'attività lattonasica della *Paraoxonasi-1*

Tra le diverse reazioni idrolitiche svolte dalla PON1 è stata scelta quella lattonasica, anziché quella paraoxonasi, per evitare l'uso del substrato tossico paraoxon. La rilevazione della fluorescenza a 270 nm per circa 10 minuti ha permesso di verificare l'attività enzimatica della paraoxonasi-1 nei campioni incubati con MGO 1000 μ M, fruttosio e ribosio 20 mM per una settimana, rispetto a HDL non trattate. Prima di eseguire l'esperimento, è stata determinata la concentrazione proteica dei campioni sopra citati attraverso il saggio dell'acido bicinconinico. I risultati ottenuti dell'attività enzimatica in U/mg di proteine sono stati: $24,77 \pm 0,233$ U/mg per il controllo, $7,23 \pm 0,646$ per il campione con MGO 1000 μ M, $8,094 \pm 0,726$ per il campione con fruttosio 20 mM e $7,97 \pm 0,557$ per il campione con ribosio 20 mM. La riduzione dell'attività della paraoxonasi è risultata simile nei diversi campioni, con un'attività media $7,76 \pm 0,467$ U/mg e un calo percentuale rispetto al controllo del 68,67%. I livelli di attività dei vari campioni sono illustrati nella *Figura 34*.

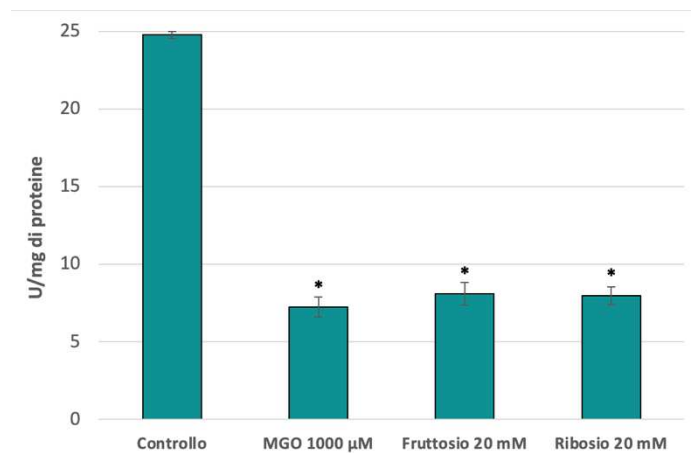


Figura 34: Livelli di attività dell'enzima paraoxonasi-1 dei campioni di HDL (500 μ g/ml) incubati per una settimana con MGO 1000 μ M, fruttosio e ribosio 20 mM e del controllo. ($p < 0,01$ vs. controllo)*

4 - DISCUSSIONE -

Obiettivo della tesi è stato lo studio della suscettibilità delle HDL alla glicazione indotta *in vitro* con diversi agenti glicanti (metilgliosale, ribosio e fruttosio). L'argomento ha una rilevanza fisiopatologica, in quanto il livello di queste molecole risulta particolarmente elevato in soggetti diabetici e un aumento di proteine glicate è stato osservato nel plasma di questi pazienti. La glicazione delle proteine provoca alterazioni strutturali e funzionali [Sarmah and Roy, 2022].

MGO Come dimostrato nella parte sperimentale, i risultati dell'intensità di fluorescenza per la valutazione dei livelli di AGEs (paragrafo 3.1), prodotti durante l'incubazione delle HDL con il metilgliosale, hanno evidenziato un aumento dei prodotti fluorescenti di glicazione avanzata. L'effetto è stato maggiore nei campioni incubati con MGO 1000 μM , rispetto a concentrazioni inferiori di MGO (100 μM e 10 μM). Il metilgliosale si è confermato, dunque, un efficace responsabile della formazione degli AGEs, ma solo a una concentrazione elevata. Inoltre, l'azione del metilgliosale è risultata piuttosto rapida. Questo fenomeno è stato confermato anche nelle incubazioni con maggiori quantità di HDL (500 $\mu\text{g/ml}$ di proteine). L'aumento è stato osservato già dopo una settimana di trattamento e con tempi di incubazione più lunghi si ottengono percentuali d'incremento maggiori. La glicazione delle HDL in presenza di metilgliosale è stata confermata dalla diminuzione dei livelli di gruppi

-NH₂ liberi, come evidenziato dal saggio del TNBS nelle HDL incubate con MGO rispetto alle HDL non trattate.

La cinetica della reazione di glicazione non enzimatica delle proteine è stata ampiamente studiata. A differenza delle prime fasi piuttosto rapide, i riarrangiamenti strutturali dei prodotti di Amadori o di Heyns, a cui segue la formazione di AGEs stabili e irreversibili, richiedono settimane o mesi [Luevano-Contreras and Chapman-Novakofski, 2010]. In uno studio condotto da Bacchetti e collaboratori [Bacchetti et al., 2017], l'incubazione delle HDL con MGO 1 mM ha determinato una diminuzione dei gruppi amminici liberi del 38% solo dopo 24 ore. Questo dato dimostra la rapidità della prima fase della glicazione non enzimatica. In un altro studio del gruppo di ricerca di Bacchetti [Islam et al., 2022], l'incubazione delle HDL per una settimana ha determinato un calo dei gruppi amminici liberi del 40% rispetto alle HDL non glicate. La sintesi dei prodotti avanzati di glicazione a partire dal metilgliosale avviene con andamenti diversi da altre molecole glicanti e viene descritto un percorso che bypassa la formazione dei prodotti di Amadori. Questo pathway alternativo procede, quindi, con cinetiche più rapide ed efficienti [Takeuchi et al., 2016]. I dati ottenuti possono avere una rilevanza fisiologica, poiché le HDL hanno un'emivita di diversi giorni in circolo ed è noto che *in vivo* il metilgliosale e altri composti carbonilici attivi (come il gliosale e il 3-deossigliucosone) possono formarsi non solo a partire dalla glicolisi o dalla via dei polioli e dalla degradazione delle basi di Schiff o dei prodotti di Amadori, ma anche dall'autossidazione del glucosio e dalla perossidazione lipidica (Figura 35).

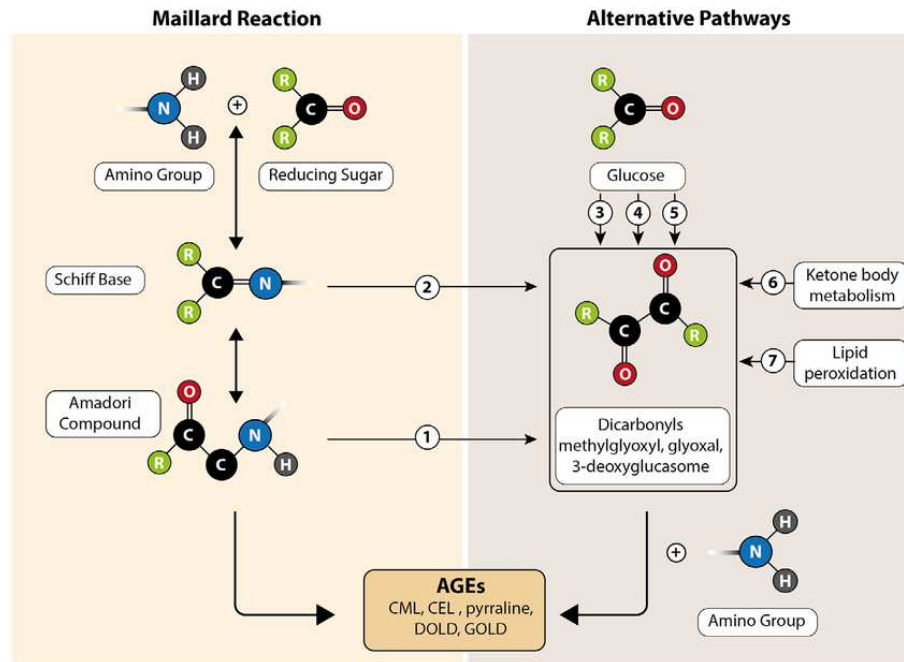


Figura 35: Pathways di sintesi degli AGEs. ① Hodge pathway: autossidazione dei prodotti di Amadori o di Heyns; ② Namiki pathway: autossidazione della base di Schiff; ③ Wolff pathway: autossidazione del glucosio catalizzata da metalli; ④ intermedi della glicolisi; ⑤ via dei polioli; ⑥ metabolismo dei corpi chetonici derivanti da amminoacidi; ⑦ perossidazione lipidica. [Sergi et al., 2020].

La glicazione in presenza di MGO è accompagnata da modificazioni della componente apoproteica, come evidenziato dalla diminuzione della fluorescenza del triptofano a 340 nm e dall'aumento dell'ipercromicità a 280 nm. Lo studio degli spettri di fluorescenza del triptofano ha evidenziato infatti che le HDL con MGO hanno livelli di intensità più bassi rispetto ai controlli. I dati sottolineano che l'effetto della glicazione si traduce in modificazioni dell'esposizione dei residui di triptofano all'ambiente acquoso e suggeriscono un cambiamento conformazionale delle apoproteine associate alle HDL glicate. I risultati ottenuti sono in accordo con studi precedenti condotti sulla glicazione delle proteine mediante metilgliosale [Godfrey et al., 2014].

È noto che le reazioni di glicazione e gli AGEs risultanti possono alterare in modo permanente la struttura e le funzioni delle proteine [Gill et al., 2019]. La maggior parte delle proteine adotta una struttura nativa compatta, che è energeticamente stabilizzata dalla presenza di diversi tipi di interazioni tra amminoacidi. Pertanto, qualsiasi fenomeno fisico o chimico che possa interrompere queste forze innescherà cambiamenti strutturali delle proteine. Come detto precedentemente, residui di lisina e arginina sono quelli più suscettibili alla glicazione, la quale porta alla formazione di legami intra e intermolecolari crociati e compromette, così, la stabilità proteica. Più nel dettaglio, la formazione dei prodotti finali di glicazione modifica le catene laterali ed elimina le cariche positive delle lisine e delle arginine. Nelle nostre condizioni sperimentali, sono state evidenziate variazioni dell'ipercromicità a 280 nm, dimostrando alterazioni strutturali delle apolipoproteine provocate dalla glicazione delle HDL. Nonostante variazioni dell'assorbanza più significative siano state osservate nei campioni incubati con il metilgliosale, dipendentemente dalla sua concentrazione e dal tempo, in questo caso anche il fruttosio sembra aver apportato modificazioni, seppur minori, alla struttura delle proteine associate alle HDL.

Fruttosio È stato ipotizzato che *in vivo* questo monosaccaride potrebbe risultare più efficace del glucosio nel causare la glicazione delle proteine, per la maggiore capacità di generare i dicarbonili precursori degli AGEs [Wang et al., 2017]. Nella parte sperimentale, abbiamo dimostrato che le HDL sono suscettibili anche all'azione glicante del fruttosio, ma l'effetto si osserva a concentrazioni maggiori rispetto al MGO (fruttosio 5 mM e 20 mM). Infatti, a concentrazioni molto basse ma

corrispondenti ai livelli plasmatici, il fruttosio 5,5 μM non esercita un effetto significativo sulle HDL. Aumentando la concentrazione del fruttosio (da 0,0055 mM a 5 mM e 20 mM, come proposto da studi precedenti) non sono state osservate differenze significative dei livelli di intensità di emissione di fluorescenza, sia del triptofano che degli AGEs. Tuttavia, la diminuzione dei livelli di gruppi $-\text{NH}_2$, evidenziata dal saggio del TNBS, e l'aumento dell'ipercromicità a 280 nm suggeriscono che il fruttosio ha sortito un certo effetto sulle proteine delle HDL incubate. Gli studi pubblicati si concentrano sulla fruttosilazione di diverse proteine plasmatiche, quali l'albumina e l'emoglobina, o sulle sole apolipoproteine [Park et.al, 2010], ma non sulle HDL intere. Sebbene le modifiche osservate siano in percentuali minori rispetto a quelle provocate dal MGO, i dati ottenuti confermano che la glicazione indotta dal fruttosio provoca modificazioni della componente apoproteica associata alle HDL dopo sette giorni di incubazione. Altri autori hanno studiato l'effetto glicante a concentrazioni di fruttosio molto elevate e prolungando i tempi di incubazione oltre le due settimane [Muraoka et al., 2022]; tali dati, tuttavia, non rappresentano un modello sperimentale vicino alle condizioni fisiologiche. Per spiegare, dunque, i livelli più bassi di AGEs prodotti dall'azione del fruttosio possono essere formulate diverse ipotesi. Si presume che la glicazione possa generare AGEs non fluorescenti: il risultato della glicazione innescata dal fruttosio possono essere degli AGEs non in grado di emettere fluorescenza (vd. paragrafo 2.6). Uno di questi prodotti di glicazione è la carbossimetil-lisina. Altri esempi sono la fruttosamina e la pirralina. Inoltre, attualmente non si conoscono tutti composti di glicazione derivanti dal fruttosio, i cosiddetti "Fru-AGEs" e la loro identificazione richiede, dunque,

tecniche più sofisticate, quali la spettroscopia di massa, la cromatografia o metodiche immunologiche.

Tra le ipotesi formulate per spiegare la minore glicazione indotta dal fruttosio sulle HDL rispetto ad altre proteine, si ipotizza anche un effetto modulatore esercitato dalle interazioni lipidi-apoproteine che potrebbero rendere meno disponibili le lisine o altri amminoacidi delle apolipoproteine. Infatti, è noto che le apolipoproteine presentano vari domini amminoacidici a contatto con i fosfolipidi presenti sulla superficie delle lipoproteine e interazioni di natura elettrostatica tra essi potrebbero modulare la suscettibilità alla glicazione. La conferma che le interazioni lipidi-apoproteine modulano la suscettibilità alla glicazione è supportata da studi precedenti. Nello studio di Bacchetti e collaboratori [Bacchetti et al., 2017], l'incubazione della ApoA-I priva di lipidi con MGO 1000 μ M ha comportato una maggiore riduzione dei gruppi amminici liberi rispetto alle HDL intatte. Quindi una minore interazione tra proteine e lipidi che costituiscono le HDL consentirebbe un effetto maggiore della glicazione. Un'altra ipotesi è la minore reattività dei composti intermedi di glicazione indotti dal fruttosio: i riarrangiamenti strutturali che si verificano nella fase iniziale della glicazione delle proteine con il fruttosio portano alla formazione dei prodotti di Heyns. Questi ultimi presentano un gruppo aldeidico meno reattivo rispetto a quello a-idrossicarbonilico dei prodotti di Amadori. Le modificazioni a cui vanno incontro i prodotti di Heyns sono minori o necessitano di tempi più lunghi, proprio per il differente gruppo funzionale che li caratterizza [Yeboah et al. 1999].

Ribosio Alcuni studi hanno dimostrato la capacità del ribosio di glicare diverse proteine [Wei et al., 2012]. Nelle nostre condizioni sperimentali abbiamo evidenziato un effetto glicante esercitato anche dal ribosio 20 mM sulle HDL. La diminuzione dei

livelli di gruppi -NH₂ dopo il trattamento di glicazione si realizza come nelle HDL incubate con fruttosio 20 mM.

Dopo aver esaminato la componente strutturale delle proteine glicate e la presenza di AGEs nei campioni di HDL, si è passati all'analisi della funzionalità delle HDL incubate mediante valutazione dell'attività della PON1 e il saggio biochimico basato sull'ossidazione della diidrorodamina 123. L'attività della paraoxonasi-1 dei campioni incubati per una settimana con vari agenti glicanti è risultata più bassa rispetto al controllo. I dati ottenuti sono in accordo con studi precedenti in cui è stata studiata l'azione glicante esercitata dal glucosio sulle HDL. Bacchetti et al. hanno dimostrato che la PON1 ha una minore attività enzimatica nelle HDL glicate che possono essere, pertanto, definite disfunzionali. Altre alterazioni funzionali delle HDL sono state osservate dopo la glicazione, come una diminuzione della capacità di sostenere l'efflusso di colesterolo dalle membrane cellulari [Apro et al., 2016]. Una diminuzione dell'attività della PON è stata dimostrata in pazienti affetti da dislipidemia, diabete mellito, ipercolesterolemia e sindrome metabolica, anche in assenza di particolari varianti del gene della paraoxonasi [Ferretti et al., 2005]. In uno studio di El-said e collaboratori [El-said et al., 2015], l'attività della PON è risultata ridotta di circa il 70% nelle HDL isolate da soggetti diabetici rispetto ai soggetti sani. I cambiamenti strutturali nelle HDL si riflettono nella compromissione dell'attività della PON, aumentando il rischio di eventi aterosclerotici.

Il saggio biochimico basato sull'ossidazione della diidrorodamina 123 è stato proposto come un test utile per studiare la capacità redox e antiossidante delle HDL. Un aumento dell'ossidazione della DHR è associato ad una maggiore emissione della fluorescenza (*Figura 36*).

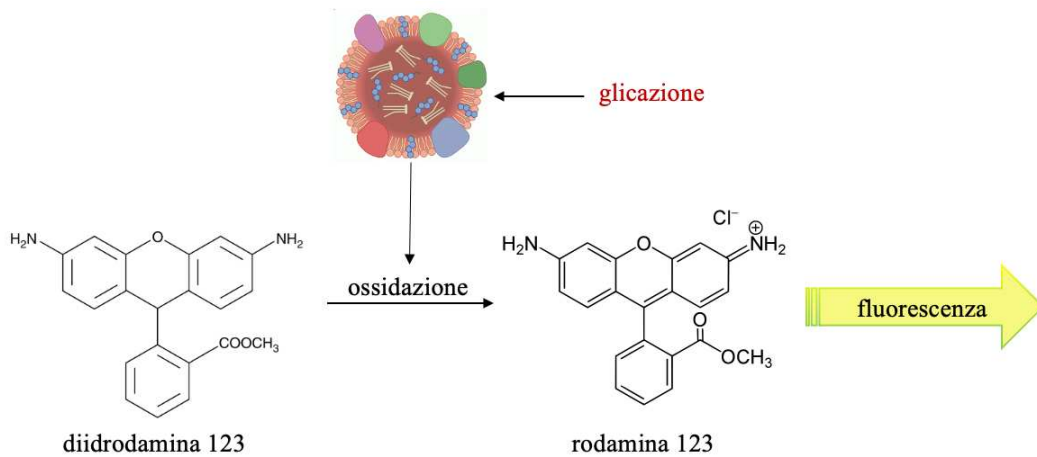


Figura 36: Induzione dell'ossidazione della diidrorodamina in rodamina da parte delle HDL glicate/alterate e conseguente emissione di fluorescenza a 538nm.

I livelli più alti del tasso di ossidazione della DHR (FU/min) dei campioni con MGO 1000 μ M, rispetto ai controlli con HDL non glicate, dimostrano che la capacità antiossidante delle HDL glicate sia stata alterata. L'attività redox delle HDL è stata determinata anche mediante l'inibizione dell'ossidazione della diidrorodamina avviata dall'AAPH. Con l'aggiunta di questo composto ossidante le differenze in FU/min tra controlli e campioni glicati diventano minime. Studi successivi sono necessari per comprendere i meccanismi molecolari alla base dei risultati ottenuti e se la presenza dell'AAPH, agente in grado di ossidare le HDL [Deakin et al., 2007], influenza la

cinetica dell'ossidazione. I valori elevati di FU/minuto anche per i controlli potrebbero essere spiegati dall'ossidazione delle HDL non glicate mediante AAPH, da cui ne conseguirebbe la perdita della funzionalità antiossidante al pari delle HDL glicate.

5 - CONCLUSIONI -

In conclusione, questo studio conferma l'efficacia del metilgliosale nella sintesi dei prodotti di glicazione avanzata (AGEs), che hanno determinato l'alterazione strutturale e variazioni del potere antiossidante delle HDL. La glicazione non enzimatica innescata dal metilgliosale risulta piuttosto rapida e dipendente dalla sua concentrazione: variazioni significative sono state registrate sin dopo tre giorni di trattamento e impiegando una concentrazione di MGO 1 mM. L'aumento dei livelli di AGEs è accompagnato da modifiche delle proteine e da una diminuzione significativa dell'attività della PON1. La paraoxonasi esercita un ruolo antiossidante e anti-infiammatorio e la sua presenza nelle HDL conferisce loro un ruolo protettivo contro il danno ossidativo. Nei pazienti affetti da diabete, i livelli di MGO risultano elevati rispetto ai soggetti sani, pertanto rappresentano insieme all'iperglicemia, un ulteriore fattore di rischio che può contribuire ad alterazioni funzionali delle HDL che possono contribuire alla insorgenza di complicanze,

Il fruttosio e il ribosio, sebbene abbiano causato un minore aumento di AGEs fluorescenti, esercitano un impatto sull'alterazione della componente apoproteica, che si riflette nella diminuzione della funzionalità delle HDL trattate. È risaputo che il fruttosio *in vivo* rappresenta un potenziale agente in grado di alterare la struttura delle proteine soprattutto se presente in elevate concentrazioni, come riscontrato nei soggetti

diabetici. La fruttosilazione, a differenza della glicazione causata dal metilgliosale, prevede molte più fasi e, di conseguenza, il tempo necessario per la formazione di AGEs stabili è ritenuto superiore.

L'analisi dei composti carbonilici e l'identificazione di AGEs non fluorescenti potrebbero chiarire meglio le dinamiche e i tempi della glicazione non enzimatica esercitata dal fruttosio e dal ribosio.

Lo studio della glicazione innescata *in vitro* conferma la suscettibilità delle HDL a modifiche composizionali in presenza di agenti glicanti come MGO, fruttosio e ribosio. Le modifiche a carico delle proteine, sebbene si realizzino con diverse dinamiche e a diverse concentrazioni, provocano una diminuzione dell'attività della PON1 e suggeriscono proprietà disfunzionali delle HDL. Il modello sperimentale delle HDL glicate *in vitro* si conferma utile per studiare le proprietà glicanti di vari fattori e per indagare l'effetto protettivo di diversi composti bioattivi nei confronti della glicazione delle proteine.

BIBLIOGRAFIA

Allaman, I., BÄ©langer, M. and Magistretti, P.J. (2015) 'Methylglyoxal, the dark side of glycolysis', *Frontiers in Neuroscience*, 9. doi:10.3389/fnins.2015.00023.

Apro, J. et al. (2016) 'Impaired cholesterol efflux capacity of high-density lipoprotein isolated from interstitial fluid in type 2 diabetes mellitus—brief report', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(5), pp. 787–791. doi:10.1161/atvbaha.116.307385.

Aragno, M. and Mastrocola, R. (2017) 'Dietary sugars and endogenous formation of advanced glycation endproducts: Emerging mechanisms of disease', *Nutrients*, 9(4), p. 385. doi:10.3390/nu9040385.

Aronson, D. (2008) 'Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications', *Advances In Cardiology*, pp. 1–16. doi:10.1159/000115118.

Bacchetti, T. *et al.* (2006) 'Structural modifications of HDL and functional consequences', *Atherosclerosis*, 184(1), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.08.008.

Bacchetti, T. *et al.* (2014) 'Glycation of human high density lipoprotein by methylglyoxal: Effect on HDL-paonoxonase activity', *Metabolism*, 63(3), pp. 307–311. doi:10.1016/j.metabol.2013.10.013.

Bérard, A.M. *et al.* (1997) ‘High plasma HDL concentrations associated with enhanced atherosclerosis in transgenic mice overexpressing lecithinchoesteryl acyltransferase’, *Nature Medicine*, 3(7), pp. 744–749. doi:10.1038/nm0797-744.

Bérard, A.M. *et al.* (1997) “High plasma HDL concentrations associated with enhanced atherosclerosis in transgenic mice overexpressing lecithinchoesteryl acyltransferase,” *Nature Medicine*, 3(7), pp. 744–749. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm0797-744>.

Bonizzi, A. *et al.* (2021) “HDL dysfunctionality: Clinical relevance of quality rather than quantity,” *Biomedicines*, 9(7), p. 729. Available at: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070729>.

Briggs, C.J. *et al.* (1981) ‘Evaluation of the polyethylene glycol precipitation method for the estimation of high-density lipoprotein cholesterol’, *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, 18(3), pp. 177–181. doi:10.1177/000456328101800309.

Brites, F. *et al.* (2017) “Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit,” *BBA Clinical*, 8, pp. 66–77. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2017.07.002>.

Cayot, P. and Tainturier, G. (1997) ‘The quantification of protein amino groups by the Trinitrobenzenesulfonic Acid Method: A Reexamination’, *Analytical Biochemistry*, 249(2), pp. 184–200. doi:10.1006/abio.1997.2161.

Chen, Y. *et al.* (2019) ‘D-ribose contributes to the glycation of serum protein’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1865(9), pp. 2285–2292. doi:10.1016/j.bbadis.2019.05.005.

Davies, H.G. *et al.* (1996) “The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, Soman and Sarin,” *Nature Genetics*, 14(3), pp. 334–336. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng1196-334>.

Deakin, S., Moren, X. and James, R.W. (2007) 'HDL oxidation compromises its influence on paraoxonase-1 secretion and its capacity to modulate enzyme activity', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(5), pp. 1146–1152. doi:10.1161/atvbaha.107.141747.

Denimal, D. *et al.* (2017) 'Impairment of the ability of HDL from patients with metabolic syndrome but without diabetes mellitus to activate Enos', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(5), pp. 804–811. doi:10.1161/atvbaha.117.309287.

Denimal, D. *et al.* (2023) 'High-density lipoprotein alterations in type 2 diabetes and obesity', *Metabolites*, 13(2), p. 253. doi:10.3390/metabo13020253.

Du, X.-M. *et al.* (2015) 'HDL particle size is a critical determinant of ABCA1-mediated macrophage cellular cholesterol export', *Circulation Research*, 116(7), pp. 1133–1142. doi:10.1161/circresaha.116.305485.

Duriez, P. and Fruchart, J.C. (1999) 'High-density lipoprotein subclasses and apolipoprotein A-I', *Clinica Chimica Acta*, 286(1–2), pp. 97–114. doi:10.1016/s0009-8981(99)00096-0.

Ferretti, G. *et al.* (2001) 'Effect of glycation of high density lipoproteins on their physicochemical properties and on paraoxonase activity', *Acta Diabetologica*, 38(4), pp. 163–169. doi:10.1007/s592-001-8074-z.

Ferretti, G. *et al.* (2005) 'Paraoxonase activity in high-density lipoproteins: A comparison between healthy and obese females', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(3), pp. 1728–1733. doi:10.1210/jc.2004-0486.

Ferretti, G. *et al.* (2006) 'Structural modifications of HDL and functional consequences', *Atherosclerosis*, 184(1), pp. 1–7. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.08.008.

Gaidukov, L. and Tawfik, D.S. (2005) 'High affinity, stability, and Lactonase activity of serum paraoxonase PON1 anchored on HDL with ApoA-I', *Biochemistry*, 44(35), pp. 11843–11854. doi:10.1021/bi050862i.

Garelnabi, M., Litvinov, D. and Mahini, H. (2012) 'Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: Implication in arteriosclerosis diseases', *North American Journal of Medical Sciences*, 4(11), p. 523. doi:10.4103/1947-2714.103310.

Gill, V. et al. (2019) 'Advanced glycation end products (ages) may be a striking link between modern diet and health', *Biomolecules*, 9(12), p. 888. doi:10.3390/biom9120888.

Godfrey, L. et al. (2014) 'Arginine-directed glycation and decreased HDL plasma concentration and functionality', *Nutrition & Diabetes*, 4(9). doi:10.1038/nutd.2014.31.

Gugliucci, A. (2017) 'Formation of fructose-mediated advanced glycation end products and their roles in metabolic and inflammatory diseases', *Advances in Nutrition*, 8(1), pp. 54–62. doi:10.3945/an.116.013912.

Harel, M. et al. (2004) 'Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes', *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(5), pp. 412–419. doi:10.1038/nsmb767.

Hellmann, N. and Schneider, D. (2019) 'Hands on: Using tryptophan fluorescence spectroscopy to study protein structure', *Methods in Molecular Biology*, pp. 379–401. doi:10.1007/978-1-4939-9161-7_20.

Holme, S.A. et al. (2020) 'Effects of particulate matter on atherosclerosis: A link via high-density lipoprotein (HDL) functionality?', *Particle and Fibre Toxicology*, 17(1). doi:10.1186/s12989-020-00367-x.

Jakubowski, H. (2023) ‘Proteomic exploration of paraoxonase 1 function in health and disease’, *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), p. 7764. doi:10.3390/ijms24097764.

Kawasaki, T., Akanuma, H. and Yamanouchi, T. (2002) ‘Increased fructose concentrations in blood and urine in patients with diabetes’, *Diabetes Care*, 25(2), pp. 353–357. doi:10.2337/diacare.25.2.353.

Kelesidis, T. *et al.* (2011) ‘A biochemical fluorometric method for assessing the oxidative properties of HDL’, *Journal of Lipid Research*, 52(12), pp. 2341–2351. doi:10.1194/jlr.d018937.

Khalid, M., Petroianu, G. and Adem, A. (2022) ‘Advanced glycation end products and diabetes mellitus: Mechanisms and perspectives’, *Biomolecules*, 12(4), p. 542. doi:10.3390/biom12040542.

Kim, E. *et al.* (2008) ‘Expression of apolipoprotein C-IV is regulated by KU antigen/peroxisome proliferator-activated receptor γ complex and correlates with liver steatosis’, *Journal of Hepatology*, 49(5), pp. 787–798. doi:10.1016/j.jhep.2008.06.029.

Kontush, A. (2015) ‘HDL particle number and size as predictors of cardiovascular disease’, *Frontiers in Pharmacology*, 6. doi:10.3389/fphar.2015.00218.

Kosmopoulos, M. *et al.* (2019) ‘Impact of advanced glycation end products (ages) signaling in coronary artery disease’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1865(3), pp. 611–619. doi:10.1016/j.bbadis.2019.01.006.

Kudinov, V.A. *et al.* (2020) “High-density lipoproteins as homeostatic nanoparticles of blood plasma,” *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), p. 8737. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21228737>.

Levy, D., Reichert, C.O. and Bydlowski, S.P. (2019) ‘Paraoxonases activities and polymorphisms in elderly and old-age diseases: An overview’, *Antioxidants*, 8(5), p. 118. doi:10.3390/antiox8050118.

Li, L.-H. *et al.* (2019) ‘Analytical methods for cholesterol quantification’, *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(2), pp. 375–386. doi:10.1016/j.jfda.2018.09.001.

Luevano-Contreras, C. and Chapman-Novakofski, K. (2010) ‘Dietary advanced glycation end products and aging’, *Nutrients*, 2(12), pp. 1247–1265. doi:10.3390/nu2121247.

Marek, G. *et al.* (2018) ‘Decreases in paraoxonase-1 activities promote a pro-inflammatory effect of lipids peroxidation products in non-smoking and smoking patients with acute pancreatitis’, *International Journal of Medical Sciences*, 15(14), pp. 1619–1630. doi:10.7150/ijms.27647.

Matsunaga, T. *et al.* (2001) ‘Modulation of reactive oxygen species in endothelial cells by peroxynitrite-treated lipoproteins’, *Journal of Biochemistry*, 130(2), pp. 285–293. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a002984.

Mazzuferi, G. *et al.* (2021) “High density lipoproteins and oxidative stress in breast cancer,” *Lipids in Health and Disease*, 20(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s12944-021-01562-1>.

McPherson, J.D., Shilton, B.H. and Walton, D.J. (1988) ‘Role of fructose in glycation and cross-linking of proteins’, *Biochemistry*, 27(6), pp. 1901–1907. doi:10.1021/bi00406a016.

Mou, L. *et al.* (2022) ‘The potential role of albumin glycation by ribose in diabetes mellitus’, *Science China Life Sciences*, 65(12), pp. 2552–2555. doi:10.1007/s11427-022-2190-6.

Mulcahy, E.M. *et al.* (2017) ‘Characterisation of heat-induced protein aggregation in whey protein isolate and the influence of aggregation on the availability of amino groups as measured by the ortho-phthaldialdehyde (OPA) and Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) methods’, *Food Chemistry*, 229, pp. 66–74. doi:10.1016/j.foodchem.2017.01.155.

Muraoka, M.Y. *et al.* (2022) ‘Fructose and methylglyoxal-induced glycation alters structural and functional properties of salivary proteins, albumin and lysozyme’, *PLOS ONE*, 17(1). doi:10.1371/journal.pone.0262369.

Obaidul Islam, M. *et al.* (2022) ‘Effect of glycated HDL on oxidative stress and cholesterol homeostasis in a human bladder cancer cell line, J82’, *Experimental and Molecular Pathology*, 126, p. 104777. doi:10.1016/j.yexmp.2022.104777.

Obrosova, I.G. *et al.* (2005) ‘Aldose reductase inhibition counteracts oxidative-nitrosative stress and poly(adp-ribose) polymerase activation in tissue sites for diabetes complications’, *Diabetes*, 54(1), pp. 234–242. doi:10.2337/diabetes.54.1.234.

Ong, K.-L. *et al.* (2022) ‘HDL maturation and remodelling’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1867(4), p. 159119. doi:10.1016/j.bbalip.2022.159119.

Ong, K.-L. *et al.* (2022) “HDL maturation and remodelling,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1867(4), p. 159119. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2022.159119>.

Pan, B. *et al.* (2011) ‘High-density lipoprotein of patients with type 2 diabetes mellitus elevates the capability of promoting migration and invasion of breast cancer cells’, *International Journal of Cancer*, 131(1), pp. 70–82. doi:10.1002/ijc.26341.

Park, K.-H. *et al.* (2010) ‘Fructated apolipoprotein A-I showed severe structural modification and loss of beneficial functions in lipid-free and lipid-bound state with acceleration of atherosclerosis and senescence’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 392(3), pp. 295–300. doi:10.1016/j.bbrc.2009.12.179.

Parthasarathy, S., Barnett, J. and Fong, L.G. (1990) 'High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1044(2), pp. 275–283. doi:10.1016/0005-2760(90)90314-n.

Passarelli, M. *et al.* (2005) 'Advanced glycation end product precursors impair ABCA1-dependent cholesterol removal from cells', *Diabetes*, 54(7), pp. 2198–2205. doi:10.2337/diabetes.54.7.2198.

Perrone, A. *et al.* (2020) 'Advanced glycation end products (ages): Biochemistry, signaling, analytical methods, and epigenetic effects', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, pp. 1–18. doi:10.1155/2020/3818196.

Pownall, H.J. *et al.* (2021) "High-density lipoproteins, reverse cholesterol transport and atherogenesis," *Nature Reviews Cardiology*, 18(10), pp. 712–723. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00538-z>.

Qu, J. *et al.* (2019) 'Apolipoprotein A-IV: A multifunctional protein involved in protection against atherosclerosis and diabetes', *Cells*, 8(4), p. 319. doi:10.3390/cells8040319.

Qu, J. *et al.* (2019) 'Apolipoprotein A-IV: A multifunctional protein involved in protection against atherosclerosis and diabetes', *Cells*, 8(4), p. 319. doi:10.3390/cells8040319.

Rassart, E. *et al.* (2000) 'Apolipoprotein D', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482(1–2), pp. 185–198. doi:10.1016/s0167-4838(00)00162-x.

Sarmah, S. and Roy, A.S. (2022) 'A review on prevention of glycation of proteins: Potential therapeutic substances to mitigate the severity of diabetes complications', *International Journal of Biological Macromolecules*, 195, pp. 565–588. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.12.041.

Schalkwijk, C.G. and Stehouwer, C.D. (2020) ‘Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, in diabetes, its vascular complications, and other age-related diseases’, *Physiological Reviews*, 100(1), pp. 407–461. doi:10.1152/physrev.00001.2019.

Schalkwijk, C.G. and Stehouwer, C.D. (2020) ‘Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, in diabetes, its vascular complications, and other age-related diseases’, *Physiological Reviews*, 100(1), pp. 407–461. doi:10.1152/physrev.00001.2019.

Schleicher, E. and Friess, U. (2007) ‘Oxidative stress, age, and atherosclerosis’, *Kidney International*, 72. doi:10.1038/sj.ki.5002382.

Sergi, D. *et al.* (2020) ‘The role of dietary advanced glycation end products in metabolic dysfunction’, *Molecular Nutrition & Food Research*, 65(1), p. 1900934. doi:10.1002/mnfr.201900934.

Shimano, H. (2009) ‘ApoAII controversy still in rabbit?’, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(12), pp. 1984–1985. doi:10.1161/atvbaha.109.196683.

Shokri, Y. *et al.* (2020) ‘Importance of paraoxonase 1 (PON1) as an antioxidant and antiatherogenic enzyme in the cardiovascular complications of type 2 diabetes: Genotypic and phenotypic evaluation’, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 161, p. 108067. doi:10.1016/j.diabres.2020.108067.

Sorenson, R.C. *et al.* (1999) ‘Properties of the retained N-terminal hydrophobic leader sequence in human serum paraoxonase/arylesterase’, *Chemico-Biological Interactions*, 119–120, pp. 243–249. doi:10.1016/s0009-2797(99)00033-2.

Takagi, Y. *et al.* (1995) ‘Significance of fructose-induced protein oxidation and formation of advanced glycation end product’, *Journal of Diabetes and its Complications*, 9(2), pp. 87–91. doi:10.1016/1056-8727(94)00022-g.

Takeuchi, M. (2016) ‘Serum levels of toxic ages (Tage) may be a promising novel biomarker for the onset/progression of lifestyle-related diseases’, *Diagnostics*, 6(2), p. 23. doi:10.3390/diagnostics6020023.

Takeuchi, M., Takino, J. and Yamagishi, S. (2010) ‘Involvement of the toxic ages (Tage)-Rage system in the pathogenesis of diabetic vascular complications: A novel therapeutic strategy’, *Current Drug Targets*, 11(11), pp. 1468–1482. doi:10.2174/1389450111009011468.

Taler-Verčič, A., Goličnik, M. and Bavec, A. (2020) ‘The structure and function of paraoxonase-1 and its comparison to paraoxonase-2 and -3’, *Molecules*, 25(24), p. 5980. doi:10.3390/molecules25245980.

Taplin, C.E. and Barker, J.M. (2008) “Autoantibodies in type 1 diabetes,” *Autoimmunity*, 41(1), pp. 11–18. Available at: <https://doi.org/10.1080/08916930701619169>.

Thornalley, P.J. (2005) ‘Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043(1), pp. 111–117. doi:10.1196/annals.1333.014.

Twarda-Clapa, A. *et al.* (2022) ‘Advanced glycation end-products (ages): Formation, chemistry, classification, receptors, and diseases related to ages’, *Cells*, 11(8), p. 1312. doi:10.3390/cells11081312.

Utermann, G. (1975) ‘Isolation and partial characterization of an arginine-rich apolipoprotein from human plasma very-low-density lipoproteins: Apolipoprotein E’, *Hoppe-Seyler’s Zeitschrift für physiologische Chemie*, 356(2), pp. 1113–1122. doi:10.1515/bchm2.1975.356.2.1113.

Viikari, J. (1976) ‘Precipitation of plasma lipoproteins by PEG-6000 and its evaluation with electrophoresis and Ultracentrifugation’, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 36(3), pp. 265–268. doi:10.3109/00365517609055259.

Viikari, J. (1976) 'Precipitation of plasma lipoproteins by PEG-6000 and its evaluation with electrophoresis and Ultracentrifugation', *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 36(3), pp. 265–268. doi:10.3109/00365517609055259.

Wang, C. et al. (2017) 'Levels and formation of α -dicarbonyl compounds in beverages and the preventive effects of flavonoids', *Journal of Food Science and Technology*, 54(7), pp. 2030–2040. doi:10.1007/s13197-017-2639-z.

Wautier, J.-L. and Schmidt, A.M. (2004) "Protein glycation," *Circulation Research*, 95(3), pp. 233–238. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.res.0000137876.28454.64>.

Wei, Y. et al. (2009) 'Rapid glycation with D-ribose induces globular amyloid-like aggregations of BSA with high cytotoxicity to SH-SY5Y cells', *BMC Cell Biology*, 10(1). doi:10.1186/1471-2121-10-10.

Wei, Y. et al. (2012) 'D-ribose in glycation and protein aggregation', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(4), pp. 488–494. doi:10.1016/j.bbagen.2012.01.005.

Yeboah, F.K., Alli, I. and Yaylayan, V.A. (1999) 'Reactivities of d-glucose and d-fructose during Glycation of Bovine Serum Albumin', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(8), pp. 3164–3172. doi:10.1021/jf981289v.

Yilmaz, N. (2012) 'State of the art paper relationship between paraoxonase and homocysteine: Crossroads of oxidative diseases', *Archives of Medical Science*, 1, pp. 138–153. doi:10.5114/aoms.2012.27294.

Yue, Q. et al. (2022) 'Receptor for advanced glycation end products (RAGE): A pivotal hub in immune diseases', *Molecules*, 27(15), p. 4922. doi:10.3390/molecules27154922.

Yuen, A. *et al.* (2010) 'METHYLGLYOXAL-modified collagen promotes myofibroblast differentiation', *Matrix Biology*, 29(6), pp. 537–548. doi:10.1016/j.matbio.2010.04.004.

Zaman, A. *et al.* (2018) 'Fructose-human serum albumin interaction undergoes numerous biophysical and biochemical changes before forming ages and aggregates', *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, pp. 896–906. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.11.069.

Zannis, V.I., Chroni, A. and Krieger, M. (2006) 'Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL', *Journal of Molecular Medicine*, 84(4), pp. 276–294. doi:10.1007/s00109-005-0030-4.

Zheng, L. *et al.* (2004) 'Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease', *Journal of Clinical Investigation*, 114(4), pp. 529–541. doi:10.1172/jci200421109.

Zheng, L. *et al.* (2005) 'Localization of nitration and chlorination sites on Apolipoprotein A-I catalyzed by myeloperoxidase in human atheroma and associated oxidative impairment in ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages', *Journal of Biological Chemistry*, 280(1), pp. 38–47. doi:10.1074/jbc.m407019200.

