



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MESSINA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE, BIOLOGICHE,
FARMACEUTICHE ED AMBIENTALI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA APPLICATA E MEDICINA
SPERIMENTALE - XXXV CICLO
SSD BIO/14

Effetti benefici *in vitro* di un estratto standardizzato da foglie di *Cynara cardunculus* L. sulla funzionalità della barriera e sull'infiammazione acuta in cellule epiteliali intestinali Caco-2

Tesi di Dottorato:

Dott.ssa Claudia Muscarà

Tutor:

Chiar.mo Prof. Antonio Speciale

Coordinatore del corso di Dottorato:

Chiar.ma Prof.ssa Nunziacarla Spanò

Indice

<i>Abstract</i>	pag.1
<i>PARTE COMPILATIVA</i>	pag.3
1. <i>Cynara cardunculus L.: composizione e attività biologiche</i>	pag.4
1.1 <i>Introduzione</i>	pag.5
1.2 <i>Molecole bioattive contenute in Cynara cardunculus L. subsp. scolymus</i>	pag.6
1.2.1 <i>Polifenoli</i>	pag.6
1.2.1a <i>Derivati dell'acido idrossicinnamico</i>	pag.6
1.2.1b <i>Flavonoidi</i>	pag.8
1.2.1c <i>Antocianine</i>	pag.9
1.2.2 <i>Fibre alimentari</i>	pag.10
1.2.3 <i>Terpenoidi</i>	pag.10
1.2.3a <i>Lattoni sesquiterpenici</i>	pag.10
1.2.3b <i>Triterpenoidi</i>	pag.12
1.3 <i>Composizione degli estratti di foglie di Cynara scolymus L.</i>	pag.12
1.4 <i>Gli estratti di foglie di Cynara scolymus L. e i loro benefici per la salute</i>	pag.13
1.4.1 <i>Effetti ipoglicemizzanti</i>	pag.13
1.4.2 <i>Effetti ipocolesterolemizzanti</i>	pag.14
1.4.3 <i>Effetti epatoprotettivi</i>	pag.15
1.4.4 <i>Effetti antiossidanti</i>	pag.16
1.4.5 <i>Attività antiinfiammatoria</i>	pag.16
1.4.6 <i>Effetti antitumorali</i>	pag.17
1.4.7 <i>Attività antimicrobica</i>	pag.18
1.4.8 <i>Effetti sul tratto gastrointestinale</i>	pag.18
1.4.9 <i>Effetto anti-obesità</i>	pag.19

1.5	Bioaccessibilità e biodisponibilità di <i>Cynara scolymus</i> L. in modelli <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	pag.20
1.6	Tollerabilità e controindicazioni	pag.21
2.	L'epitelio intestinale, il ruolo delle giunzioni strette e le malattie infiammatorie intestinali	pag.23
2.1	Introduzione	pag.24
2.2	Composizione della barriera intestinale	pag.25
2.3	Le cellule epiteliali intestinali e il ruolo delle giunzioni strette	pag.27
2.4	Meccanismi molecolari coinvolti nell'alterazione delle TJ	pag.31
2.5	Alterazioni della barriera intestinale	pag.33
2.6	Il ruolo delle TJ nelle malattie infiammatorie intestinali	pag.36
2.7	Il ruolo dei pathway NF-κB e Nrf2 nelle IBD	pag.38
	<i>PARTE SPERIMENTALE</i>	pag.43
3.1	Introduzione	pag.44
3.2	Materiali	pag.47
3.3	Colture cellulari e trattamenti	pag.48
3.3.1	<i>Modello per la valutazione della funzionalità e dell'integrità della barriera epiteliale intestinale durante il differenziamento</i>	pag.49
3.3.2	<i>Modello di infiammazione intestinale acuta</i>	pag.51
3.4	Metodi	pag.52
3.4.1	<i>Determinazione della TEER</i>	pag.52
3.4.2	<i>Saggio di permeabilità paracellulare</i>	pag.52
3.4.3	<i>Saggio della fosfatasi alcalina in situ</i>	pag.53
3.4.4	<i>Saggio del Calcium Switch</i>	pag.54
3.4.5	<i>Estrazione dei lisati cellulari</i>	pag.55

<i>3.4.5a Estrazione del lisato cellulare totale</i>	pag.55
<i>3.4.5b Estrazione dei lisati nucleari e citoplasmatici</i>	pag.55
3.4.6 Determinazione del contenuto proteico	pag.56
3.4.7 Immunoblotting	pag.56
3.4.8 Valutazione dell'espressione genica	pag.58
<i>3.4.8a Estrazione dell'RNA</i>	pag.58
<i>3.4.8b Quantificazione dell'RNA</i>	pag.58
<i>3.4.8c Sintesi del cDNA</i>	pag.59
<i>3.4.8d Real-time PCR</i>	pag.59
<i>3.4.8e Elaborazione post-analisi</i>	pag.62
3.4.9 Valutazione dell'attività antiossidante totale intracellulare (TAA)	pag.63
3.4.10 Determinazione dei livelli intracellulari di glutatione	pag.64
3.4.11 Valutazione dei livelli cellulari di ROS	pag.65
3.4.12 Analisi statistica	pag.65
4 Risultati	pag.66
4.1 Effetti di CCLE sulla funzionalità e differenziazione del monostrato epiteliale intestinale durante il processo di differenziamento	pag.66
<i>4.1.1 Il trattamento con CCLE migliora la funzionalità della barriera epiteliale intestinale</i>	pag.66
<i>4.1.2 CCLE stimola il differenziamento delle cellule epiteliali intestinali e l'assemblaggio delle TJ</i>	pag.68
<i>4.1.3 CCLE promuove l'attivazione del pathway AMPK/SIRT1</i>	pag.72
4.2 Effetti di CCLE contro l'infiammazione intestinale indotta da TNF-α	pag.77
<i>4.2.1 Effetto protettivo di CCLE sull'attivazione del pathway NF-κB indotta da TNF-α</i>	pag.77

4.2.2	<i>CCLE inibisce l'espressione di COX-2 indotta da TNF-α</i>	pag.80
4.2.3	<i>Effetto protettivo di CCLE sull'alterazione dello stato redox intracellulare indotto da TNF-α</i>	pag.81
4.2.4	<i>CCLE esercita il suo effetto protettivo attivando il pathway di Nrf2</i>	pag.83
5.	Discussione e conclusioni	pag.86
	BIBLIOGRAFIA	pag.90

Abstract

Intestinal epithelial cells act as a barrier by protecting the body against harmful substances from the external environment thanks to the presence of tight junctions (TJ), which connect cells to each other, regulate paracellular permeability, and are responsible for maintaining cell polarity. Variations in the organization of the TJ lead to alterations in the epithelial barrier function with a consequent increase in intestinal permeability. This condition, also known as "leaky gut syndrome", has been observed in some gastrointestinal diseases such as inflammatory bowel disease (IBD), which is characterized by chronic immune-mediated inflammation and impaired gastrointestinal function. Numerous studies support the beneficial effects of polyphenols on intestinal health thanks to their ability to improve the functionality of the intestinal barrier, preserve the integrity of the TJs, and reduce the release of cytokines involved in inflammatory processes.

Therefore, the aim of the present work was to investigate *in vitro* the molecular mechanisms involved in the beneficial effects of a standardized and commercially available extract, rich in polyphenols, obtained from the leaves of *Cynara cardunculus* L. subsp. *scolymus* (CCLE), on the function and integrity of the intestinal barrier, as well as its protective effects in a model of acute intestinal inflammation induced by TNF- α on intestinal epithelial Caco-2 cells.

Treatment with CCLE during the differentiation process improved the functionality and integrity of the intestinal epithelial barrier by increasing TEER values and reducing fluorescein permeability, stimulated epithelial differentiation and TJ expression by increasing alkaline phosphatase activity and inducing protein levels of occludin, claudin-1 and ZO-1, and induced a more rapid TJ assembly in the Ca²⁺ switch assay. The effects induced by CCLE on the modulation of TJ expression were attributed to the ability of the extract to activate the AMPK/SIRT1 pathway and this mechanism was confirmed by treatment with an irreversible AMPK inhibitor, Compound C.

Furthermore, in the TNF- α -induced acute intestinal inflammation model, CCLE inhibited the TNF- α -induced NF- κ B pathway activation and the overexpression of IL-8 and COX-2. CCLE reduced

TNF- α -induced oxidative stress and improved intracellular redox power even in the absence of TNF- α , and this effect was associated with the ability of CCLE to stimulate an adaptive cellular response by Nrf2 pathway activation.

In conclusion, these data highlight the ability of CCLE to improve intestinal barrier function and counteract acute intestinal inflammation, and support the possible use of *Cynara cardunculus* L. subsp. *scolymus*, considered a waste product, for obtaining extracts rich in bioactive polyphenols potentially useful for intestinal function and for the prevention and/or treatment of inflammatory bowel diseases.

Keywords: *Cynara cardunculus* L., intestinal epithelial barrier function, AMPK/SIRT1 pathway, inflammatory bowel diseases, NF- κ B and Nrf2 pathways.

Parte compilativa

1. *Cynara cardunculus* L.:
composizione e attività biologiche

1.1 Introduzione

Il genere *Cynara*, originario dell'area mediterranea, comprende otto specie e quattro sottospecie (Acquadro et al., 2017; Curci et al., 2015), e appartiene alla seconda famiglia più grande del regno vegetale contenente più di 2000 specie, la famiglia delle Asteraceae, anche nota come famiglia dei cardi. Tassonomicamente, *Cynara cardunculus* L. presenta tre varietà botaniche: il carciofo (*Cynara cardunculus* L. subsp. *scolymus*) (de Falco et al., 2015), il cardo (*Cynara cardunculus* subsp. *altilis* DC) e il loro antenato cardo selvatico (*Cynara cardunculus* L. subsp. *sylvestris*) (Iema e Mauromicale, 2010; Gatto et al., 2013; Pandino et al., 2010). La prima descrizione del *Cynara* risale al IV secolo a.C.; lo scrittore greco Teofrasto fu il primo a descrivere queste piante, popolari tra i Greci e i Romani come alimento e medicamento (Sonnante et al., 2007; Lattanzio et al., 2009). *Cynara cardunculus* L. subsp. *scolymus*, anche nota come *Cynara scolymus* L., è una pianta perenne con foglie a rosetta, ampiamente coltivata per la sua grande testa carnosa (fiori immaturi) che rappresenta il 30-40% del peso fresco (FW). Le parti edibili del carciofo costituiscono quasi il 35-55% del FW della testa, e ne fanno parte le foglie tenere (brattee interne) e il ricettacolo, comunemente conosciuto come "cuore" (Ceccarelli et al., 2007). Inoltre, foglie, brattee esterne e steli, rappresentano i sottoprodotti dell'industria alimentare. Essi costituiscono circa l'80% della biomassa e possono essere utilizzati per l'estrazione di additivi alimentari e nutraceutici (Lattanzio et al., 2009; Ceccarelli et al., 2007). *Cynara scolymus* L. è una pianta nativa del Mediterraneo (Nord Africa ed Europa meridionale), ma è coltivata in tutto il mondo per le sue proprietà nutrizionali e medicinali (Lattanzio et al., 2009). Il carciofo ha svolto, e continua a svolgere, un ruolo importante nell'alimentazione umana, soprattutto nell'area mediterranea, e ha inoltre contribuito significativamente all'economia agricola mediterranea, difatti l'Italia è stata classificata come il principale produttore mondiale (Lattanzio et al., 2009).

Sin dai tempi antichi è stata citata per il suo utilizzo come farmaco nella medicina tradizionale in tutto il mondo. Il suo utilizzo è stato correlato agli effetti benefici nelle malattie del tratto biliare,

all'azione digestiva, al suo contributo positivo nel trattamento dello scorbuto e dell'anemia e alla sua azione antiaterosclerotica (Gebhardt e Fausel, 1997; Kraft, 1997). Oltre al suo uso come alimento salutare, *Cynara scolymus* L. è anche molto utilizzata come droga erboristica. Difatti, gli estratti ottenuti dalle foglie di carciofo, grazie alla presenza di composti polifenolici contenuti principalmente nelle foglie piuttosto che nelle teste di carciofo e che rappresentano i principi attivi di questa pianta, sono ampiamente utilizzati, da soli o in associazione con altre erbe, per preparare tisane o medicinali a base di erbe (Bonomi, 2001).

1.2 Molecole bioattive contenute in *Cynara cardunculus* L. subsp. *scolymus*

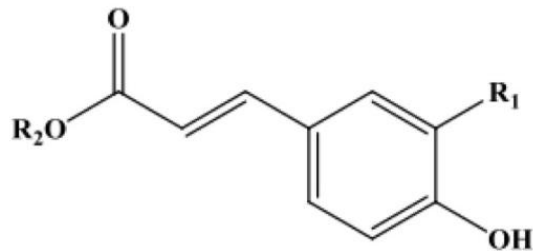
Le molecole bioattive identificate in *Cynara cardunculus* L. subsp. *scolymus* sono suddivise in metaboliti primari, come inulina, minerali e vitamine, e metaboliti secondari, come polifenoli, lattoni sesquiterpenici e terpenoidi. All'interno della stessa varietà, il contenuto di questi metaboliti può essere influenzato da diversi fattori, tra cui le pratiche agricole, l'origine geografica e la maturazione (Pandino et al., 2017a; Pandino et al., 2015). Difatti, è stato osservato che, in *Cynara scolymus* L. il contenuto di composti fenolici antiossidanti è 16 volte più elevato nella stagione primaverile rispetto a quella invernale (Lombardo et al., 2010), e che è maggiore nelle teste del carciofo maturo rispetto a quelle giovani (Wang M. et al., 2003).

1.2.1 Polifenoli

1.2.1a Derivati dell'acido idrossicinnamico

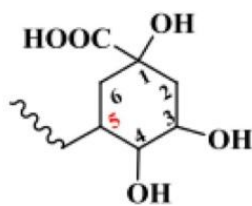
Tra i metaboliti secondari, i derivati dell'acido idrossicinnamico, come l'acido cinnamico, l'acido *p*-cumarico, l'acido caffeico, l'acido ferulico, l'acido clorogenico e l'acido rosmarinico, rappresentano la componente più abbondante. Essi sono dotati di proprietà antiossidanti, antiinfiammatorie, epatoprotettive, antibatteriche e anti-obesità, e derivano dalle vie biosintetiche di mevalonato e shikimato (Alam et al., 2016; Claus et al., 2015; Gouveia e Castilho, 2012; Roupheal

et al., 2017; Schütz et al., 2006a; Falleh et al., 2008). Dal punto di vista chimico, essi sono principalmente acidi monocaffeoilchinici, come l'acido 5-*O*-caffeoilchinico (anche noto come acido clorogenico), isomeri posizionali dell'acido dicaffeoilchinico come l'acido 1,3-*O*-dicaffeoilchinico (noto come cinarina), acidi 3,5- e 4,5-*O*-dicaffeoilchinici, e acidi fenolici liberi, come l'acido caffeico e l'acido ferulico (Lattanzio et al., 2009) (Figura 1).

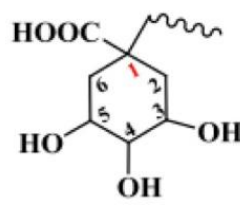


Derivati dell'acido idrossicinnamico

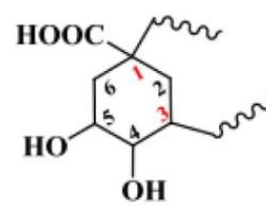
	R₁	R₂
Acido caffeico	OH	H
Acido ferulico	OCH ₃	H
Acido clorogenico	OH	R ₃
Acido 1- <i>O</i> -caffeoilchinico	OH	R ₄
Acido 1,3- <i>O</i> -dicaffeoilchinico	OH	R ₅



R₃



R₄



R₅

Figura 1: Strutture chimiche dei derivati dell'acido idrossicinnamico presenti in *Cynara scolymus* L.

1.2.1b Flavonoidi

I flavonoidi generalmente sono suddivisi in flavonoli, flavoni, flavanoli e flavanoni. Tra questi, i composti principalmente identificati in *Cynara scolymus* L. sono i flavoni in forma glicosilata e non, i quali sono i maggiori responsabili delle proprietà antiossidanti, antiinfiammatorie e ipolipemizzanti del carciofo (Sahebkar et al., 2018; Ben Salem et al., 2017a; Wang M. et al., 2003). Apigenina, luteolina, luteolina-7-rutinoside, cinaroside (luteolina-7-O-glucoside), apigenina-7-O-rutinoside e apigenina-7-O-β-D-glucopiranoside, sono i principali flavoni individuati in *Cynara scolymus* L. (Zhu et al., 2004) (Figura 2). Alcuni studi hanno riportato che la luteolina e il cinaroside sono i responsabili dell'azione antitrombotica e antiaterosclerotica di *Cynara scolymus* L. poiché regolando il promotore della ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS, *endothelial nitric oxide synthase*) e l'espressione genica di eNOS, aumentano la produzione di ossido nitrico (NO) (Li et al., 2004).

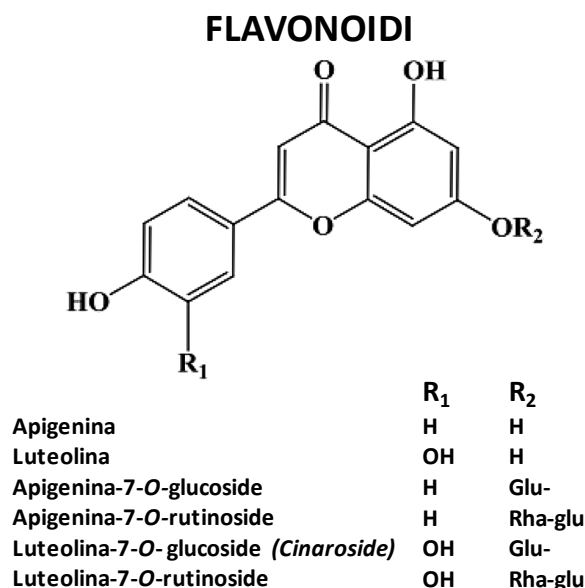


Figura 2: Strutture chimiche dei principali flavonoidi presenti in *Cynara scolymus* L.

1.2.1c Antocianine

Le antocianine sono pigmenti vegetali ampiamente distribuiti in natura e conferiscono colorazione dal rosso al blu a fiori, frutta e verdura (Putta et al., 2018). Chimicamente derivano da diverse sostituzioni idrossi o metossi nel loro nucleo flavilico di base (2-fenilbenzopirilio) (Figura 3). Dal momento che le antocianine contenute in *Cynara* sono molecole non acilate, presentano una forte attività antiossidante. Difatti, secondo gli studi di relazione struttura-attività (SAR), l'acilazione, in particolar modo l'acilazione con derivati dell'acido cinnamico, riduce significativamente l'attività antiossidante e antiinfiammatoria delle antocianine (Blando et al., 2018). Studi di caratterizzazione hanno riportato la presenza di cianidina, peonidina, delphinidina e dei loro glicosidi in *Cynara scolymus* L. (Schütz et al., 2006b). I flavonoidi e le antocianine contenute nel carciofo svolgono un'azione sinergica vasoprotettiva. Difatti, mentre i flavonoidi contenuti nel carciofo attivano specificatamente l'espressione di eNOS, le antocianine sottoregolano l'espressione della forma inducibile e dannosa (iNOS, *inducible nitric oxide synthase*) a livello vascolare (Li et al., 2004; Xia et al., 2014). Questi effetti opposti sulle isoforme della NOS da parte di *Cynara scolymus* L. potrebbero favorire il suo uso come agente cardioprotettivo e lo sviluppo di alimenti funzionali per il trattamento di disturbi cardiovascolari.

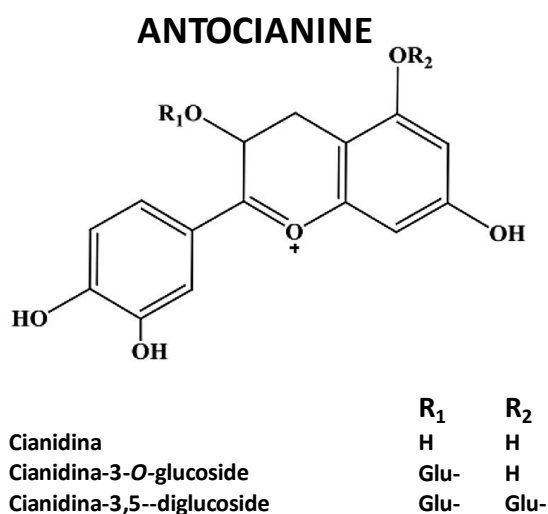


Figura 3: Strutture chimiche delle principali antocianine presenti in *Cynara scolymus* L.

1.2.2 Fibre alimentari

Vengono definite fibre alimentari tutti i polisaccaridi solubili non digeribili presenti in natura. Pectina e inulina, molecole ad elevato peso molecolare, sono le fibre alimentari identificate in *Cynara scolymus* L. La pectina contenuta nel carciofo comprende polimeri di acido galatturonico e arabinosio con differenti livelli di metilazione (Santo Domingo et al., 2015; Sabater et al., 2018; Sabater et al., 2019). L'inulina è un polimero a lunga catena lineare composto da monomeri di fruttosio legati con legami β -2,1-glucosidici o da fruttani (una catena composta da unità di fruttosio legate con legami β -2,1-glucosidici che termina con un'unità di saccarosio). Fissore e colleghi (2015) hanno dimostrato che le fibre ottenute da *Cynara scolymus* L. possiedono un effetto prebiotico grazie all'elevato contenuto di inulina e al basso grado di metilazione della pectina. Inoltre, tali sostanze sono in grado di migliorare la bioaccessibilità dei polifenoli sia nella porzione superiore che in quella inferiore del tratto digestivo (Jakobek e Matić, 2019). Infatti, legandosi ai polifenoli mediante interazioni non-covalenti (legami idrogeno, forze di van der Waals e interazioni idrofobiche), una maggiore quantità di polifenoli sarà in grado di raggiungere la porzione inferiore del tratto digerente, determinando numerosi effetti benefici come l'aumento della produzione di acidi grassi a catena corta, l'attività antiradicalica, l'inibizione dell'ossidazione lipidica e il miglioramento del microbiota intestinale.

1.2.3 Terpenoidi

1.2.3a Lattoni sesquiterpenici

I lattoni sesquiterpenici, noti marker chemiotassonomici del genere *Cynara*, sono i principali metaboliti secondari presenti nelle foglie di *Cynara scolymus* L. e comprendono cinaropicrina, aguerina B, grosceimina e le forme glicosilate cinarascolosidi A, B e C (Shimoda et al., 2003) (Figura 4). È stato osservato che il contenuto di cinaropicrina è maggiore nelle foglie più mature rispetto alle altre parti della pianta, e questo potrebbe essere attribuito all'incremento nei tricomi

fogliari dell'espressione genica di geni codificanti per l'enzima germacrene A sintetasi, coinvolto nella conversione del farnesil difosfato (FPP) in (+)-germacrene, e due isoforme del citocromo P450, ovvero germacrene A ossidasi (CcGAO) e costunolide sintasi (CcCOS) (Eljounaidi et al., 2015; Menin et al., 2012). Questi risultati suggeriscono che le foglie rappresentano una ricca fonte di lattoni sesquiterpenici benefici per la salute (Ramos et al., 2019), pertanto negli ultimi anni le ricerche si sono focalizzate sull'ottimizzazione dei processi di estrazione per l'ottenimento della cinaropicrina, in particolare dalle foglie di *Cynara cardunculus* L. (de Faria et al., 2018). La cinaropicrina e la grosceimina possiedono proprietà anti-epatite C inibendo l'ingresso del virus HCV nelle cellule bersaglio, e sono attivi sia contro l'infezione cell-free che nella trasmissione cellula-cellula (Elsebai et al., 2016). Inoltre, entrambe queste sostanze hanno dimostrato una potente azione antiossidante e antiinfiammatoria grazie all'attivazione del pathway AhR-Nrf2-Nqo1 e alla inibizione della generazione di ROS in cheratinociti umani non stimolati, e in particolare la cinaropicrina è stata capace di inibire la produzione di citochine infiammatorie, come IL-6 e TNF- α , in cheratinociti irradiati con UVB (Takei et al., 2015).

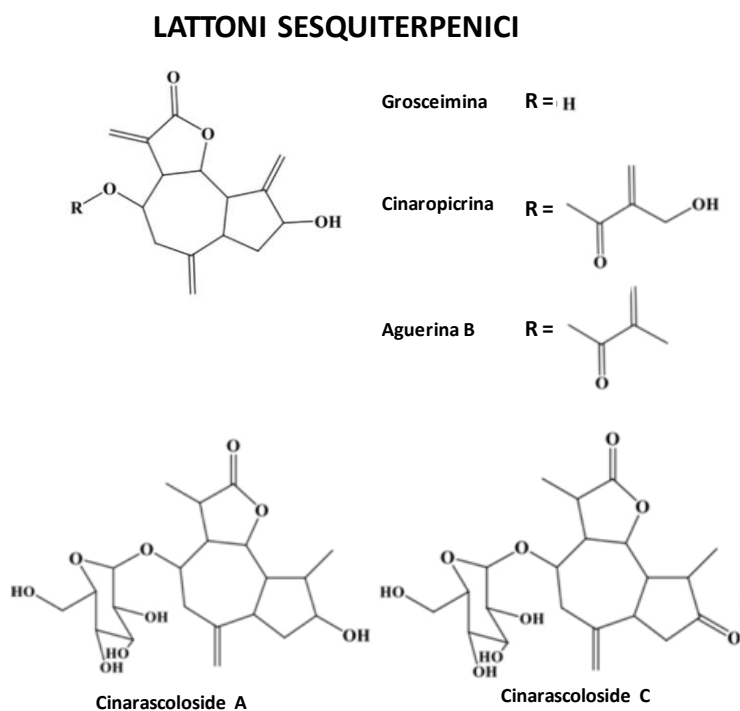


Figura 4: Strutture chimiche dei lattoni sesquiterpenici presenti in *Cynara scolymus* L.

1.2.3b Triterpenoidi

I triterpenoidi presenti in *Cynara scolymus* L. sono principalmente saponine e fanno parte dei metaboliti secondari responsabili di preziose attività benefiche (Jacociunas et al., 2014). Dal punto di vista chimico, i triterpenoidi sono coniugati glicosidici mono- o bi-desmosidici dell'oleanano, anche note come cinarasaponine, e comprendono cinarasaponina A, B, C, E, H e K, le quali sono state identificate nelle foglie e nelle brattee (El Senousy et al., 2014, Mucaji et al., 2001, Shimizu et al., 1988).

1.3 Composizione degli estratti di foglie di *Cynara scolymus* L.

Gli estratti ottenuti dalle foglie di carciofo possiedono un basso contenuto di grassi ed elevati livelli di minerali come potassio, sodio e fosforo, oltre a vitamina C, fibre, antocianine, flavoni, inulina e acidi idrossicinnamici, i quali sono derivati dell'acido caffeoilchinico (Pandino et al., 2011a; Ceccarelli et al., 2010). Difatti, le foglie di carciofo sono ricche in composti polifenolici, inulina, fibre e minerali (Lattanzio et al., 2009).

Il contenuto di polifenoli estratti varia notevolmente in base al metodo di estrazione (Llorach et al., 2002) e i principali composti fenolici che vengono estratti sono i derivati dell'acido caffeico, i quali comprendono i derivati dell'acido caffeoilchinico. Considerando il contenuto totale dei derivati dell'acido caffeoilchinico, l'acido clorogenico è la sostanza più abbondante (39%), seguito dall'acido 1,5-*O*-dicaffeoilchinico (21%) e dall'acido 3,4-*O*-dicaffeoilchinico (11%) (Lattanzio et al., 2009; Merck, 2006), mentre il contenuto di cinarina negli estratti metanolici di carciofo è molto basso (circa 1,5%). Difatti, sebbene le foglie secche e gli steli del carciofo contengano anche questo composto, la maggior parte del contenuto di cinarina è localizzato nella polpa delle foglie (Lattanzio et al., 2009). Inoltre, altri composti fenolici come i flavoni apigenina e luteolina sono stati identificati nelle foglie e nelle teste di *Cynara scolymus* L. in forma di glucosidi e rutinosidi (Lattanzio et al., 2009).

1.4 Gli estratti di foglie di *Cynara scolymus* L. e i loro benefici per la salute

In diversi studi farmacologici, gli estratti di foglie di *Cynara scolymus* L. hanno mostrato effetti ipoglicemizzanti, antiossidanti, anti-HIV, epatoprotettivi, antimicrobici, ipolipidemizzanti e stimolanti la secrezione della bile (Kraft, 1997; Wang M. et al., 2003; Liorach et al., 2002; McDougall et al., 1998).

1.4.1 Effetti ipoglicemizzanti

Il diabete mellito (DM) è una malattia cronica caratterizzata da disordini del metabolismo dei carboidrati, dei lipidi e di diversi oligoelementi essenziali (Kazi et al., 2008). Diete ipolipemizzanti e farmaci sono di uso comune per il trattamento dell'iperlipidemia nel diabete (Moon e Kashyap, 2004).

Studi *in vivo* hanno dimostrato l'effetto ipoglicemizzante di un estratto ottenuto dalle foglie di carciofo (Ben Salem et al., 2015). Un estratto acquoso somministrato a ratti con diabete indotto con streptozotocina (200-400 mg/kg/die) è stato in grado di ridurre i livelli di glucosio (Esfandiar e Yadollah, 2011), e lo stesso effetto è stato osservato con la somministrazione di un estratto idroalcolico (300 mg/kg/die) in ratti con diabete indotto con allossano (Ahmadi et al., 2008). La somministrazione di un estratto etanologico (75% v/v) da foglie di carciofo, in ratti Wistar con diabete indotto da allossano, ha dimostrato proprietà anti-iperglicemizzanti, ipolipemiche e antiossidanti. Dopo un mese di trattamento con l'estratto (200-400 mg/kg) è stata osservata una significativa riduzione dei livelli sierici di α -amilasi, dei livelli glicemici, e del contenuto di colesterolo totale plasmatico, oltre ad un incremento dell'attività di catalasi (CAT), superossido dismutasi (SOD) e glutatione (GSH) nel fegato, nei reni e nel pancreas dei ratti diabetici (Ben Salem et al., 2017b). Inoltre, uno studio condotto su pazienti diabetici ha dimostrato che un estratto acquoso (6 g/kg/die) ha migliorato i livelli di glucosio plasmatici, riducendo i livelli a digiuno da $163,4 \pm 4,39$ a $138,8 \pm$

3,9 mg/dl ($P < 0,01$) e i livelli postprandiali da $262,22 \pm 3,82$ a $241,75 \pm 3,46$ mg/dl ($P < 0,01$) (Mohammad et al., 2013).

1.4.2 Effetti ipocolesterolemizzanti

Gli estratti ottenuti da foglie di carciofo hanno mostrato la capacità di ridurre i livelli di colesterolo che sono associati all'incremento del rischio di malattie coronariche e aterosclerosi. I primi studi sull'ipotetico effetto ipocolesterolemizzante di questi estratti risalgono agli anni '70, quando gli scienziati iniziarono a esaminare la cinarina e il colesterolo (Heckers et al., 1977). In accordo con studi successivi, la luteolina, presente nell'estratto di foglie di carciofo, svolge un ruolo fondamentale nell'inibizione della sintesi del colesterolo (Gebhardt, 1996). Inoltre, gli estratti di foglie di carciofo hanno mostrato effetti sul metabolismo del colesterolo e sull'ossidazione delle LDL, inibendo la biosintesi *de novo* del colesterolo a livello epatico agendo sull'HMG-CoA reduttasi, enzima chiave nella biosintesi del colesterolo, e riducendo l'assorbimento del colesterolo a livello intestinale migliorando la sua escrezione mediante inibizione dell'acetil-coenzima A acetiltrasferasi (ACAT) (Marsico et al., 1999; Cicero et al., 2017; Kraft, 1997). Pertanto, gli estratti di foglie di *Cynara scolymus* L. presentano un'azione ipocolesterolemizzante agendo sulla sintesi lipidica con differenti meccanismi. In letteratura sono stati riportati numerosi risultati ottenuti da esperimenti *in vivo* su animali dimostranti gli effetti ipolipidemizzanti degli estratti di foglie di *Cynara scolymus* L., e questi effetti sono stati confermati da diversi studi clinici (Ben Salem et al., 2015; Wider et al., 2009; Rondanelli et al., 2013). Questi studi hanno dimostrato che sia gli acidi caffeoilchinici che i glucosidi della luteolina sono i principali responsabili delle azioni antiaterogene (Wang M. et al., 2003; Liorach et al., 2002; Gebhardt, 1997; Esfandiar e Yadollah, 2011). È stato ipotizzato che la luteolina fosse uno dei componenti contenuti negli estratti di *Cynara scolymus* L. inibente la sintesi *de novo* del colesterolo (Gebhardt, 2002). Infine, è stato dimostrato che l'estratto di carciofo era in grado di ridurre i livelli plasmatici di LDL, il colesterolo totale e i trigliceridi

senza alcun incremento nei livelli di HDL e che questa azione sia probabilmente attribuibile alla luteolina e all'acido clorogenico (Santos et al., 2018).

1.4.3 Effetti epatoprotettivi

Il fegato è la principale ghiandola vulnerabile agli effetti tossici indotti da xenobiotici, poiché responsabile del loro metabolismo. La funzionalità di questa ghiandola è correlata allo stile di vita: consumo di alcol, dieta iperlipidica, sostanze pro-ossidanti. I medicinali a base di erbe possiedono proprietà protettive nei confronti del danneggiamento degli organi parenchimali. L'assunzione concomitante di estratti vegetali contenenti composti citoprotettivi può incrementare l'efficacia nel trattamento e nella riduzione degli effetti collaterali. Una delle piante con azione epatoprotettiva è il carciofo (Kulza et al., 2010). Molti studi hanno dimostrato l'azione epatoprotettiva degli estratti di foglie di carciofo, che è stata correlata ai suoi composti attivi e questi dati hanno supportato l'uso del carciofo come epatoprotettivo e agente antiossidante. Difatti, gli estratti di foglie di carciofo hanno cooperato per la rimozione di tossine dannose e migliorato la digestione dei grassi mediante stimolazione della produzione di bile, hanno inibito il processo di perossidazione lipidica nelle membrane cellulari del tessuto epatico, e protetto le cellule epatiche esposte a t-BHP (terz-butildidroperossido) dal danno ossidativo (Kulza et al., 2010; Gebhardt, 1997; Kameswara et al., 2003; Fintelman et al., 1996). La somministrazione di un estratto etanologico da foglie di carciofo (75% v/v) (200-400 mg/kg) ha determinato un effetto epatoprotettivo in ratti obesi alimentati con una dieta ricca di grassi. Dopo otto settimane di trattamento, è stata evidenziata una riduzione significativa dei lipidi sierici e dei disturbi epatici indotti da una dieta ad alto contenuto di grassi, che sono stati confermati a livello istologico dalla riduzione dei depositi di grasso nel lobulo epatico (Ben Salem et al., 2019). L'azione epatoprotettiva può essere attribuita al suo effetto antiossidante e all'inibizione del pathway infiammatorio TLR4/NF-κB esercitato principalmente dai derivati

dell'acido caffeico, dall'acido clorogenico e dalla cinarina (Tang et al., 2017) conducendo infine alla rigenerazione delle cellule epatiche disfunzionali (Ben Salem et al., 2015).

1.4.4 Effetti antiossidanti

Gli effetti antiossidanti degli estratti di foglie di *Cynara scolymus* L. sono stati ben documentati e attribuiti principalmente ai polifenoli. Numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato che il potenziale antiossidante è dovuto agli effetti radical scavenging e chelante degli ioni metallici dei componenti come cinarina, acido clorogenico e flavonoidi (Ben Salem et al., 2017a). L'azione antiossidante è stata confermata *in vitro* mediante i saggi DPPH, ABTS, FRAP e del bleaching del β -carotene (Dabbou et al., 2017; Pandino et al., 2017b), mentre l'attività *in vivo* attraverso la valutazione di biomarker dello stress ossidativo come CAT, SOD e GSH (Ben Salem et al., 2017a). Studi *in vitro* hanno dimostrato la capacità degli estratti di foglie di carciofo di ridurre la produzione di ROS dannosi per le cellule, in modelli nei quali linee cellulari sono state esposte a UVB e H_2O_2 (Salekzamani et al., 2019). Inoltre, in studi *in vivo* e in meta-analisi l'attività antiossidante dell'estratto è stata dimostrata dall'aumento della produzione di enzimi epatoprotettivi contro i radicali liberi come SOD, CAT e glutatione perossidasi (GSH-Px), oltre ad una riduzione dei livelli di malondialdeide a livello epatico e plasmatico (Salekzamani et al., 2019).

1.4.5 Attività antiinfiammatoria

La steatoepatite non alcolica è una patologia sempre più diffusa nei paesi industrializzati e in via di sviluppo. Tra i principali fattori di rischio vi sono stress ossidativo, perossidazione lipidica e infiammazione (Preiss e Sattar, 2008). I risultati ottenuti da uno studio *in vivo* hanno dimostrato che differenti tipologie di estratti ottenuti da foglie di *Cynara scolymus* riducono considerevolmente i parametri infiammatori. I livelli sierici di NF- κ B, TNF- α , COX-2, CD40 e HGF sono stati ridotti significativamente in seguito al trattamento con un estratto metanolico acquoso grezzo o con una

frazione acquosa grezza rispetto ai ratti con steatoepatite non alcolica non trattati (Safaa et al., 2013). Inoltre, studi istologici dei tessuti epatici di steatoepatiti indotte su un gruppo trattato con l'estratto di foglie di *Cynara scolymus* L. hanno mostrato una significativa riduzione nell'infiltrazione dei grassi rispetto al gruppo con steatoepatite non alcolica indotta non trattato (Safaa et al., 2013). Recentemente è stato osservato che l'azione antiinfiammatoria di un estratto acquoso da foglie di *Cynara scolymus* L. è dovuta al suo effetto inibitorio sul pathway infiammatorio NF- κ B. Difatti questo estratto ha ridotto l'espressione di enzimi COX-2 e *Matrix Metalloproteinase 2* (MMP-2) correlati all'attivazione di NF- κ B in cellule THP-1 stimulate con LPS (Miláčková et al., 2017).

1.4.6 Effetti antitumorali

A differenza degli effetti ben studiati sul metabolismo lipidico, l'azione chemiopreventiva e antitumorale degli estratti di foglie di *Cynara scolymus* L. non è ancora del tutto chiara. Alcuni studi hanno dimostrato che sostanze antiossidanti presenti negli estratti di foglie di carciofo come rutina, quercetina e acido gallico, sono in grado di indurre apoptosi e ridurre la proliferazione delle cellule tumorali. In uno studio eseguito presso l'Università di Comenius in Slovacchia, il trattamento per 24 ore con l'estratto di foglie di carciofo ha indotto un'azione antiproliferativa e proapoptotica in cellule leucemiche (Nadova et al., 2008). Si presume che gli estratti di *Cynara scolymus* L. agiscano con un meccanismo indipendente dalle caspasi contro il tumore mammario, mediante induzione della β -galattosidasi associata alla senescenza (SA- β -gal) e alla sovraregolazione di geni oncosoppressori (Mileo et al., 2015), oppure attraverso induzione dell'apoptosi in linee cellulari di mesotelioma (Pulito et al., 2015) e in cellule umane di epatoma (Miccadei et al., 2008). Inoltre, è stato osservato che l'azione antitumorale dell'estratto di carciofo in cellule tumorale DLD1 del colon-retto sia dovuta all'induzione dell'espressione di geni proapoptotici e dell'inibitore del ciclo cellulare p21 (Simsek e Uysal, 2013).

1.4.7 Attività antimicrobica

Un'estratto *n*-butanologico ottenuto da foglie di *Cynara scolymus* L., ha mostrato una significativa attività antimicrobica contro sette specie batteriche, quattro lieviti e quattro muffe. Da questo estratto sono stati isolati otto composti fenolici: quattro erano derivati dell'acido caffeoilchinico (acido clorogenico, cinarina, l'acido 3,5-di-*O*-caffeoilchinico e acido 4,5-di-*O*-caffeoilchinico) e quattro erano flavonoidi (luteolina-7-rutinoside, cinaroside, apigenina-7-rutinoside e apigenina-7-*O*- β -D-glucopiranoside). Tutti i composti fenolici isolati hanno mostrato attività antimicrobica contro *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida lusitaniae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Aspergillus niger*, *Penicillium oxalicum*, *Mucor mucedo*, *Cladosporium cucumerinum*, e tra questi l'acido clorogenico, la cinarina, la luteolina-7-rutinoside e il cinaroside erano i più efficaci, con una maggiore azione nei confronti delle muffe rispetto ai batteri (MIC 50-200 μ g/ml) (Zhu et al., 2004). Pertanto, sulla base di questi risultati, gli estratti di foglie di carciofo potrebbero essere degli ottimi candidati nelle future ricerche per i loro usi come conservanti alimentari o prodotti farmaceutici vegetali.

1.4.8 Effetti sul tratto gastrointestinale

È stato dimostrato che gli estratti di foglie di carciofo potrebbero essere utili in pazienti con sindrome del colon irritabile, dispepsia o mal di stomaco. In uno studio condotto su 208 adulti, che soffrivano di sindrome del colon irritabile e dispepsia, trattati per 2 mesi con un estratto di foglie di carciofo, è stata osservata una riduzione del 26,4% dell'incidenza della sindrome del colon irritabile, 41% dei sintomi di dispepsia, e un miglioramento del 20% della qualità della vita alla fine del trattamento (Bundy et al., 2004).

Inoltre, un estratto etanologico da foglie di carciofo è stato testato su ratti per valutare gli effetti nei confronti del danno acuto della mucosa gastrica. La somministrazione orale dell'estratto (125-500

mg/kg) ha prevenuto, in modo dose dipendente, il danno della mucosa gastrica indotto da etanolo assoluto. Tali risultati hanno dimostrato che l'estratto è efficace contro la gastrite acuta e, inoltre, è stato osservato che l'effetto potrebbe essere attribuito alla cinaropicrina, uno dei principali componenti dell'estratto insieme all'acido clorogenico. Difatti, il trattamento con la sola cinaropicrina ha mostrato un effetto positivo simile a quello osservato con la somministrazione dell'estratto, mentre il trattamento con il solo acido clorogenico è stato inefficace (Ishida et al., 2010).

Infine, in uno studio di sorveglianza post-marketing è stato evidenziato che un estratto idroalcolico ottenuto da foglie di carciofo è stato in grado di ridurre significativamente la gravità dei sintomi in pazienti con sindrome del colon irritabile (IBS) dopo sei settimane di trattamento. Inoltre, più del 96% dei pazienti ha affermato che l'estratto ha determinato degli effetti migliori o uguali rispetto a quelli osservati con trattamenti utilizzati in precedenza contro i sintomi da IBS (Walker et al., 2001).

1.4.9 Effetto anti-obesità

L'estratto di foglie di carciofo, agendo con differenti meccanismi d'azione svolge anche un effetto anti-obesità. Esso è in grado di inibire enzimi digestivi come la lipasi, l' α -glucosidasi e l' α -amilasi, e al tempo stesso di stimolare la secrezione biliare, la lipolisi e il metabolismo lipidico. Inoltre, il suo effetto anti-obesità è correlato anche all'inibizione della secrezione di adipochine pro-infiammatorie e all'effetto prebiotico dell'inulina (Mahboubi, 2018).

1.5 Bioaccessibilità e biodisponibilità di *Cynara scolymus* L. in modelli *in vitro* e *in vivo*

Nonostante in letteratura esistano diversi studi sulla caratterizzazione e quantificazione delle molecole contenute negli estratti di foglie di carciofo (Abu-Reidah et al., 2013, Pandino et al., 2011b, Schütz et al., 2004), poche sono le ricerche effettuate su modelli *in vivo* o *in vitro*, concentrate sulla biodisponibilità e/o sul metabolismo di queste sostanze.

In uno studio condotto su dieci volontari sani è stato valutato l'assorbimento e il metabolismo degli idrossicinnamati presenti nell'estratto di carciofo. Queste sostanze non sono state riscontrate nelle urine, né come agliconi né come coniugati, ma poichè gli acidi isoferulico, diidroferulico, ferulico e vanillico sono stati i principali metaboliti rilevati nelle urine, è stato suggerito che gli idrossicinnamati vengano assorbiti e metabolizzati (Rechner et al., 2001). Gli acidi ferulico e isoferulico derivano dall'idrolisi degli esteri dell'acido caffeoilchinico e successiva metilazione dei gruppi ossidrilici in posizione 3- o 4-. L'acido diidroferulico deriva dalla riduzione dell'acido ferulico, mentre l'acido vanillico dalla β -ossidazione dell'acido diidroferulico (Rechner et al., 2001). In un altro studio è stata riportata la trasformazione parziale degli acidi *O*-caffeoilchinici in acido caffeico e acido ferulico, i quali sono stati rilevati nel sangue 1 ora dopo la somministrazione orale dell'estratto di carciofo. Questi dati suggeriscono che gli acidi *O*-caffeoilchinici vengano in parte idrolizzati a livello dell'intestino tenue probabilmente grazie all'azione di un'esterasi (Azzini et al., 2007; Rechner et al., 2001). Basandosi sulla rilevazione a livello plasmatico degli acidi diidrocaffeico e diidroferulico dopo 8 ore, Azzini e colleghi (2007) hanno ipotizzato che gli altri acidi *O*-caffeoilchinici vengano idrolizzati dalle glicosidasi del microbiota intestinale in acido caffeico e ulteriormente trasformati in acido diidroferulico e acido diidrocaffeico mediante la reductasi. Similmente, in un altro studio sull'uomo, è stata valutata la biodisponibilità degli acidi caffeoilchinici e dei flavonoidi contenuti in un estratto di carciofo (Wittemer et al., 2005). Dopo il trattamento con β -glucuronidasi, gli acidi caffeico, ferulico, isoferulico, diidrocaffeico e diidroferulico sono stati identificati nel plasma e nelle urine come metaboliti derivanti dagli acidi

caffeoilchinici. Inoltre, la luteolina, somministrata in forma di glucoside, nel plasma e nelle urine non è stata rilevata in forma glicosilata o in forma agliconica ma solo come solfato o glucuronide.

La bioaccessibilità e la biodisponibilità dell'estratto di foglie di carciofo è stata anche valutata attraverso modelli *in vitro* mimando i processi digestivi umani. La biodisponibilità dei polifenoli è stata determinata utilizzando sia le cellule intestinali umane Caco-2 che modelli di digestione *in vitro*. È stato riscontrato che la bioaccessibilità dei fenoli totali era di circa il 55,8%, e in particolare 70,0% per l'acido clorogenico, 41,3% per l'acido 3,5-*O*-dicaffeoilchinico, e 50,3% per l'acido 1,5-*O*-dicaffeoilchinico. Alcuni composti come gli acidi cumarico, caffeico e suoi derivati, sono stati riscontrati nella porzione basolaterale presumendo l'azione da parte di esterasi extra- ed intracellulari sull'acido clorogenico. Tuttavia, solamente l'apigenina-7-*O*-glucoside è stata trasportata attraverso il monostrato di cellule Caco-2, dimostrando la sua biodisponibilità (D'Antuono et al., 2015).

In un modello di digestione *in vitro* per la valutazione della bioaccessibilità dei polifenoli e della cinaropicrina derivanti dallo stelo del carciofo è stata riscontrata una bioaccessibilità pari a 82% per i polifenoli e 74% per la cinaropicrina durante la digestione duodenale (Colantuono et al., 2018).

1.6 Tollerabilità e controindicazioni

Gli estratti di foglie di *Cynara scolymus* L., ai dosaggi raccomandati, hanno dimostrato una buona tollerabilità e pochi effetti collaterali. L'utilizzo della pianta di carciofo come alimento in molti paesi per centinaia di anni ne supporta la sicurezza. Inoltre, è importante notare che diversi studi segnalano l'assenza di effetti avversi con l'utilizzo di un estratto standardizzato (Ben Salem et al., 2015). Le uniche segnalazioni riscontrate sono state: lievi effetti collaterali, come un aumento transitorio della flatulenza; reazioni eczematose locali dopo esposizione professionale e a causa del contatto cutaneo con la pianta fresca o le sue parti essiccate. Inoltre, secondo una linea guida per medici e farmacisti, a causa del suo effetto stimolante la bile, l'estratto non dovrebbe essere assunto

da soggetti con calcoli biliari o altre occlusioni del dotto biliare (Volker e Rudolf, 2004). Sebbene gli estratti di foglie di carciofo sembrerebbero ben tollerati e non sono stati associati a significativi effetti collaterali, ulteriori studi sulla sicurezza dovranno essere svolti.

**2. L'epitelio intestinale, il ruolo delle
giunzioni strette e le malattie
infiammatorie intestinali**

2.1 Introduzione

Il corpo umano possiede molteplici epiteli che formano barriere dirette tra l'ambiente esterno e quello interno dell'ospite. In particolare, il tratto gastrointestinale ospita una delle più grandi aree di interazione luminale e svolge un ruolo fondamentale nella regolazione del sistema immunitario e quindi nella salute umana (Turner, 2009; Helander e Fändriks, 2014). La mucosa gastrointestinale è composta da strati multipli, ognuno dei quali presenta un ruolo specifico per il mantenimento dell'integrità della barriera intestinale necessaria per la salute e la difesa (Farhadi et al., 2003). Essa funge da barriera semipermeabile permettendo l'assorbimento dei nutrienti e l'interazione con il sistema immunitario, ma al tempo stesso impedisce l'attraversamento di questa barriera ad antigeni dannosi e microrganismi. La regolazione di questa funzione è dovuta all'interazione tra componenti strutturali e molecolari presenti a livello della mucosa intestinale che cooperano per il mantenimento dell'integrità intestinale e dell'omeostasi immunitaria (Salvo Romero et al., 2015).

L'intestino umano è popolato da una vasta comunità di microrganismi, tra cui batteri, virus e funghi che insieme costituiscono il microbiota intestinale (Vemuri et al., 2020). Il materiale genico di questi microbi, ovvero il microbioma intestinale, consiste di oltre 45 milioni di geni non ridondanti (Forster et al., 2016), i quali sono coinvolti in numerose funzioni che integrano e completano quelle del genoma umano. Il microbiota e la barriera intestinale comunicano tra loro, creando una rete complessa di interazioni che in condizioni fisiologiche sono in equilibrio e contribuiscono all'omeostasi e alla salute umana. Alterazioni indotte dall'alimentazione, sostanze chimiche, modificazioni nella composizione e nella funzione del microbiota intestinale possono determinare perturbazioni di questo equilibrio. Pertanto, la modulazione dell'interazione tra microbiota e barriera intestinale è sempre più spesso considerata tra le nuove strategie terapeutiche in numerose malattie intestinali (Adak e Khan, 2019).

2.2 Composizione della barriera intestinale

La barriera intestinale è composta da strati multipli. Lo strato esterno comprende lo strato di muco, il microbiota commensale intestinale e le proteine di difesa, tra cui le proteine antimicrobiche (AMP – *antimicrobial proteins*) e le immunoglobuline A secretorie (sIgA). Lo strato intermedio è costituito dalle cellule epiteliali intestinali (IECs) specializzate, mentre lo strato interno è composto dalle cellule dell'immunità innata ed adattativa come cellule T, linfociti B, macrofagi e cellule dendritiche (Turner, 2009, Muniz et al., 2012, Vancamelbeke e Vermeire, 2017).

Ognuno di questi componenti della barriera intestinale svolge un ruolo specifico nella funzione di difesa fisica e immunologica. La barriera è ricoperta da muco, una sostanza composta principalmente da acqua (>98%) e dalle proteine MUC. Nell'intestino tenue e crasso MUC2, secreta dalle cellule caliciformi, è la proteina più abbondante e la sua espressione è correlata alla protezione contro malattie come la colite, difatti topi con Muc2 knockout sviluppano spontaneamente questa patologia (Van der Sluis et al., 2006). A differenza dell'intestino tenue, in cui è presente un singolo strato di muco, nel colon e nello stomaco vi è un doppio strato (Johansson et al., 2008).

Il microbiota risiede nella mucosa intestinale. A livello dell'intestino crasso colonizza lo strato esterno di muco senza entrare in contatto con l'epitelio, mentre nell'intestino tenue il contatto tra il microbiota e l'epitelio si verifica solo sulla punta dei villi intestinali (Pelaseyed et al., 2014). Dunque, lo strato di muco ha il ruolo di proteggere le cellule intestinali da agenti esterni e di facilitare l'assorbimento dei nutrienti (Paone e Cani, 2020). Poiché nell'intestino tenue è presente un solo strato di muco, questo è più facilmente penetrabile da batteri o potenziali tossine, pertanto le cellule di Paneth e le cellule immunitarie, essendo in grado di secernere proteine antimicrobiche, sono importanti per la difesa dell'ospite (Johansson e Hansson, 2011).

Il microbiota intestinale è composto da circa 100 trilioni di microrganismi (Valdes et al., 2018), ed è coinvolto in numerose funzioni, tra cui quelle protettiva, metabolica, strutturale e di regolazione

dell'immunità per la salute del tratto intestinale e dell'ospite. La sua composizione e funzione può variare con l'età e con differenti condizioni di salute che comportano cambi nella struttura e funzione della barriera intestinale. Tra le principali funzioni del microbiota intestinale vi sono la fornitura di nutrienti alle cellule intestinali e la metabolizzazione di prodotti della dieta che non vengono digeriti, come proteine e fibre alimentari (Adak e Khan, 2019). In particolare, mediante fermentazione anaerobica di carboidrati complessi non digeriti, il microbiota intestinale è capace di generare acidi grassi a catena corta (SCFA, *Short-chain fatty acids*), come gli acidi acetico, butirrico e propionico, i quali non sono solamente un substrato energetico per le cellule intestinali, ma sono anche coinvolti in funzioni regolatorie. Gli SCFA possono incrementare la produzione dello strato di muco modulando la trascrizione dei geni delle mucine nelle cellule caliciformi (Rooks e Garrett, 2016), e sono in grado di promuovere il riassetto delle giunzioni strette (TJ, *Tight junctions*) modulando l'attivazione di AMPK e la fosforilazione della catena leggera regolatoria della miosina II (MLC2, *Myosin Light Chain 2*), rinforzando la barriera epiteliale intestinale (Miao et al., 2016; Cunningham e Turner, 2012). Infine, il microbiota intestinale favorisce lo sviluppo del sistema immunitario dell'ospite mediante i metaboliti, i MAMP (*microorganism-associated molecular patterns*), inclusi i PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*) e antigeni (Ruff et al., 2020).

L'immunità intestinale è regolata dalle cellule epiteliali intestinali sulla superficie della mucosa, mentre dalle cellule di Paneth nell'intestino tenue. Inoltre, la lamina propria è colonizzata da cellule dell'immunità innata ed adattativa (Mowat e Agace, 2014), e il tessuto linfoide associato all'intestino (GALT - *gut associated lymphoid tissue*) si può ritrovare sia nell'intestino tenue come grandi aggregati di tessuto linfoide chiamati placche di Peyer, sia come follicoli linfoidi isolati nella porzione superiore dell'intestino e nel colon (Mörbe et al., 2021). Le cellule intestinali e le cellule di Paneth rappresentano la prima linea di difesa contro agenti patogeni e contribuiscono all'immunità dell'ospite mediante la secrezione di citochine e prodotti antimicrobici (Chassaing et al., 2014). Le cellule di Paneth sono cellule epiteliali specializzate localizzate nelle cripte

dell'intestino tenue che, mediante la secrezione di AMP, contribuiscono alla difesa dell'ospite. Esse svolgono un ruolo importante nella modulazione del microbiota e un'azione antimicrobica mediante la secrezione di lisozima, defensina e altre proteine immunoregolatrici; in particolare, tra queste ultime l'IL-22 è stata riconosciuta come la principale citochina con molteplici ruoli nella salute intestinale (Elphick e Mahida 2005; Keir et al., 2020). Difatti, IL-22 è coinvolta nella rigenerazione delle cellule epiteliali, nell'omeostasi del muco attraverso l'induzione di geni delle mucine e l'incremento del numero di cellule caliciformi, e nel rilascio di peptidi antimicrobici. Infine, le cellule M, cellule epiteliali specializzate, oltre a stimolare le plasmacellule a secernere IgA (Nakamura et al., 2020), partecipano nella risposta infiammatoria catturando gli antigeni a livello luminale e trasportandoli alle placche di Peyer mediante transitosi (Dillon e Lo, 2019).

2.3 Le cellule epiteliali intestinali e il ruolo delle giunzioni strette

L'epitelio della barriera intestinale è composto da cinque differenti tipologie di cellule: gli enterociti, le cellule caliciformi, le cellule enteroendocrine, le cellule di Paneth e le cellule M, le quali derivano tutte da cellule staminali che risiedono nelle cripte intestinali (Adak e Khan, 2019).

L'epitelio intestinale rappresenta una barriera multistrato che permette la difesa contro composti dannosi e patogeni. Poiché è impermeabile a soluti idrofilici, molecole e nutrienti possono oltrepassare questa barriera soltanto mediante specifici trasportatori o canali localizzati sulla membrana apicale e basolaterale delle cellule epiteliali.

Esistono due principali vie che permettono alle sostanze di attraversare la barriera intestinale: la via transcellulare, che comprende i pori acquosi; l'assorbimento attivo mediato da carrier per i nutrienti e l'endocitosi; e la via paracellulare per ioni e molecole idrofile. La via paracellulare è regolata dal complesso giunzionale apicale, il quale è composto da TJ, giunzioni aderenti (AJ - *adherens junctions*) e desmosomi (Suzuki, 2013). Le AJ, insieme ai desmosomi, formano dei forti legami tra

le cellule epiteliali e aiutano la comunicazione intercellulare, ma non regolano la permeabilità paracellulare (Oda e Takeichi, 2011; Baum e Georgiou, 2011).

Le TJ sono giunzioni intercellulari localizzate nella regione apicale della membrana laterale delle cellule epiteliali, essenziali per la struttura della barriera epiteliale intestinale e il mantenimento della polarità. Esse svolgono un'importante funzione di barriera che limita la libera diffusione delle molecole attraverso lo spazio intercellulare (Zihni et al., 2016; Anderson e Van Itallie, 2009; Shen et al., 2011). In condizioni omeostatiche, le TJ hanno il compito di indirizzare il passaggio delle sostanze e pertanto svolgono una divisione meccanica delle sostanze per il passaggio dallo spazio luminale agli altri componenti della barriera intestinale (Paradis et al., 2021). Le strutture delle TJ comprendono proteine transmembrana come claudine, occludina, molecole di adesione giunzionale (JAM - *junctional adhesion molecules*), e tricellulina, e proteine della placca intracellulare come la zonula occludens (ZO) e la cingulina (Suzuki, 2013).

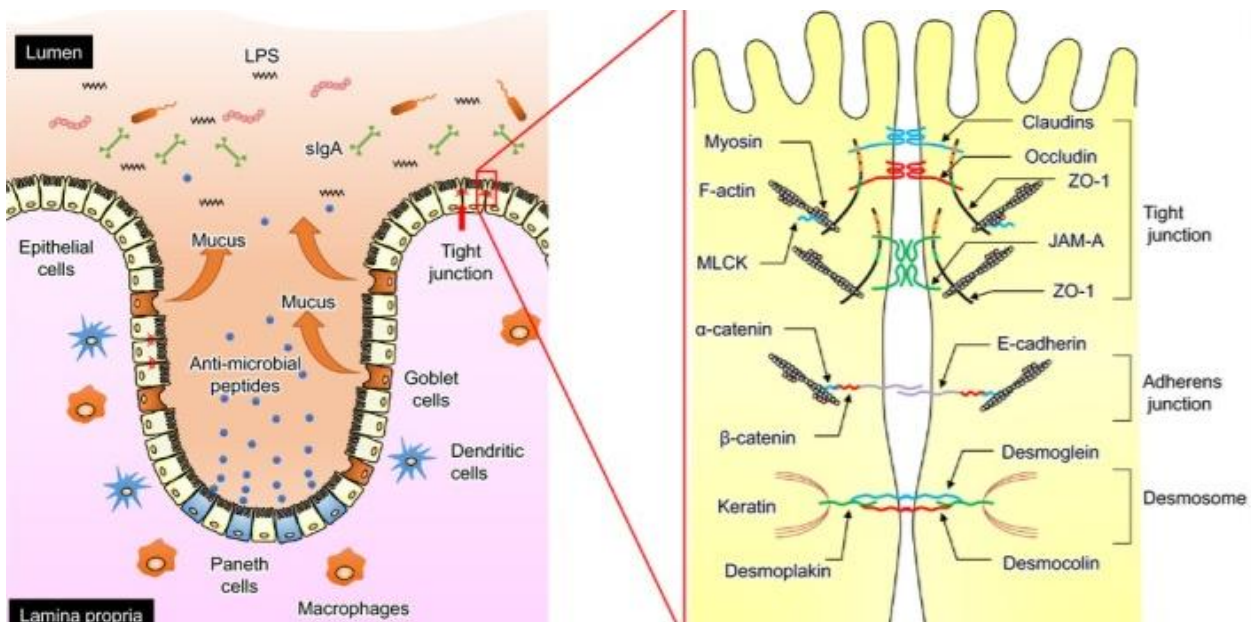


Figura 5. Struttura della barriera intestinale e organizzazione delle TJ (Suzuki, 2020).

Il passaggio paracellulare delle molecole è regolato grazie all'interazione tra le regioni extracellulari delle proteine transmembrana di cellule adiacenti (Suzuki, 2020). I domini intracellulari delle

proteine transmembrana interagiscono con le proteine della placca intracellulare, che a loro volta ancorano le proteine transmembrana all'anello di actomiosina perigiunzionale, e tale interazione è di vitale importanza per il mantenimento della struttura e della funzione delle TJ. La contrazione dell'anello di actomiosina perigiunzionale è regolato dall'attività della catena leggera della miosina (MLC - *myosin light chain*). La fosforilazione di MLC, mediata dalla chinasi della catena leggera della miosina (MLCK - *myosin light chain kinase*) e dalle chinasi associate a Rho (ROCK - *Rho-associated kinases*), conduce alla contrazione dell'anello dell'actomiosina e alla conseguente apertura delle vie paracellulari (Suzuki, 2013). Studi di fisiologia suggeriscono che la permeabilità paracellulare sia mediata da almeno due vie: una via costituita da piccoli pori con un diametro di circa 4 Å selettiva per ioni con carica positiva o negativa e piccole molecole prive di carica, ed una via selettiva per dimensione che consente la permeazione di molecole di dimensioni fino a circa 60 Å (Zihni et al., 2016; Anderson e Van Itallie, 2009; Shen et al., 2011; Watson et al., 2005). Le claudine svolgono un ruolo centrale nella formazione dei piccoli pori, mentre le JAM formano grandi pori selettivi per dimensione, fungendo così da setaccio molecolare (Otani e Furuse, 2020). Le JAM sono molecole di adesione cellula-cellula e svolgono un ruolo determinante non soltanto nella regolazione della barriera ma anche nella polarità epiteliale.

Le claudine (20-27 kDa), facenti parte della famiglia di proteine integrali di membrana, sono essenziali nella regolazione della permeabilità paracellulare. Esse presentano un loop intracellulare e due extracellulari (Furuse et al., 1998). Claudine presentanti residui carichi nella regione extracellulare determinano la selettività di carica del canale paracellulare, mentre altre che possiedono una regione extracellulare neutra sono essenziali per la formazione della barriera (Otani e Furuse, 2020). Attraverso la loro porzione citoplasmatica interagiscono con le proteine della famiglia delle ZO, le quali, a loro volta, sono essenziali per l'assemblaggio delle TJ (Otani e Furuse, 2020). Claudina-2, -3, -4, -7, -12, -14, -15 sono le isoforme più abbondanti nell'epitelio dell'intestino tenue e crasso (Holmes et al., 2006). Sono state identificate 24 isoforme di tali proteine e sono suddivise in base alla loro funzione in isoforme formanti la barriera e isoforme

formanti pori. Le claudine-3, -4, -7 e -14 formano una barriera selettiva nei confronti di macromolecole e ioni, mentre le claudine-2, -12 e -15 formano pori selettivi per ioni e acqua (Van Itallie e Anderson, 2006).

L'occludina (~ 65 kDa) è anch'essa una proteina integrale di membrana con quattro domini transmembrana, due loop extracellulari e uno intracellulare. L'interazione dei loop intracellulari con quelli delle cellule adiacenti creano una barriera contro le macromolecole ma permettono il passaggio di piccoli ioni (Al-Sadi et al., 2011).

Le JAM (~ 30-40 kDa) fanno parte della superfamiglia delle Ig e sono caratterizzate da due domini extracellulari Ig, un dominio transmembrana e un dominio C-terminale intracellulare. I domini N-terminali delle JAM interagiscono con vari ligandi mediante interazioni omofile ed eterofile (Bazzoni, 2003). Le interazioni omofile svolgono un ruolo nella formazione delle TJ, mentre le interazioni eterofile sono coinvolte nell'adesione tra le cellule. I domini intracellulari delle proteine transmembrana, come le claudine e l'occludina, sono associate alle proteine della placca citosolica, ZO e cingulina, che forniscono un'impalcatura strutturale alle TJ.

Tre sono le proteine facenti parte della famiglia delle ZO: ZO-1 (~ 220 kDa); ZO-2 (~ 160 kDa); ZO-3 (~ 130 kDa). Queste proteine fanno parte della famiglia delle guanilato chinasi associate alla membrana (MAGuK - *membrane-associated guanylate kinases*) (Suzuki, 2013), e presentano 3 domini di legame PDZ (*Post-synaptic density 95/Drosophila discs large/zona-occludens 1*), un dominio Src di omologia 3 (SH3) e una regione di omologia alla guanilato chinasi (GUK) nella porzione N-terminale. Le claudine si legano al primo dominio PDZ di ZO-1, ZO-2 e ZO-3, le JAM-A si legano al terzo dominio PDZ di ZO-1, l'occludina si lega al dominio GUK di ZO-1, mentre i secondi domini PDZ sono coinvolti nell'interazione tra le proteine ZO (Suzuki, 2013). Nonostante le funzioni biochimiche e strutturali delle ZO siano ancora in fase di studio, è ormai chiaro che esse regolino l'assemblaggio e la stabilizzazione delle TJ.

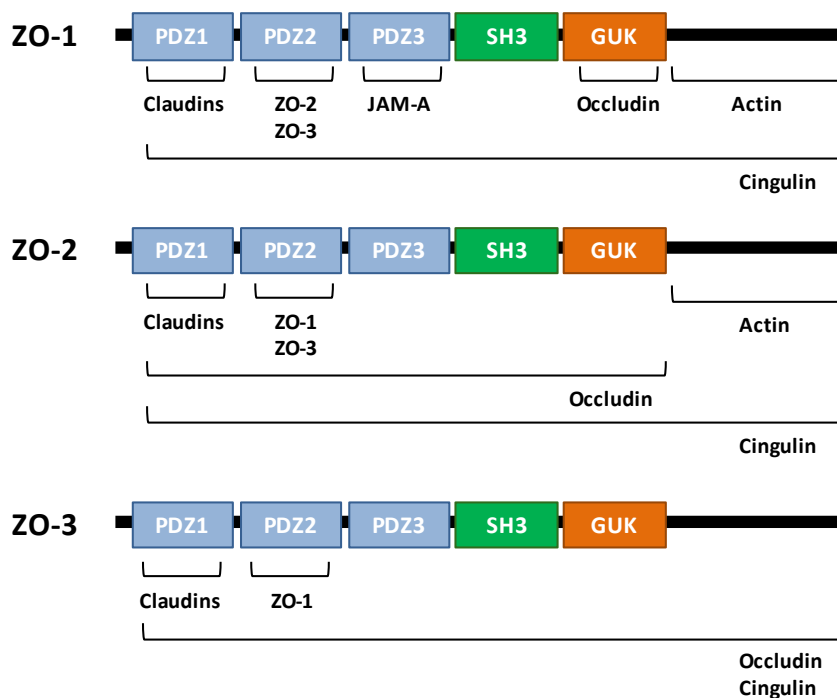


Figura 6: Domini multipli delle proteine ZO.

2.4 Meccanismi molecolari coinvolti nell'alterazione delle TJ

La struttura delle TJ, assemblaggio e disassemblaggio, è influenzata da vari stimoli fisiologici e patologici. Diverse protein-chinasi, come la protein-chinasi attivata da mitogeno (MAPK), fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K)/Akt, protein-chinasi C (PKC), MLCK, le GTPasi della famiglia Rho, e la protein-chinasi attivata da AMP (AMPK), sono coinvolte nella permeabilità intestinale (Ulluwishewa et al., 2011). Queste chinasi, modulando la funzionalità della barriera mediante regolazione dell'espressione delle TJ, e pertanto sono regolatori della funzionalità delle cellule epiteliali.

Le cellule epiteliali intestinali esprimono diverse isoforme di PKC che sono coinvolte in varie vie di segnale trasduzionali (Farhadi et al., 2006), e isoforme specifiche sono state associate all'incremento o alla riduzione dei valori di resistenza elettrica trans-epiteliale (TEER) in cellule epiteliali intestinali (Song et al., 2001). PKC è anche coinvolto nella via di segnale di TLR2. La stimolazione di TLR2, il quale svolge un ruolo chiave nel riconoscimento microbico e nella

modulazione della risposta immunitaria, determina l'attivazione di PKC α e PKC δ , che a sua volta conduce alla modulazione delle TJ con conseguente aumento della TEER e redistribuzione di ZO-1 (Cario et al., 2004).

Le MAPK, in risposta a vari stimoli, sono coinvolte nella regolazione delle TJ. Per esempio, il fattore di crescita epiteliale previene la distruzione delle TJ indotta da stress ossidativo mediante il pathway delle MAPK (Basuroy et al., 2006). Inoltre, le chinasi regolate da segnali extracellulari (ERK), facenti parte della superfamiglia delle MAPK, hanno dimostrato di prevenire la distruzione delle TJ interagendo direttamente con la porzione C-terminale dell'occludina (Basuroy et al., 2006). MLCK regola la funzione della barriera intestinale mediante fosforilazione della catena leggera della miosina (MLC) a livello della serina-19, portando ad una contrazione dell'anello perigiunzionale dell'actomiosina con conseguente distruzione delle TJ e AJ (Zahs et al., 2012), pertanto l'inibizione di MLCK previene l'aumento della permeabilità delle TJ. In uno studio *in vitro* è stato osservato che, inducendo MLCK in una linea cellulare Caco-2, i monostrati completamente differenziati mostravano una riduzione dei valori di TEER e una redistribuzione di ZO-1 e occludina, dimostrando così che MLCK, mediante fosforilazione di MLC, è coinvolta nell'assemblaggio e nella regolazione delle TJ (Shen et al., 2006).

Le GTPasi della famiglia Rho modulano numerose funzioni delle cellule epiteliali intestinali (Wennerberg et al., 2005; Zhang e Gao, 2016). Cdc42, Rac1 e RhoA, GTPasi della famiglia Rho, sono coinvolte nella regolazione della struttura e della funzione delle TJ mediante controllo della contrazione dell'anello di actomiosina (Hall, 2012). Le Rho GTPasi fungono da interruttore molecolare ed eseguono la loro funzione passando dallo stato legato a GDP (inattivo), allo stato legato al GTP (attivo), e questo passaggio tra i due stati è regolato da 3 classi di molecole regolatrici (Quiros e Nusrat, 2014). I fattori di scambio dei nucleotidi guanina (GEF - *guanine nucleotide exchange factors*) promuovono la conversione delle GTPasi nella forma attiva, le proteine attivanti le GTPasi (GAP - *GTPase-activating proteins*) stimolando il legame con GDP inducono la forma inattiva, mentre gli inibitori della dissociazione della guanina (GDI - *guanine nucleotide*

dissociation inhibitors) modulano l'interazione tra le GTPasi e i regolatori GEF e GAP (Bos et al., 2007).

Le proteine GAP, GEF e GDI sono ampiamente espresse a livello dell'epitelio intestinale e sono attivate da stimoli extracellulari come citochine proinfiammatorie, fattori di crescita e prodotti batterici (Quiros e Nusrat, 2014, Besray Unal et al., 2018). Effettori a valle delle proteine Rho, conosciuti come ROCK, fosforilando MLC e inducendo la contrazione dell'anello di actomiosina modulano i pathway coinvolti nella riorganizzazione delle TJ (Li et al., 2018, Walsh et al., 2001).

AMPK è il principale regolatore del metabolismo energetico e svolge un ruolo critico nella funzionalità della barriera epiteliale (Zhu et al., 2018). L'attivazione di AMPK conduce al rafforzamento della barriera epiteliale promuovendo la differenziazione e la polarizzazione cellulare. Induttori di AMPK, come il ribonucleotide 5-aminoimidazolo-4-carbossammide (AICAR), migliorano l'assemblaggio e la localizzazione delle TJ, e aumentano i valori di TEER in cellule renali canine MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) (Zhang et al., 2006; Zheng e Cantley, 2007). In cellule epiteliali intestinali Caco-2, AICAR ha ottimizzato la localizzazione di ZO-1 (Sun et al., 2017), e il butirrato, attivando AMPK, ha favorito la redistribuzione di ZO-1 e occludina, migliorato i valori di TEER e ridotto la permeabilità paracellulare dell'inulina (Peng et al., 2009).

2.5 Alterazioni della barriera intestinale

L'epitelio intestinale interagisce continuamente con agenti patogeni e antigeni di origine alimentare, e grazie alla sua azione di barriera regola efficacemente l'attraversamento di molecole e microorganismi attraverso lo spazio paracellulare. Lo spazio paracellulare ha dimensioni comprese tra 10 e 15 Å, pertanto in condizioni fisiologiche molecole con dimensioni superiori (~ 3,5 kDa) vengono bloccate (Christen e von Herrath, 2004). Come detto in precedenza, le TJ svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento della barriera epiteliale intestinale, pertanto la perdita di tali proteine danneggia la barriera paracellulare con conseguente incremento della permeabilità

intestinale e successiva penetrazione dei batteri del lume intestinale e di metaboliti dannosi che scatenano una risposta immunitaria (Buckley e Turner, 2018). La funzionalità della barriera intestinale può essere compromessa da gravi danni strutturali della mucosa o da alterazioni dei componenti che regolano la barriera (Nalle e Turner, 2015). Molti sono i fattori ambientali che possono influenzare la salute dell'intestino. L'inquinamento, i pesticidi, gli additivi alimentari e gli xenobiotici sono noti modulare la barriera intestinale. È stato dimostrato che il particolato atmosferico può indurre stress ossidativo in cellule intestinali Caco-2 attraverso alterazione delle TJ con conseguente incremento della permeabilità intestinale (Mutlu et al., 2011). Il fumo di sigaretta interferisce con la composizione del microbiota intestinale che però può essere ripristinata dopo aver smesso di fumare, difatti in uno studio osservazionale trasversale è stato osservato un aumento della presenza fecale di *Bacteroidetes* nei fumatori rispetto a soggetti che non avevano mai fumato o ex fumatori (Lee et al., 2018). Anche nei topi l'effetto del fumo di sigaretta sui villi intestinali e sull'integrità delle TJ è associato all'incremento della permeabilità dell'intestino tenue (Zuo et al., 2014). La nicotina, nella colite ulcerosa (UC), svolge un ruolo protettivo modulando le vie di segnale colinergiche in cellule immunitarie e riducendo sia la loro attivazione che l'espressione di citochine (Lakhan e Kirchgessner, 2011). Diversamente, nel morbo di Chron, la nicotina incrementa la permeabilità intestinale interagendo con l'espressione del gene della claudina (Li et al., 2015), inducendo l'apoptosi delle cellule epiteliali (Cook e Shenoy, 2003) e modificando la composizione del microbiota intestinale (Benjamin et al., 2012). I pesticidi, come il clorpirifos, un insetticida organofosfato, incrementano la permeabilità intestinale (Cook e Shenoy, 2003) e sono capaci di alterare l'espressione di proteine delle TJ come ZO-1 e claudina-4 (Nielsen et al., 2018). Inoltre, il glifosato, un acido organico utilizzato come erbicida, potrebbe influenzare la composizione del microbiota intestinale interferendo con la biosintesi batterica di amminoacidi aromatici (Nielsen et al., 2018) e, a dosi elevate, è capace di indurre un danno della membrana in cellule Caco-2 e in cellule intestinali di ratto (Vasiluk et al., 2005).

Gli additivi alimentari, compresi quelli naturali, sono utilizzati per la conservazione dei prodotti alimentari (Carocho et al., 2015), e recentemente è stato ipotizzato che alcuni di essi potrebbero incrementare la suscettibilità alle malattie autoimmuni intestinali agendo direttamente sulle TJ (Lerner e Matthias, 2015). Difatti, alcuni autori attribuiscono l'incremento dell'incidenza del CD in Giappone al vasto utilizzo di emulsionanti (Roberts et al., 2013).

La barriera intestinale può anche essere compromessa dallo stress indotto dal calore, divenendo così permeabile a proteine macromolecolari quali tossine, antigeni e potenziali allergeni (Lian et al., 2020). È stato osservato in atleti che l'esercizio fisico ad alta intensità produce calore metabolico e variazioni dell'afflusso di sangue nella mucosa intestinale con conseguente influenza sull'integrità della barriera intestinale (Pugh et al., 2017; Pires et al., 2017). Il meccanismo che è stato proposto in questo processo coinvolge l'attivazione di PKC. Essa, fosforilando MLCK, comporta l'aumentata contrattilità dell'actina e pertanto uno squilibrio delle TJ (Yang et al., 2007).

Infine, anche alcuni farmaci sono capaci di alterare l'integrità della barriera intestinale, un esempio sono gli inibitori di pompa protonica. Tali farmaci, ampiamente utilizzati, aumentando il pH gastrico, modificano la composizione del microbiota intestinale riducendo la sua diversità e promuovendo la proliferazione di batteri orali nell'intestino tenue (Imhann et al., 2016), esponendo così l'intestino a infezioni da parte di diversi microrganismi (Martinsen et al., 2019). L'incremento del pH indotto da questi farmaci è un fattore di rischio anche per l'infezione da *Clostridium difficile* (Trifan et al., 2017). Gli inibitori di pompa protonica sono in grado di modulare la barriera intestinale anche interferendo con il rilassamento della muscolatura liscia, con l'attività della fosfatasi e l'omeostasi elettrolitica locale (ovvero Ca e K), e dunque con la funzionalità delle TJ (Aydin et al., 2003; Yenisehirli e Onur, 2006; Mullin et al. 2008). In casi di grave danneggiamento della mucosa, la permeabilità intestinale incrementa e batteri, nonché i loro frammenti o prodotti, sono liberi di traslocare dal lume. L'interazione tra LPS e recettori Toll-like (TLR) conduce a endotossitemia sistemica (Cani et al., 2007; Hollander e Kaunitz, 2020). L'aumento della permeabilità e la disbiosi sono strettamente correlate tra loro ed entrambe sono coinvolte nella

patogenesi di vari disordini gastrointestinali e sistemici (Kinashi e Hase, 2021; Choi et al., 2017). Disfunzioni della barriera intestinale e un flusso incontrollato di antigeni che attraversano l'epitelio intestinale stimolano il sistema immunitario di individui suscettibili e alterano l'equilibrio tra il microbiota e l'ospite innescando meccanismi infiammatori nell'intestino o in organi più distanti (Meddings, 2008; Yu et al., 2012). Difetti della barriera intestinale sono stati associati a diverse malattie, da quelle autoimmuni (IBS, diabete mellito di tipo 1, celiachia, sclerosi multipla, ecc.) (Paray et al., 2020) a quelle neurologiche (disturbi dell'umore, disturbi dello spettro autistico, malattia di Parkinson e morbo di Alzheimer) (Foster e McVey Neufeld, 2013; Mayer et al., 2015; Kesika et al., 2021), da malattie del tratto gastrointestinale (celiachia, IBD e carcinoma del colon), a malattie extra intestinali (malattie croniche epatiche, obesità e diabete mellito di tipo 1), e tali difetti fungono da innesco o inducono un peggioramento di queste malattie.

2.6 Il ruolo delle TJ nelle malattie infiammatorie intestinali

Le malattie infiammatorie intestinali (IBD), come il morbo di Crohn (CD) e la colite ulcerosa (UC), sono disordini cronici e la loro esatta eziologia è ancora sconosciuta. Molto probabilmente i fattori coinvolti nel meccanismo patogenetico comprendono fattori immunologici, genetici, ambientali e cambiamenti nella composizione del microbiota intestinale (Zhang e Li, 2014). La barriera intestinale, essendo il punto di interazione tra l'interno e l'esterno, rappresenta un fattore importante nello sviluppo delle IBD. Difatti, numerosi studi suggeriscono che la distruzione della barriera intestinale, l'esposizione del contenuto luminale alle cellule immunitarie mucosali e l'alterata risposta immunitaria sono tre fattori coinvolti nella patogenesi delle IBD (Clayburgh et al., 2004). Nelle IBD, le proteine delle TJ subiscono variazioni nell'espressione e nella localizzazione che causano alterazioni della barriera paracellulare. Questi cambiamenti si traducono in un aumento del trasporto paracellulare di soluti e acqua, ad una diffusione di ioni ed acqua dal circolo sanguigno al lume intestinale che causano diarrea. Inoltre, l'aumentata permeabilità permette l'attraversamento

da parte di grandi molecole, nonché di patogeni, dal lume intestinale, che scatenano una risposta immunitaria e causano infiammazione. In pazienti con CD l'aumento della permeabilità dell'epitelio intestinale è un indice della ricaduta clinica, pertanto questo suggerisce che difetti nella permeabilità sono coinvolti nella patogenesi di questa malattia (Weber e Turner, 2007; Xu et al., 2019).

In condizioni di alterazione della barriera intestinale è stato osservato un aumento dell'espressione di citochine proinfiammatorie, come TNF- α e IFN- γ , che conduce all'inizio dell'infiammazione e allo sviluppo delle IBD (Wang et al., 2006). L'infiammazione indotta da queste citochine determina iperpermeabilità che conduce alla permeazione di prodotti batterici e di antigeni luminali, i quali inducono una consistente e anomala risposta infiammatoria. L'attivazione del sistema immunitario stimola la secrezione di citochine da parte di macrofagi, cellule T e mastociti che conducono a difetti della barriera intestinale. Diversi studi clinici hanno rilevato la presenza di elevati livelli intestinali di citochine infiammatorie come TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e IL-17 in pazienti con IBD, ed è stato dimostrato che queste citochine alterino la funzionalità della barriera intestinale (Suzuki et al., 2013). In particolare, dal momento che il trattamento anti-TNF- α sopprime la risposta infiammatoria e riduce la permeabilità intestinale, sembrerebbe che il TNF- α svolga un ruolo fondamentale nello sviluppo di difetti della barriera intestinale in pazienti con IBD (Suenart et al., 2002), e queste variazioni nella struttura delle TJ indotti dal TNF- α sono mediati dal pathway NF- κ B (Ma et al., 2004).

Sia in modelli sperimentali di infiammazione intestinale che in pazienti con IBD è stata osservata una variazione simile della struttura e della funzionalità delle TJ (Poritz et al., 2011; Poritz et al., 2007) associate alla riduzione di ZO-1 e occludina. Studi clinici hanno dimostrato una ridotta espressione e un'alterazione della distribuzione delle proteine delle TJ: occludina, claudine-3, -5 e -8, e JAM-A in pazienti con CD (Zeissig et al., 2007; Vetrano et al., 2008) e occludina, claudina-1 e -4, tricellulina e JAM-A in pazienti con UC (Heller et al., 2005; Vetrano et al., 2008). Inoltre, nell'intestino sia di pazienti con UC che CD è stato identificato un aumento dell'espressione di

MLCK e di p-MLC, indice dell'alterazione citoscheletrica della permeabilità intestinale (Blair et al., 2006). L'espressione genica di MLCK è indotta sia da TNF- α che da IL-1 β mediante attivazione di NF- κ B e ciò provoca un aumento della permeabilità intestinale in cellule Caco-2 (Ye e Ma, 2008; Al-Sadi et al., 2010), pertanto inibendo l'espressione di MLCK indotta da TNF- α è possibile ripristinare la funzione delle TJ.

2.7 Il ruolo dei pathway NF- κ B e Nrf2 nelle IBD

La perdita di meccanismi di controllo dell'infiammazione nell'intestino determina l'attivazione della risposta immunitaria locale con conseguente produzione di citochine proinfiammatorie (Sobczak et al., 2014). L'alterata produzione di citochine proinfiammatorie è implicata nella patogenesi delle IBD e il fattore trascrizionale NF- κ B è uno dei principali regolatori di questi meccanismi. Il pathway di NF- κ B modula l'espressione di numerosi geni coinvolti nella risposta immunitaria e nell'infiammazione (Baldwin, 1996; Ghosh et al., 1998). Nei mammiferi, la famiglia dei fattori trascrizionali NF- κ B comprende 5 membri: p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50 e p52. Nell'uomo la forma dimerica più comune è quella formata dalle subunità p50 e p65, e quest'ultima è capace di stimolare la trascrizione di geni proinfiammatori. I dimeri di NF- κ B vengono trattenuti nel citoplasma in forma inattiva grazie al legame con proteine inibitrici appartenenti alla famiglia I κ B (I κ B α ; I κ B β , I κ B ϵ) (Siebenlist et al., 2005). L'attivazione del fattore trascrizionale NF- κ B è indotta dal complesso IKK che comprende le subunità catalitiche IKK α e IKK β e la proteina regolatrice NEMO/IKK γ (Israel, 2000). L'attivazione di NF- κ B può essere indotta da numerosi stimoli che includono citochine proinfiammatorie come TNF- α e IL-1 β , ma anche componenti batterici come LPS (Figura 7). In seguito ad uno di questi stimoli, il complesso IKK fosforila le proteine inibitorie I κ B a livello di specifici residui serinici rendendoli idonee per la poliubiquitinazione e degradazione mediata dal proteosoma. NF- κ B, una volta libero dalle proteine

della famiglia I κ B, trasloca nel nucleo e attiva la trascrizione di geni bersaglio (Hayden e Ghosh, 2004).

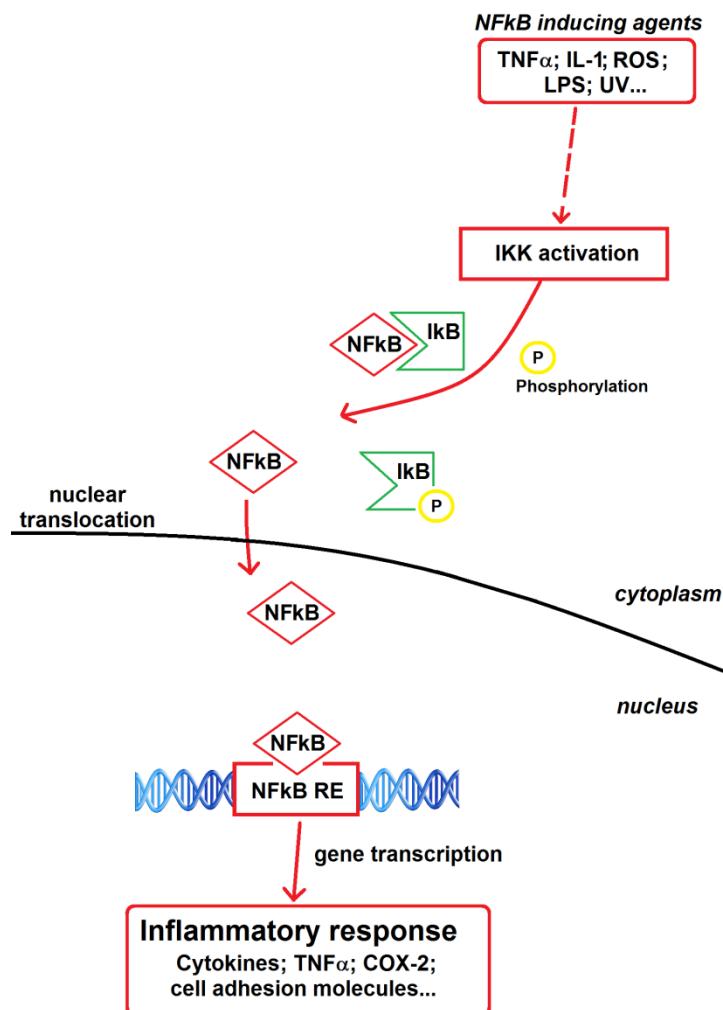


Figura 7: Via di segnale di NF- κ B.

Nel tessuto intestinale dei pazienti con IBD l'attivazione e l'espressione di NF- κ B sono elevate (Neurath et al., 1996) e l'aumento della sua attivazione è correlato alla severità dell'infiammazione intestinale (Rogler et al., 1998). L'incremento dell'espressione di NF- κ B in macrofagi mucosali di pazienti con IBD è correlato alla capacità di queste cellule di produrre citochine proinfiammatorie come TNF- α , IL-6 e IL-1 (Neurath et al., 1996), le quali sono direttamente coinvolte nei danni del tessuto mucosale intestinale che si osservano tipicamente nei pazienti con IBD (Pallone e Monteleone, 2001; Holtmann e Neurath, 2004). La produzione di citochine indotta da NF- κ B

stimola l'attivazione delle cellule immunitarie con conseguente esacerbazione dell'infiammazione intestinale. In modo particolare l'attivazione delle cellule Th1 indotta da IL-12, IL-23 e TNF- α svolge un ruolo fondamentale nella patogenesi delle IBD (Pallone e Monteleone, 2001; Neurath et al., 2002; Oppmann et al., 2000; Plevy et al., 1997). Inoltre, le citochine indotte da NF- κ B, come il TNF- α , sono anche in grado di potenziare a loro volta l'attivazione di questo fattore trascrizionale (Holtmann e Neurath, 2004). L'attivazione di NF- κ B indotta da IL-6 in cellule epiteliali del colon sono state associate ad un aumento dell'espressione di molecole di adesione intracellulari, le quali sono coinvolte nel reclutamento di neutrofili nel tessuto infiammato (Wang L. et al., 2003). Pertanto, NF- κ B essendo un regolatore delle risposte immunitarie e infiammatorie, è considerato un fattore trascrizionale chiave nello sviluppo, nel mantenimento e nell'esacerbazione delle IBD.

Dei fattori genetici causanti le IBD fanno parte geni e proteine che regolano lo stress ossidativo, lo stato redox cellulare e l'infiammazione. Nrf2 svolge un ruolo fondamentale nella funzionalità del tratto gastrointestinale ed è coinvolto direttamente nello sviluppo delle IBD. Nrf2 è un fattore trascrizionale redox sensibile che regola l'espressione di geni antiossidanti, detossificanti e citoprotettivi (Li e Kong, 2009). In condizioni fisiologiche Nrf2 risiede nel citoplasma legato a Keap1 e questo legame stimola la sua ubiquitinazione e degradazione proteosomale. In condizioni di stress i residui cisteinici di Keap1 vengono ossidati con conseguente interruzione del processo di ubiquitinazione, e traslocazione di Nrf2 libero da Keap1 nel nucleo. A livello nucleare Nrf2 forma degli eterodimeri con le proteine Maf e si lega all'elemento regolatore ARE nella regione promotrice di specifici geni bersaglio. Il legame di Nrf2 a specifiche sequenze attiva l'espressione di numerosi geni che comprendono proteine di risposta allo stress (HO-1), enzimi detossificanti (GST, NQO1), enzimi antiossidanti (GPx, SOD) (Niture et al., 2014) (Figura 8).

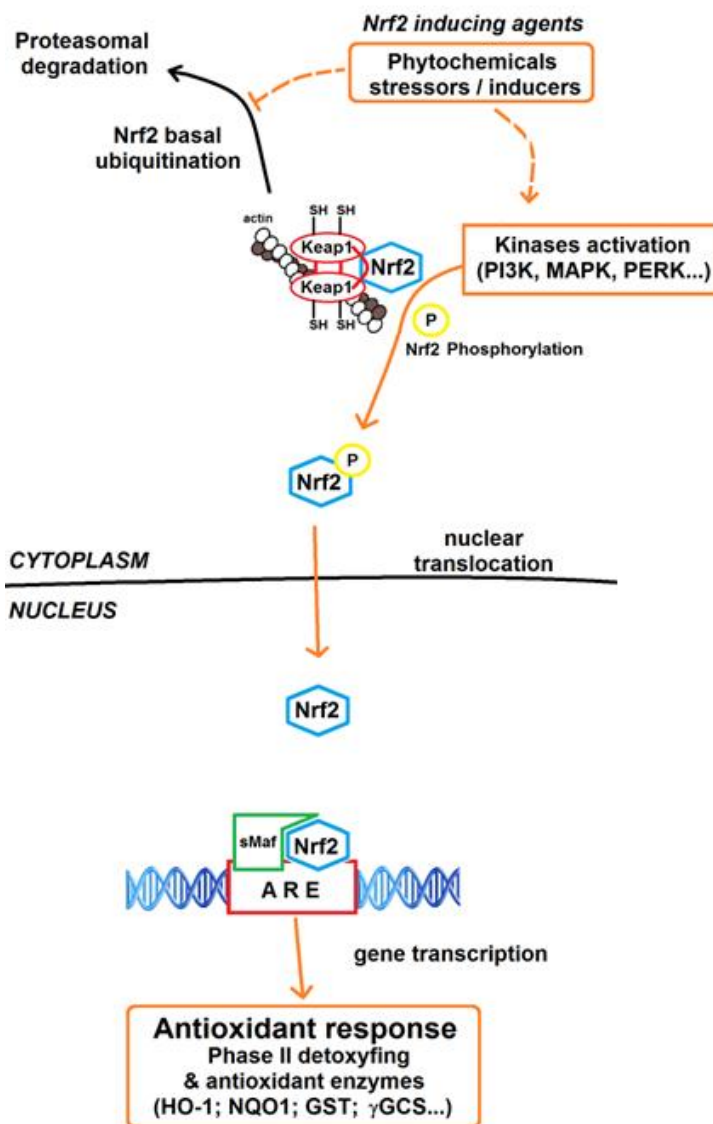


Figura 8. Via di segnale di Nrf2.

Diversi studi hanno confermato che l'attività di Nrf2 è coinvolta nel mantenimento dell'espressione delle proteine delle TJ e nell'assemblaggio delle membrane a livello intestinale, esofageo e nell'epitelio alveolare (Chen et al., 2014; Fan et al., 2013; Liu et al., 2017). L'attivazione del pathway di Nrf2 migliora la barriera epiteliale intestinale modulando l'espressione delle proteine occludine e ZO-1 (Liu et al., 2017), e in un modello di infiammazione del colon indotta da malattia renale cronica, il dh404, un attivatore di Nrf2, è capace di ripristinare i livelli di ZO-1, occludina e claudina-1 (Lau et al., 2015). Inoltre, in un modello murino di riperfusione ischemica intestinale, la somministrazione endovenosa di MitoQ, un antiossidante mitocondriale, migliora la disfunzione

della barriera intestinale stimolando la regolazione di geni dipendenti da Nrf2 (HO-1, NQO1 e γ -GCLC) (Hu et al., 2018).

Nelle cellule epiteliali esofagee Nrf2 è capace di legarsi alla regione promotrice della claudina-4 (Fan et al., 2013) e in topi privi di Nrf2 è stata osservata una riduzione dei livelli di claudina-4 (Chen et al., 2014). Probabilmente, il meccanismo con il quale viene inibita l'espressione di claudina-4 è correlato alla regolazione di occludina-1 che dipende da Nrf2 con conseguente modificazione dell'espressione di claudina-4 (Chen et al., 2014). Questi studi hanno dimostrato che il pathway di Nrf2 è coinvolto nella funzionalità del tratto gastrointestinale e pertanto può essere coinvolto nelle IBD. In un modello murino di topi Nrf2 knockout con UC indotta da DSS è stato osservato che questo gruppo era più suscettibile alla malattia (Khor et al., 2006). Difatti, rispetto ai gruppi wild type, nei gruppi Nrf2 knockout si è manifestato un peggioramento del sanguinamento rettale, accorciamento del colon e delle cripte, oltre all'aumento dell'infiltrazione di cellule infiammatorie, incremento dei livelli di citochine proinfiammatorie e minore espressione di enzimi antiossidanti. Molti studi hanno dimostrato il ruolo protettivo di Nrf2 in casi di UC grazie alla capacità di questo fattore trascrizionale di controllare i livelli sia di enzimi antiossidanti come HO-1 e NQO1 che di citochine proinfiammatorie come IL-6, IL-1 β e IL-17 (Khor et al., 2006, Durante, 2011; Awuh et al., 2015; Osburn et al., 2007).

Parte sperimentale

3.1 Introduzione

L'epitelio intestinale, oltre a svolgere un ruolo fondamentale nel trasporto di nutrienti, funge da barriera proteggendo l'organismo da sostanze dannose provenienti dall'ambiente esterno (Moore e Lemischka, 2006). Le cellule epiteliali intestinali svolgono la loro funzione di barriera grazie alla presenza delle TJ, le quali connettono le cellule tra di loro, regolano la permeabilità paracellulare e sono responsabili del mantenimento della polarità cellulare. Variazioni nell'organizzazione delle TJ determinano alterazioni nella funzionalità della barriera epiteliale con conseguente aumento della permeabilità intestinale e passaggio di batteri e sostanze che possono indurre l'attivazione della risposta immunitaria (Buckley e Turner, 2018). L'eziopatogenesi che porta a questa condizione di iperpermeabilità dell'epitelio intestinale, anche nota come "sindrome dell'intestino permeabile", è a tutt'oggi sconosciuta. Predisposizione genetica, stress, farmaci e patologie infiammatorie intestinali come le IBD (Zeissig et al., 2007; Paray et al., 2020), sono considerate oggi come possibili cause. Le IBD sono caratterizzate da un'inflammatione cronica immuno-mediata ed alterazione della funzionalità gastrointestinale (Michielan e D'Inca, 2015). I fattori coinvolti nello sviluppo delle IBD non sono ancora del tutto conosciuti, tuttavia recentemente è stato ipotizzato che, in soggetti geneticamente predisposti, stimoli ambientali possano scatenare la perdita dei meccanismi di controllo infiammatori a livello intestinale e la conseguente attivazione dell'immunità locale e la produzione di citochine proinfiammatorie (Sobczak et al., 2014). Citochine proinfiammatorie come il TNF- α svolgono un ruolo determinante nell'alterazione della barriera intestinale, nell'induzione dell'inflammatione e di conseguenza anche nello sviluppo delle IBD (Suzuki, 2013). Difatti, in soggetti con IBD sono stati rilevati elevati livelli di TNF- α sia nella mucosa intestinale che nel siero (Ngo et al., 2010; Thomson et al., 2012). Questa citochina proinfiammatoria stimola l'attivazione di NF- κ B, il principale fattore trascrizionale coinvolto nei processi infiammatori, il quale a sua volta induce l'espressione di numerosi geni infiammatori (Atreya et al., 2008). Inoltre, anche lo stress ossidativo indotto da ROS sembra essere tra i fattori scatenanti lo sviluppo e la progressione delle

IBD (Circu e Aw, 2012). Difatti a livello intestinale i ROS sono coinvolti nella regolazione di numerosi geni correlati alle risposte immunitarie innate ed adattative ed agiscono come modulatori di fattori trascrizionali redox-sensibili come NF- κ B e Nrf2 (Biasi et al., 2013). Sebbene NF- κ B a livello del tratto gastrointestinale sia coinvolto nell'omeostasi immunitaria e nella permeabilità intestinale (Pasparakis, 2012), un'iperattivazione di questo fattore trascrizionale indotta dai ROS causa incremento della trascrizione di geni codificanti citochine proinfiammatorie come IL-1, IL-6, IL-8, IL-16, TNF- α , e aumento della permeabilità intestinale (Pallone e Monteleone, 2001; Lingappan, 2018; Al-Sadi et al., 2016). Diversamente Nrf2 è coinvolto nella difesa cellulare contro i danni indotti da agenti ossidanti e ROS mediante regolazione dell'espressione di enzimi detossificanti di fase II e antiossidanti come HO-1, NQO1 e GCLC (Speciale et al., 2011b).

Le terapie attualmente utilizzate per le malattie gastrointestinali, purtroppo, causano effetti indesiderati e fallimenti terapeutici, pertanto recentemente sta crescendo l'interesse nei confronti di composti di origine vegetale capaci di migliorare la funzionalità intestinale e di prevenire e/o ridurre lo sviluppo di infiammazioni croniche intestinali.

I polifenoli, metaboliti secondari presenti in frutta e verdure, possiedono effetti benefici per la salute dell'intestino (Nunes et al., 2018; Li et al., 2020) grazie alle loro proprietà antiinfiammatorie, antiossidanti e immunomodulanti (Kaulmann e Bohn, 2016; Le Sage et al., 2017). Studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato la capacità dei polifenoli di migliorare la funzionalità della barriera intestinale, non solo modulando l'espressione e la produzione di proteine delle TJ, ma anche riducendo il rilascio di numerose citochine coinvolte nei processi infiammatori (Bernardi et al., 2020). Considerando quanto riportato, i polifenoli, avendo dimostrato proprietà benefiche nelle malattie gastrointestinali (Nunes et al., 2018; Li et al., 2020), potrebbero essere degli ottimi candidati per lo sviluppo di nuovi agenti terapeutici per la prevenzione o il trattamento delle malattie infiammatorie intestinali.

Cynara cardunculus L. subsp. *scolymus* è una pianta erbacea appartenete alla famiglia delle Asteraceae, tipicamente coltivata nel bacino del Mediterraneo e ampiamente utilizzata sia come

medicamento nella medicina tradizionale che come alimento (Ben Salem et al., 2015; Lattanzio et al., 2009). In particolare, le sue foglie sono ricche in polifenoli, tra cui cinarina, luteolina, acido clorogenico e loro derivati, i quali rappresentano la frazione di molecole bioattive con azione benefica per la salute umana grazie alle loro proprietà antiossidanti e antiinfiammatorie (Ben Salem et al., 2015; Zayed et al., 2020). Inoltre, sebbene le foglie rappresentino una notevole porzione dei sottoprodotti ottenuti dall'industria alimentare, essendo ricche in polifenoli potrebbero essere utilizzate come fonte di molecole bioattive (Pagano et al., 2016).

Pertanto, lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare *in vitro* i possibili meccanismi molecolari coinvolti negli effetti benefici di un estratto standardizzato e disponibile in commercio (Altilix[®] - Bionap, Italia), ricco in polifenoli, ottenuto dalle foglie di *Cynara cardunculus* L. subsp. *scolymus* (CCLE), su funzionalità e integrità della barriera intestinale e sull'infiammazione intestinale acuta in cellule epiteliali intestinali Caco-2.

Studi recenti hanno riportato una possibile correlazione tra l'attivazione del pathway AMPK/SIRT1 e l'effetto sul miglioramento dell'assemblaggio delle TJ (Li et al., 2021), e i polifenoli hanno dimostrato la capacità di attivare questa via di segnale (Wang et al., 2014; Pil Hwang et al., 2013; Li et al., 2021; Maugeri et al., 2021), pertanto inizialmente è stato studiato l'effetto di CCLE sulla funzionalità e l'integrità della barriera intestinale e la possibile modulazione del pathway AMPK/SIRT1. Inoltre, sono stati valutati i possibili effetti benefici di CCLE nei confronti dell'infiammazione intestinale acuta indotta da TNF- α (Speciale, Muscarà et al., 2022). In particolare, l'attenzione è stata focalizzata sugli effetti antiinfiammatori e antiossidanti mediati dalla modulazione dei pathway di NF- κ B e Nrf2.

3.2 Materiali

Nei nostri esperimenti è stato utilizzato un estratto standardizzato commercialmente disponibile (Altilix®, Bionap Srl) ottenuto dalle foglie di *Cynara cardunculus* (L.) [Asteraceae] (fonte tassonomica Kew Medicinal Plant Names Services - MPNS). Tale estratto è basato su foglie di *Cynara cardunculus* L. subsp. *scolymus* Hayek (CCLE) ed è arricchito in acido clorogenico, luteolina e loro derivati (10–12% di acido clorogenico e derivati, e 2–4% luteolina-7-glucoside e derivati). Di tale estratto è stata dimostrata l'efficacia relativamente a marker epatici e di rischio cardiovascolare in soggetti con sindrome metabolica in un trial clinico controllato randomizzato in doppio cieco (Trial Clinico N. NCT03444558) (Castellino et al., 2019).

Il dimetilsolfossido (DMSO) è stato acquistato da AppliChem (Darmstadt, Germania).

Il Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) è stato acquistato da PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ, USA).

Gli anticorpi anti- β -Actin, anti-Lamin B, anti-p-AMPK, anti-ZO-1, anti-claudin-1, anti-pIKK α/β e gli anticorpi secondari anti-rabbit e anti-mouse IgG sono stati acquistati dalla Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, USA).

Gli anticorpi anti-Nrf2, anti-COX-2, anti-occludin sono stati acquistati da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA).

L'anticorpo anti-NF- κ B p65 è stato acquistato da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA).

Le membrane di polivinildenfluoruro Hybond-P PVDF, il sistema ECL plus detection e le lastre fotografiche sono state acquistate dalla Amersham Biosciences, (Milano, Italia).

Il kit E.Z.N.A. Total RNA Kit I è stato acquistato da OMEGA bio-tek (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA).

Tutti gli altri reagenti, qualora non espressamente specificato; sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

3.3 Colture cellulari e trattamenti

Le cellule Caco-2 (*Cancer coli-2*), derivanti da adenocarcinoma colon-rettale umano, sono state sviluppate per la prima volta da Jorgen Fogh presso lo Sloan-Kettering Cancer Research Institute (USA) con lo scopo di studiare i meccanismi coinvolti nello sviluppo del cancro (Fogh et al. 1977). Queste cellule, sebbene di origine cancerosa, una volta raggiunta la confluenza hanno la capacità di differenziare spontaneamente in cellule intestinali esprimendo diverse caratteristiche morfologiche e biochimiche degli enterociti dell'intestino tenue. Le cellule crescendo formano un monostrato polarizzato e al termine del differenziamento presentano microvilli nella porzione apicale e la presenza di TJ tra le cellule adiacenti. Queste cellule sono pertanto ampiamente utilizzate come valido modello *in vitro* di barriera intestinale (Lea, 2015).

La linea cellulare Caco-2 è stata acquistata dall'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) e coltivata con terreno di coltura Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) supplementato con siero fetale bovino (FBS) al 10%, L-glutamina 4 mM, 1% di aminoacidi non essenziali, penicillina 100 U/mL e streptomina 100 µg/mL. Le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 95% e al 5% di CO₂, e il terreno di coltura è stato rinnovato ogni 2-3 giorni.

Per riprodurre al meglio le condizioni fisiologiche intestinali presenti *in vivo*, le cellule Caco-2 vengono coltivate su supporti permeabili (insert) permettendo il libero accesso di ioni e nutrienti attraverso il monostrato cellulare (Lea, 2015). L'utilizzo dei supporti permeabili permette di ottenere un monostrato completamente differenziato in cui il compartimento apicale (AP) rappresenta il lume intestinale mentre quello basolaterale (BL) mima la porzione dell'enterocita a contatto con il circolo sanguigno. Pertanto, per ottenere monostrati di cellule epiteliali polarizzate, le cellule Caco-2 sono state seminate (4×10^4 per cm²) su insert con filtri in policarbonato, posizionati su piastra (multiwell), aventi pori di dimensioni pari a 0,4 µm (Greiner Bio-One, Italia) e lasciate crescere per 18-21 giorni.

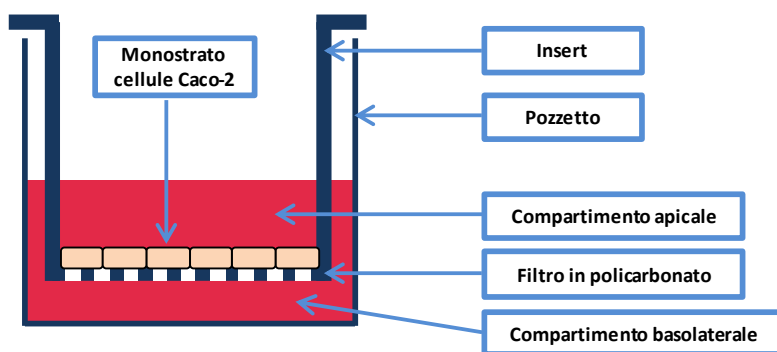


Figura 9. Struttura di un inserto posto in pozzetto

3.3.1 Modello per la valutazione della funzionalità e dell'integrità della barriera epiteliale intestinale durante il differenziamento

Per tutti gli esperimenti sulla funzionalità e sull'integrità della barriera intestinale, le cellule Caco-2 sono state trattate con CCLE (5-10-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), aggiunto nel compartimento AP, dalla semina fino al completo differenziamento (18 giorni) e l'aggiunta di CCLE è stata eseguita ad ogni cambio medium (2-3 giorni). CCLE è stato solubilizzato immediatamente prima di ogni trattamento in DMSO e la concentrazione finale di DMSO nel terreno di coltura è sempre stata uguale allo 0,02% (v/v). Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,02%) in DMEM sono state utilizzate come cellule controllo (CTR). Durante l'intero periodo di differenziamento l'integrità del monostrato cellulare è stata monitorata mediante la valutazione della resistenza elettrica trans-epiteliale (TEER) utilizzando un Millicell-ERS Voltohmmeter (Millipore, MA, USA) (Figura 10).

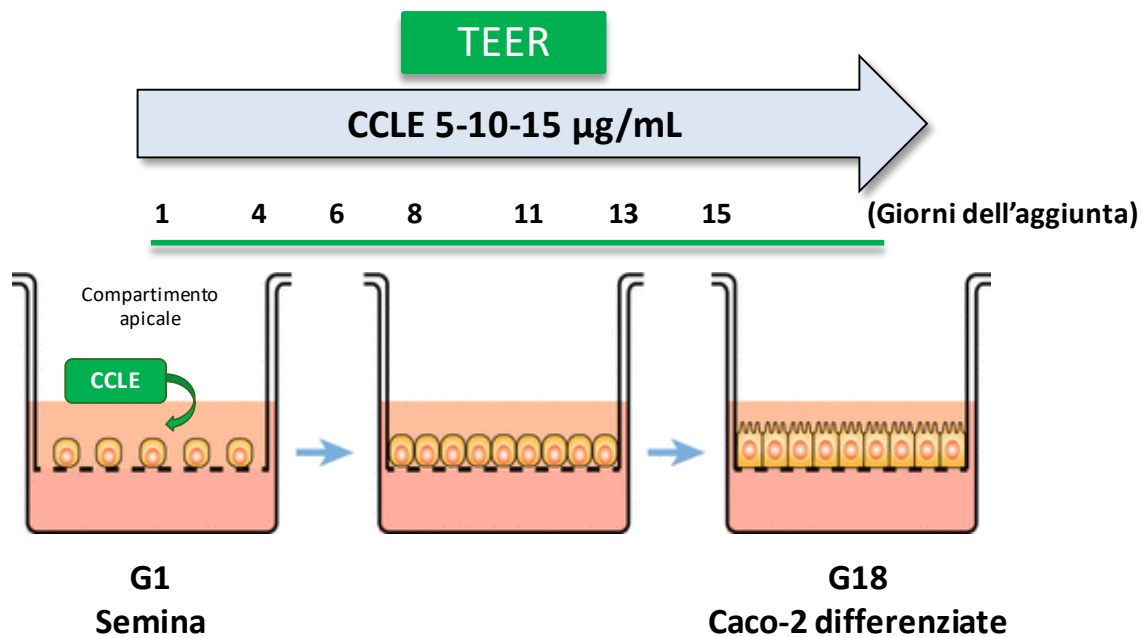


Figura 10. Rappresentazione schematica dei trattamenti condotti su cellule Caco-2

Alcuni esperimenti sono stati condotti in presenza di un inibitore selettivo di AMPK, Compund C (Comp. C) anche noto come Dorsomorphin, e tale molecola, solubilizzata in DMSO, è stata aggiunta nei compartimenti AP e BL ad ogni rinnovamento del terreno di coltura ad una concentrazione finale pari a 1 μ M. Allo scopo di dimostrare il coinvolgimento di AMPK nell'effetto di CCLE mediante l'utilizzo di Comp. C, è stato scelto di trattare le cellule con la concentrazione maggiore di CCLE (15 μ g/mL). Pertanto, per questi esperimenti le cellule sono state trattate con il Comp. C in presenza o meno di CCLE 15 μ g/mL dal raggiungimento della confluenza e per i successivi 7 giorni di differenziamento.

3.3.2 Modello di infiammazione intestinale acuta

Per tutti gli esperimenti di infiammazione intestinale acuta, il monostrato di cellule Caco-2 è stato ottenuto come descritto precedentemente (par. 3.3) e le cellule sono state coltivate per 18 giorni dopo il raggiungimento della confluenza al fine di ottenere un monostrato cellulare completamente differenziato (Ferrari et al., 2016; Ferrari et al., 2017). Alla fine del differenziamento, l'integrità del monostrato è stata valutata mediante TEER e per gli esperimenti sono stati utilizzati monostrati che presentavano valori di TEER $\geq 600 \Omega \times \text{cm}^2$.

I monostrati di cellule Caco-2 sono stati pretrattati per 24 ore con CCLE (5-10-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), aggiunto nel compartimento AP dell'insert. Anche in questo caso CCLE è stato solubilizzato in DMSO immediatamente prima di eseguire il trattamento e la concentrazione finale è sempre stata mantenuta uguale allo 0,02% (v/v). Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,02%) in DMEM sono state utilizzate come cellule CTR. Dopo 24 ore di trattamento, i monostrati sono stati lavati due volte con Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), e successivamente esposti per 6 ore a TNF- α 50 ng/mL aggiunto sia nel compartimento AP che nel BL dell'insert (Figura 11). La concentrazione 50 ng/mL del TNF- α , utilizzata per produrre un modello *in vitro* di infiammazione intestinale acuta, è stata scelta sulla base di esperimenti preliminari in cui è stata osservata una significativa riduzione dei livelli di TEER già dopo 3 ore di esposizione rispetto alle cellule CTR (Ferrari et al., 2016).

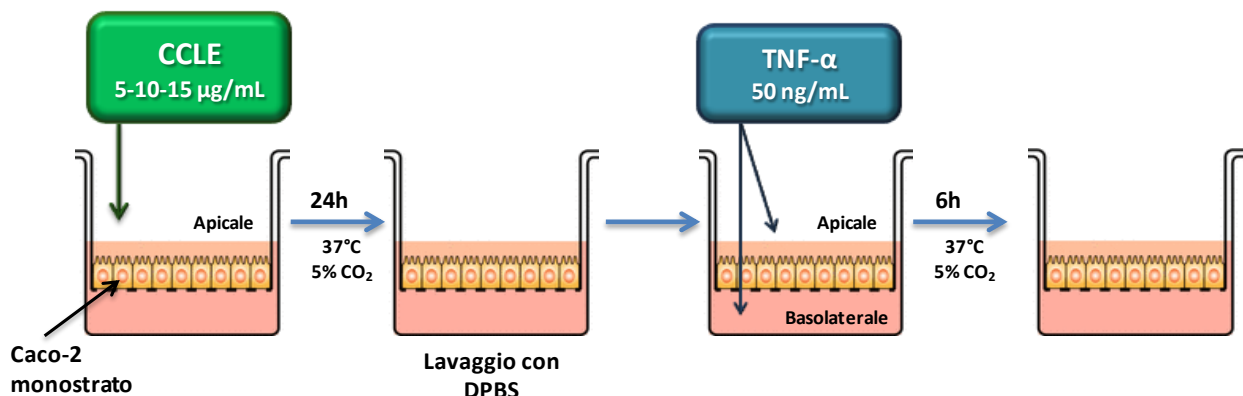


Figura 11. Rappresentazione schematica dei trattamenti e delle tempistiche di esposizione nel modello di infiammazione intestinale acuta.

3.4 Metodi

3.4.1 *Determinazione della TEER*

La TEER permette di monitorare la formazione del monostrato cellulare e, raggiunta la confluenza, il valore della TEER ci permette di valutare l'integrità della barriera epiteliale: maggiori saranno i valori di TEER maggiore sarà l'integrità del monostrato epiteliale. La misurazione è stata eseguita utilizzando un voltmetro Millicell-ERS (Millipore, MA, USA), costituito da una coppia di elettrodi Ag/AgCl. La TEER è espressa come $\text{ohms}\cdot\text{cm}^2$ ed è stata calcolata mediante la seguente formula:

$$\text{TEER } (\Omega\cdot\text{cm}^2) = (\mathbf{R}-\mathbf{R}_b)\cdot\mathbf{A}$$

R è la resistenza della membrana con le cellule;

R_b è la resistenza della membrana senza cellule;

A è l'area superficiale della membrana (1,12 cm²).

3.4.2 *Saggio di permeabilità paracellulare*

Il saggio della permeabilità paracellulare, mediante l'uso della fluoresceina sodica, permette di valutare l'integrità della barriera intestinale. La fluoresceina sodica è una molecola fluorescente e ciò permette di valutare la sua capacità di attraversamento del monostrato cellulare per via paracellulare mediante l'utilizzo di un fluorimetro. La quantità di fluoresceina presente nel compartimento BL, e quindi l'intensità di fluorescenza, sarà proporzionale alla quantità di fluoresceina che, dal compartimento AP, è riuscita ad attraversare il monostrato di cellule epiteliali intestinali mediante la via paracellulare. In seguito agli appropriati trattamenti (par. 3.3.1), è stata valutata la permeabilità paracellulare utilizzando come marcatore la fluoresceina sodica. Dopo un lavaggio di entrambi i compartimenti con DPBS, la fluoresceina sodica (100 μM) è stata solubilizzata in DMEM senza rosso-fenolo. 0,5 mL di questa soluzione sono stati aggiunti nel compartimento AP, mentre in quello BL è stato aggiunto 1 mL di DMEM senza rosso-fenolo. Al termine dell'incubazione di 1 ora a 37°C, sono state prelevate le soluzioni del compartimento BL e

la fluorescenza è stata determinata mediante l'utilizzo di un fluorimetro con lunghezze d'onda di eccitazione di 490 nm e di emissione di 514 nm.

La permeabilità apparente (P_{app}) è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

$$P_{app} \text{ (cm/s)} = (V/A \cdot C_0) \cdot (dC/dt)$$

V rappresenta il volume della soluzione nel compartimento BL;

A rappresenta l'area superficiale della membrana (1,12 cm²);

C₀ rappresenta la concentrazione iniziale di fluoresceina nel compartimento AP (μM);

dC/dt rappresenta la variazione della concentrazione di fluoresceina nel compartimento BL nel tempo (μM/s).

Ogni esperimento è stato condotto in triplicato e i risultati sono stati espressi come percentuale di P_{app} rispetto il controllo (%) (Park et al., 2015).

3.4.3 Saggio della fosfatasi alcalina *in situ*

Il saggio della fosfatasi alcalina permette di valutare il grado di differenziazione delle cellule epiteliali intestinali, poiché durante la differenziazione degli enterociti incrementa l'espressione e l'attività di diversi enzimi coinvolti nella digestione (Ferruzza et al., 2012). Per l'esecuzione del saggio è stato seguito il protocollo descritto da Ferruzza e coll. (2012) in cui viene descritto l'esecuzione del saggio *in situ* e non su omogenati. Il principale vantaggio di eseguire il saggio *in situ* su cellule, oltre alla rapidità e facilità di esecuzione, è la possibilità di eseguire una valutazione su cellule vive e ciò permette al substrato di avere un accesso diretto al sito attivo dell'enzima sulla membrana AP, il che aumenta la sensibilità del saggio evitando la distruzione delle cellule (Ferruzza et al., 2012). Il saggio sfrutta la capacità del p-nitrofenil fosfato (pNPP) di essere rapidamente convertito a p-nitrofenolo e fosfato inorganico dall'enzima fosfatasi alcalina, passando da incolore a giallo con un picco di assorbimento a 405 nm. L'intensità della colorazione sarà proporzionale alla presenza di p-nitrofenolo e quindi all'attività della fosfatasi alcalina.

Per l'esecuzione del saggio è stata preparata una soluzione con pNPP, pH 9,5 (2,5 mg/ml pNPP; 100 mM dietanolammina; 150 mM NaCl; 2 mM MgCl₂) e un buffer, pH 8,0 (10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl). Infine, è stato preparato il buffer di reazione miscelando la soluzione con pNPP e il buffer in rapporto 3:1 (v/v). Dopo i trattamenti (par. 3.3.1) sono stati eseguiti 2 lavaggi con DPBS sia nel compartimento AP che BL, ed è poi stato aggiunto 1 mL del buffer di reazione nel compartimento AP e 1 mL di DPBS nel compartimento BL. Dopo 5 min di incubazione a 37°C, 100 µL della soluzione di reazione sono stati prelevati dal compartimento AP, la reazione è stata bloccata mediante l'aggiunta di 50 µL di NaOH 0,5 M e l'assorbanza è stata registrata a 405 nm. Gli esperimenti sono stati ripetuti in triplicato e i risultati sono stati espressi come variazione rispetto al CTR.

3.4.4 Saggio del Calcium Switch

Il saggio del Calcium Switch è un metodo ampiamente impiegato che permette di valutare l'assemblaggio delle TJ in monostrati di cellule epiteliali intestinali (Wongkrasant et al., 2020; Pongkorpsakol et al., 2019; Zhang et al., 2006) e quindi la natura della barriera che regola la permeabilità paracellulare. Poiché la rimozione del Ca²⁺ dal terreno di coltura di cellule epiteliali intestinali causa destabilizzazione delle TJ, il saggio del *calcium switch* permette di mimare *in vitro* l'alterazione delle TJ e di studiare la capacità di specifiche molecole di ripristinarne l'integrità (Pongkorpsakol et al., 2021). In seguito agli appropriati trattamenti (par. 3.3.1), sono stati eseguiti 2 lavaggi con DPBS sia nel compartimento AP che BL e successivamente le cellule sono state coltivate con DMEM senza calcio contenente l'1% di BSA priva di acidi grassi liberi (FFA-free BSA: 0,5 mL AP e 1,5 mL BL) per 16 ore a 37°C in atmosfera umidificata e con il 5% di CO₂. Successivamente è stato aggiunto DMEM con calcio supplementato con FBS al 10%, L-glutamina 4 mM, 1% di aminoacidi non essenziali, penicillina 100 U/mL e streptomina 100 µg/mL, e la TEER è stata monitorata a diverse tempistiche (0, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 ore).

3.4.5 Estrazione dei lisati cellulari

3.4.5a Estrazione del lisato cellulare totale

In seguito ai vari trattamenti, le cellule sono state lavate con DPBS e dopo distacco mediante Tripsina/EDTA sono state raccolte in apposite provette da centrifuga. La sospensione cellulare è stata centrifugata a 2500 rpm per 5 min a 4°C e il pellet è stato lavato con DPBS. Dopo due centrifugazioni a 14000 x g per 3 min a 4°C, le cellule sono state lisate mediante l'utilizzo di una soluzione di lisi non denaturante composta da Tris HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, 1% Triton X-100, e EDTANa₂ 5 mM, contenente gli inibitori delle proteasi (leupeptina 1 µg/mL, benzamidina 1 mM, aprotinina 2 µg/mL) e DTT 1 mM. I campioni sono stati sottoposti a sonicazione per 1 min e posti in ghiaccio per 30 minuti al fine di garantire una totale estrazione delle proteine. Dopo centrifugazione a 12000 x g per 10 min il lisato è stato separato dai compartimenti cellulari, raccolto e conservato a -80°C fino al momento dell'uso. La determinazione del contenuto proteico è stata eseguita utilizzando il reagente di Bradford.

3.4.5b Estrazione dei lisati nucleari e citoplasmatici

Alla fine dei trattamenti le cellule sono state raccolte come descritto sopra (par. 3.4.3a) e lisate utilizzando 400 µL di una soluzione ipotonica costituita da HEPES 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM e glicerolo 5% pH 7,9, contenete gli inibitori delle proteasi (aprotinina 2 µg/mL, benzamidina 1 mM, leupeptina 2 µg/mL) e DTT 1 mM. I campioni sono stati posti in ghiaccio per 15 min e poi trattati con Igepal 0,6 % per 3 min a 4°C. Dopo centrifugazione a 13000 x g per 1 min a 4°C, il surnatante contenente il lisato citoplasmatico è stato raccolto in apposite provette da centrifuga e il pellet contenente i nuclei, dopo un lavaggio con DPBS, è stato trattato per 30 min a 4°C con 50 µL di una soluzione ipertonica composta da HEPES 20 mM, NaCl 400 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 1 mM, EDTA 0,1 mM, glicerolo 10% pH 7,9, contenente inibitori delle proteasi (aprotinina 2 µg/mL, benzamidina 1 mM, leupeptina 2 µg/mL) e DTT 1 mM. Dopo centrifugazione a 14000 x g per 1

min a 4°C, il surnatante rappresentante la frazione proteica nucleare è stato raccolto in apposite provette da centrifuga. I lisati nucleari e citoplasmatici sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'uso e la determinazione del contenuto proteico è stata eseguita utilizzando il reagente di Bradford.

3.4.6 Determinazione del contenuto proteico

Il contenuto proteico dei lisati è stato quantificato mediante il saggio colorimetrico di Bradford (Bradford, 1976) utilizzando l'albumina sierica bovina (BSA) come standard di riferimento. Il saggio di Bradford sfrutta il viraggio del colorante Coomassie Brilliant Blue, e quindi il suo picco di assorbimento quando si lega all'arginina e ai residui amminoacidici idrofobici presenti nelle proteine. Nella sua forma cationica, non legata, il reattivo è di colore verde-rosso, mentre nella sua forma anionica, legata, il reattivo vira al blu con un picco di assorbimento a 595 nm. 245 µL di reattivo sono stati aggiunti in ogni pozzetto di una multiwell da 96, sono stati aggiunti 5 µL di campione e dopo un'attesa di 10 min in agitazione, è stata letta l'assorbanza a 595 nm utilizzando uno spettrometro UV-Vis. L'incremento dell'assorbanza è proporzionale alla quantità di proteine presenti nei campioni e la quantità proteica è stata determinata con una retta di calibrazione ottenuta utilizzando l'albumina sierica bovina (BSA).

3.4.7 Immunoblotting

Per le analisi di immunoblotting 20 µg di lisato proteico per ogni campione sono stati denaturati in 4x SDS-PAGE sample buffer costituito da Tris-HCl 260 mM pH 8,0, 40% (v/v) di glicerolo, 9,2% (w/v) di SDS, 0,04% di blu di bromofenolo e 2-mercaptoetanololo come agente riducente. I campioni sono stati posti a 95°C per 5 min e sottoposti a separazione elettroforetica su gel di acrilamide/bisacrilamide (8-10-12%). Per la determinazione di p-AMPK, ZO-1, claudin-1, occludin, COX-2 sono stati utilizzati i lisati proteici totali, per NF-κB (p65) e Nrf2 sono stati utilizzati i lisati

nucleari, e per pIKK α/β i lisati citoplasmatici. Una volta separate, le proteine sono state trasferite su una membrana di polivinilidenfluoruro, tramite wet blotting. Per verificare il corretto trasferimento delle proteine, la membrana è stata colorata con una soluzione di Ponceau S (0,1% w/v di Ponceau S in acido acetico al 5%). La membrana è stata decolorata mediante lavaggi con TBS-T (Tris-base 10 Mm, NaCl 100 mM e 0,1% (v/v) di Tween-20), e i siti di legame residui sulla membrana sono stati bloccati mediante incubazione per almeno 1 ora a temperatura ambiente con una soluzione di TBS-T contenente il 5% (w/v) di blocking agent (nonfat milk powder). Le membrane sono state poi incubate per tutta la notte e in agitazione a 4°C con anticorpi primari specifici: rabbit anti-pAMPK monoclonal antibody (1:1000); rabbit anti-ZO-1 (1:1000) polyclonal antibody; rabbit anti-claudin-1 (1:2000) monoclonal antibody; mouse anti-occludin (1:200) monoclonal antibody; rabbit anti-NF- κ B p65 (1:1000) polyclonal antibody; rabbit anti-Nrf2 (1:200) polyclonal antibody; rabbit anti-Phospho-IKK α/β (Ser176/180) (1:1000) monoclonal antibody; mouse anti-COX-2 (1:200) monoclonal antibody; rabbit anti- β -Actin (1:6000) monoclonal antibody; rabbit anti-Lamin-b (1:1500) monoclonal antibody. Dopo 3 lavaggi da 10 minuti ciascuno con TBS-T per eliminare l'anticorpo primario non legato, le membrane sono state incubate per almeno 2 ore e in agitazione a 4°C con anticorpo secondario coniugato a perossidasi: anti-rabbit Ig (1:6000) e anti-mouse Ig (1:10000). La luminescenza è stata sviluppata mediante l'utilizzo di un sistema di rivelazione per chemiluminescenza (ECL plus Western Blotting Detection System) e rivelata con lastre fotografiche. L'analisi quantitativa è stata effettuata tramite densitometria utilizzando il software ImageJ. Il quantitativo di proteine caricato in ciascun pozzetto è stato confermato mediante colorazione con Ponceau e mediante le proteine housekeeping β -Actin e Lamin-b.

3.4.8 Valutazione dell'espressione genica

3.4.8a Estrazione dell'RNA

Per l'estrazione dell'RNA è stato utilizzato il kit E.Z.N.A. Total RNA Kit I (OMEGA bio-tek VWR) seguendo le istruzioni del produttore. Brevemente, in seguito agli appropriati trattamenti, le cellule sono state lisate con 350 μ L di una soluzione di TRK Buffer contenente il 2% di 2-mercaptoetanololo. Dopo aver aggiunto 350 μ L di EtOH al 70% in acqua DNase- e RNase-free, i campioni sono stati omogeneizzati impiegando aghi G21 sterili. L'mRNA è stato isolato grazie all'utilizzo di colonnine provviste di una membrana impaccata con cellulosa ricca di catene di oligo(dT). Le catene di oligo(dT) permettono di isolare il solo mRNA maturo da tutti gli altri RNA presenti nel campione grazie all'interazione specifica con le code poli(A) presenti nell'mRNA. Al termine dell'estrazione l'RNA è stato solubilizzato in 40 μ L di acqua DNase- e RNase-free.

3.4.8b Quantificazione dell'RNA

In seguito all'estrazione, la quantificazione dell'RNA è stata eseguita mediante l'utilizzo di Quant-iT RNA assay kit e fluorimetro QUBIT (Invitrogen, Milano, Italia) seguendo le istruzioni del produttore.

3.4.8c Sintesi del cDNA

Per sintetizzare il cDNA è stata effettuata una retrotrascrizione utilizzando la trascrittasi inversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus), una DNA polimerasi che è in grado di sintetizzare un filamento di DNA complementare a partire dall'mRNA stampo.

Seguendo le istruzioni del produttore, in una provetta DNase- e RNase-free sono stati aggiunti:

- 1 μL di deossinucleotidi trifosfato (dNTP) mix 10 mM
- 1 μL di Oligo(dT)₂₃ 70 μM
- Templato mRNA
- Acqua DNase- e RNase-free fino al raggiungimento di 10 μL di volume finale.

Questa miscela è stata incubata per 10 min a 70°C (fase di legame del primer Oligo(dT)) e successivamente sono stati aggiunti i seguenti componenti:

- 2 μL buffer 10X M-MLV trascrittasi inversa
- 1 μL M-MLV trascrittasi inversa
- 0,5 μL inibitore delle RNase (40 U/ μL)
- 6,5 μL acqua DNase- e RNase-free

I campioni sono stati incubati a 37°C per 50 min (fase di allungamento) e successivamente per 10 min a 94°C per denaturare la M-MLV trascrittasi inversa.

3.4.8d Real-time PCR

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è una tecnica ampiamente utilizzata per amplificare *in vitro* una specifica regione del DNA, partendo da quantità minime, in modo da ottenere una quantità sufficiente per l'analisi. La PCR si basa sulla capacità di utilizzare l'enzima DNA polimerasi per sintetizzare un nuovo filamento di DNA complementare (cDNA) al filamento stampo (*template*). Poiché la DNA polimerasi è in grado di aggiungere un nucleotide solo ad un preesistente gruppo 3'-OH, necessita di un primer al quale aggiungere il primo nucleotide. L'uso dei primer permette di

delimitare una specifica regione del template da amplificare e, al termine della reazione, questa specifica sequenza sarà amplificata in miliardi di copie (amplicon).

Le fasi della PCR consistono di 3 cicli che vengono ripetuti: denaturazione, appaiamento (o annealing), estensione. Durante la fase di denaturazione il campione viene riscaldato a 94°C affinché avvenga la separazione del doppio filamento. Nella fase di annealing i primer si appaiano alle sequenze complementari del DNA stampo. Nella fase di estensione, la Taq, una specifica DNA polimerasi termostabile ottenuta dal batterio *Thermus aquaticus*, catalizza l'estensione di filamenti in direzione 5'-3' a partire dai primer e appaiando gli appropriati dNTP. La tecnica Real-Time PCR permette di monitorare la quantità di amplicon durante ogni ciclo della PCR, ed è quindi un'analisi quantitativa (qPCR) che permette di determinare il numero di copie iniziali di template con elevata accuratezza e sensibilità. La quantificazione in tempo reale dell'amplificato è resa possibile mediante l'utilizzo di composti la cui fluorescenza emessa ad ogni ciclo di reazione è proporzionale alla quantità di amplificato.

Il SYBR Green è una sonda fluorescente che si lega in modo aspecifico al DNA ed emette una bassa fluorescenza quando non è legato al doppio filamento di DNA (dsDNA), ma quando si lega al dsDNA la fluorescenza aumenta di 10000 volte. La fluorescenza sarà proporzionale alla quantità di dsDNA presente e aumenta con l'amplificazione della sequenza bersaglio. Pertanto, per questi esperimenti la valutazione dell'espressione genica è stata eseguita utilizzando qPCR in real-time (Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System, CA, USA) con chimica SYBR green (SYBR green JumpStart™ Taq Ready Mix – Sigma). Ogni campione di cDNA (1 µL) è stato sottoposto ad amplificazione con l'utilizzo di appropriate coppie di primer (Tabella 1).

Tabella 1. Sequenze dei primer utilizzati nelle RT-PCR per i singoli geni.

	<i>Primer</i>		<i>Lunghezza Amplicon</i>	<i>T_m</i>	<i>Riferimenti</i>
18S rRNA	<i>Fwd</i>	5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3'	153 bp	84°C	Speciale, Muscarà et al., 2022
	<i>Rev</i>	5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3'			
SIRT1	<i>Fwd</i>	5'-CTT CAG GTC AAG GGA TGG TAT-3'	233 bp	81°C	Zhang et al., 2008
	<i>Rev</i>	5'-GCG TGT CTA TGT TCT GGG TAT-3'			
IL-8	<i>Fwd</i>	5'-ACT GAG AGT GAT TGA GAG TGG AC-3'	112 bp	82°C	Ferrari et al., 2017
	<i>Rev</i>	5'-AAC CCT CTG CAC CCA GTT TTC-3'			
GCLC	<i>Fwd</i>	5'-GGC ACA AGG ACG TTC TCA AGT-3'	79 bp	80°C	Primer Bank (ID:308199422c2) Wang e Seed, 2003
	<i>Rev</i>	5'-CAG ACA GGA CCA ACC GGA C-3'			
NQO1	<i>Fwd</i>	5'-AAG AGC ACT GAT CGT ACT GG-3'	172 bp	85°C	Speciale et al., 2011a
	<i>Rev</i>	5'-CTT CAG TTT ACC TGT GAT GTC C-3'			

Un campione contenente tutti i reattivi, ma senza cDNA, è stato utilizzato per verificare l'assenza di una eventuale contaminazione dei reattivi (NTC – No Template Control). Le reazioni sono state eseguite in triplicato e normalizzate con ROX, utilizzato come reference dye, per normalizzare le differenze di volume tra i pozzetti e permette quindi di correggere gli errori di pipettaggio.

In ogni provetta sono stati aggiunti i seguenti reagenti:

- 12,5 µL SYBR Green JumboStart Taq ReadyMix;
- ROX 1X;
- Forward Primer 0,2 µM;
- Reverse Primer 0,2 µM
- 1 µL di campione di cDNA precedentemente ottenuto mediante retrotrascrizione.

Per l'amplificazione sono stati effettuati 40 cicli ognuno costituito dai seguenti step:

- denaturazione a 94°C per 15 sec, annealing e estensione a 60°C per 1 min per l'amplificazione dei geni 18S rRNA, IL-8, GCLC, NQO1;

- denaturazione a 95°C per 15 sec, annealing a 57°C per 1 min e estensione a 72°C per 1 min per l'amplificazione del gene SIRT1.

Al termine dei cicli di amplificazione è stato effettuato uno step di dissociazione per valutare la possibile presenza di altri amplificati e per determinare la temperatura di melting (T_m) del prodotto amplificato. La T_m è caratteristica per ogni amplificato e corrisponde alla temperatura alla quale il 50% del DNA è denaturato.

3.4.8e Elaborazione post-analisi

I dati sono stati elaborati con il software SDS 1.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ed espressi come threshold cycle (C_t), il quale indica il ciclo della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza rilevato supera il valore soglia (threshold) e tale valore dipende dalla quantità di template presente all'inizio della reazione. La quantificazione relativa è stata calcolata normalizzando i valori di C_t di un gene target in un campione con i C_t di un gene di riferimento, ovvero un gene espresso costitutivamente in tutti i campioni che è necessario per normalizzare i dati rispetto alla quantità di template utilizzato. Inoltre, i valori di C_t dei campioni sono stati confrontati con quelli di un campione controllo (ovvero non trattato) allo scopo di determinare la *fold difference*, ovvero il cambiamento di espressione di un gene target in seguito ad un trattamento. Pertanto, sono stati ottenuti i valori di C_t di ogni gene bersaglio e sono stati normalizzati per i valori di C_t del gene di riferimento (18S rRNA) sia per il campione che per il controllo.

$$\Delta C_t (\text{campione}) = C_t \text{ gene bersaglio} - C_t \text{ gene di riferimento}$$

$$\Delta C_t (\text{controllo}) = C_t \text{ gene bersaglio} - C_t \text{ gene di riferimento}$$

Successivamente sono stati normalizzati i ΔC_t del campione con quelli del controllo:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ campione} - \Delta C_t \text{ controllo}$$

Infine, è stato calcolato il fold utilizzando la formula di Schmittgen e Livak (2008): $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

3.4.9 Valutazione dell'attività antiossidante totale intracellulare (TAA)

Successivamente ai trattamenti descritti nel paragrafo 3.3.2, le cellule sono state lavate 2 volte con DPBS freddo, staccate con Tripsina/EDTA, e raccolte in provette da centrifuga. Le cellule sono state centrifugate a 1500 rpm per 5 min e il pellet è stato risospeso in 1 mL di DPBS. Dopo un'ulteriore centrifugazione a 10000 rpm per 10 min a 4°C al pellet sono stati aggiunti 600 μ L di Triton X100 allo 0,05% e le cellule sono state omogeneizzate mediante sonicazione e incubate a 4°C per 30 min. Il lisato è stato raccolto dopo centrifugazione a 14000 rpm per 15 min a 4°C. La TAA è stata determinata valutando la decolorazione, indice di spegnimento, del radicale cationico 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) ($ABTS^{++}$), un cromogeno di colore verde-blu che presenta un picco di assorbimento a 734 nm. Questo saggio sfrutta la capacità delle sostanze antiossidanti di spegnere il radicale $ABTS^{++}$ (Miller e Rice-Evans, 1997) con conseguente valore di assorbanza minore: il grado di spegnimento è proporzionale alla concentrazione di antiossidanti presenti nel campione. Il radicale $ABTS^{++}$ è stato prodotto mediante ossidazione di $ABTS^+$ 1,7 mM con $K_2S_2O_8$ 4,3 mM in acqua (Dehimi et al., 2016). La miscela è stata incubata al buio e a temperatura ambiente per 12-16 ore prima dell'uso, e successivamente diluita con acqua fino ad ottenere un'assorbanza pari a $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm. Ogni campione è stato fatto reagire con 2 mL della miscela di reazione diluita, e dopo un'incubazione per 6 min al buio e a temperatura ambiente, è stata registrata l'assorbanza a 734 nm con uno spettrofotometro UV-Vis (Shimadzu, Japan). Una soluzione di Trolox è stata utilizzata come standard, i valori ottenuti per ogni campione sono stati confrontati con la curva concentrazione-risposta del Trolox e i risultati sono stati espressi come

equivalenti di Trolox per mg di proteine (Speciale, Muscarà et al., 2022). Ogni valutazione è stata condotta in triplicato e ripetuta tre volte.

3.4.10 Determinazione dei livelli intracellulari di glutatione

Le concentrazioni intracellulari di glutatione ridotto (GSH) sono state determinate mediante uHPLC LC-30AD Nexera accoppiato ad un rilevatore di fluorescenza RF-20A Prominence e un iniettore di campioni SIL 30-AC Nexera (Shimadzu, Milano, Italia). Al termine dei trattamenti (par. 3.3.2), le cellule sono state raccolte e lisate in 90 μ L di acqua fredda mediante 3 cicli di congelamento-scongelo e sonicazione per 3 min. I campioni sono stati centrifugati, e il surnatante è stato raccolto e utilizzato per la determinazione del contenuto di GSH mediante analisi HPLC dell'addotto GSH-*o*-ftalaldeide (OPA). Per la determinazione del GSH, le proteine contenute in 40 μ L del lisato proteico sono state fatte precipitare mediante aggiunta di 85 μ L di acido 5-sulfosalicilico (SSA) al 2,5% (*w/v*) e centrifugate. Il surnatante deproteinizzato è stato utilizzato per la derivatizzazione con OPA. La derivatizzazione con OPA è stata ottenuta miscelando 100 μ L del surnatante deproteinizzato con 100 μ L di OPA (5 mg/mL). Dopo incubazione di 1 min a temperatura ambiente i campioni sono stati neutralizzati e diluiti con l'aggiunta di 500 μ L di Na₂HPO₄ 100 mM a pH 7,0. Come descritto da Trombetta e colleghi (2010), è stata utilizzata una programmata di eluizione isocratica con 7,5% di CH₃OH e 92,5% di tampone acetato a pH 7,00 \pm 0,1, una colonna C18 Nucleodur Gravity 3 μ m e una Nucleosil guard column (Macherey-Nagel GmbH (Dueren, Germania). I parametri di fluorescenza utilizzati erano: λ ex = 340 nm e λ em = 420 nm. In queste condizioni, gli addotti derivatizzati di GSH sono stati eluiti al tempo di ritenzione 12,1. È stata ottenuta una curva standard del derivato di glutatione con concentrazioni fino a 100 μ M, ottenendo una regressione lineare con $r^2 = 0,995$. I risultati sono poi stati normalizzati con il contenuto proteico.

3.4.11 Valutazione dei livelli cellulari di ROS

Lo stato redox intracellulare è stato determinato mediante valutazione dei livelli intracellulari dei ROS. Come descritto da Speciale, Muscarà e colleghi (2022), la generazione dei ROS è stata misurata mediante l'utilizzo di una sonda fluorescente sensibile all'ossidazione: la dicloro-diidrofluorescina diacetato (DCFH-DA). Questa molecola non è fluorescente ma, una volta entrata all'interno della cellula, in presenza dei ROS viene idrolizzata e diossidata portando alla formazione della dicloro-fluorescina (DCF), molecola altamente fluorescente (Russo et al., 2005). Pertanto, l'intensità della fluorescenza intracellulare della DCF può essere utilizzata come indice per valutare le specie ossidanti presenti nella cellula. Dopo gli appropriati trattamenti (par. 3.3.2), le cellule sono state lavate per 3 volte con DPBS e incubate con una soluzione di DCFH-DA 50 μ M, posta a livello del compartimento AP per 30 min a 37°C e mantenute al buio. Le cellule trattate con H₂O₂ 50 μ M, un'ora prima di aggiungere la DCFH-DA, sono state utilizzate come controllo positivo. In seguito all'incubazione, le cellule sono state lavate per 3 volte con DPBS per eliminare l'eccesso di sonda e l'intensità di fluorescenza è stata misurata con un fluorimetro con λ ex = 485 nm e λ em = 530 nm. L'intensità di fluorescenza è proporzionale alla quantità di ROS. I livelli di ROS sono stati espressi come intensità di fluorescenza relativa di DCFH-DA e riportati come percentuale rispetto il CTR.

3.4.12 Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e ripetuti tre volte. I risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (SD) di tre esperimenti e sono stati analizzati statisticamente mediante ANOVA test a una-via o a due-vie, seguito da Tukey's HSD, utilizzando il software statistico ezANOVA (<http://www.sph.sc.edu/comd/rorden/ezanova/home.html>). Differenze tra i gruppi e i trattamenti sono state considerate significative per $p < 0,05$.

4. Risultati

4.1 Effetti di CCLE sulla funzionalità e differenziazione del monostrato epiteliale intestinale durante il processo di differenziamento

4.1.1 Il trattamento con CCLE migliora la funzionalità della barriera epiteliale intestinale

Allo scopo di valutare l'effetto di CCLE sulla funzionalità della barriera epiteliale intestinale, le cellule Caco-2 sono state trattate per 18 giorni, dalla semina fino al completo differenziamento, con diverse concentrazioni di CCLE (5-10-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e la TEER, marker di funzionalità epiteliale, è stata misurata durante tutto il periodo di differenziamento. I risultati hanno dimostrato che CCLE è stato capace di migliorare la funzionalità della barriera epiteliale. Difatti, al 18° giorno, i monostrati di cellule Caco-2 trattate con CCLE presentavano valori di TEER significativamente maggiori rispetto alle cellule CTR. Questo incremento dei valori di TEER, sebbene più evidente nelle cellule trattate con le concentrazioni maggiori di CCLE (10 e 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), era già significativo nelle cellule trattate con la concentrazione più bassa (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 12).

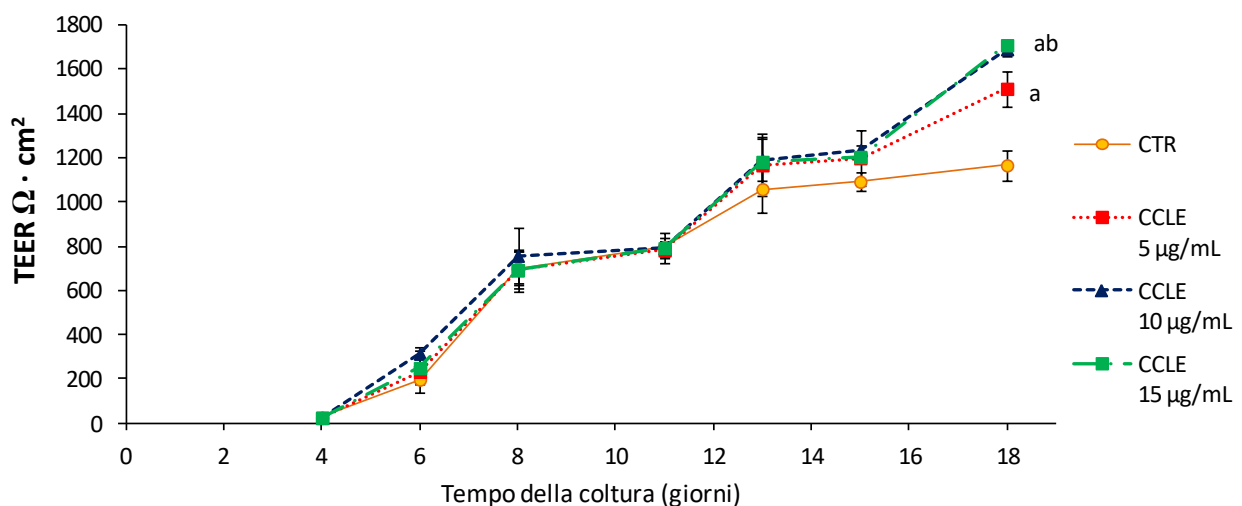


Figura 12. Variazioni della resistenza elettrica transepiteliale (TEER) durante il differenziamento. Le cellule Caco-2 sono state trattate dalla semina fino al completo differenziamento con CCLE (5-10-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e la TEER è stata misurata durante l'intero periodo. Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,02%) sono state utilizzate come CTR. I risultati sono espressi come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. ^a $p < 0,05$ vs CTR; ^b $p < 0,05$ vs CCLE 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Alla fine del periodo di differenziamento, è stato inoltre valutato l'effetto di CCLE sull'integrità della barriera intestinale mediante valutazione della permeabilità paracellulare. Sulla base dei risultati ottenuti, come mostrato dal decremento della permeabilità paracellulare alla fluoresceina in cellule trattate con l'estratto, il trattamento con CCLE è stato capace di incrementare l'integrità del monostrato cellulare, e tale effetto è stato osservato a tutte le concentrazioni testate (Figura 13). Dunque, i dati ottenuti dalla TEER e dalla permeabilità paracellulare hanno dimostrato che il trattamento delle cellule Caco-2 con CCLE ha determinato un miglioramento della funzionalità e dell'integrità della barriera epiteliale intestinale.

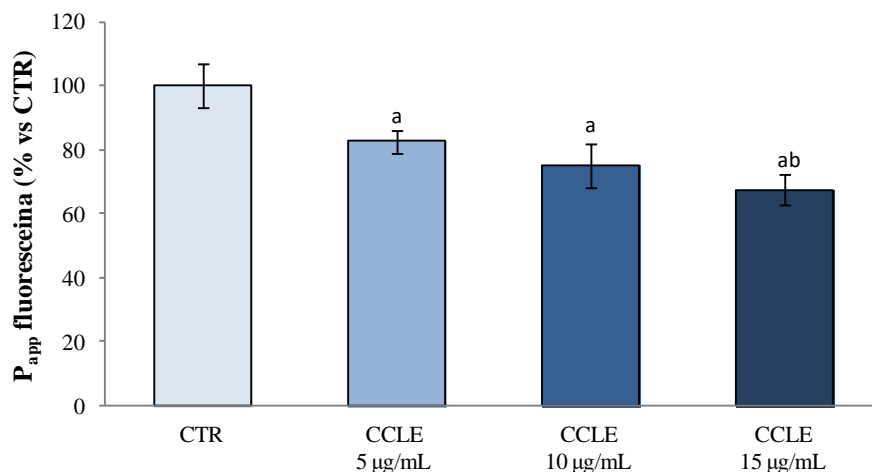


Figura 13. Permeabilità paracellulare alla fluoresceina. Le cellule Caco-2 sono state trattate durante tutta la fase di differenziamento con CCLE (5-10-15 µg/mL) e alla fine dei trattamenti è stata misurata la permeabilità paracellulare alla fluoresceina. Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,02%) sono state utilizzate come controllo (CTR). I risultati sono riportati come percentuale di P_{app} rispetto al controllo (%) ed espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. ^a $p < 0,05$ vs CTR; ^b $p < 0,05$ vs CCLE 5 µg/mL.

4.1.2 CCLE stimola il differenziamento delle cellule epiteliali intestinali e l'assemblaggio delle TJ

E' noto che la fosfatasi alcalina, una glicoproteina della membrana citoplasmatica, sia coinvolta nella defosforilazione proteica (Chan e Stinson, 1986; Anagnostou et al., 1996; Scheibe et al., 2000) e che l'equilibrio tra fosforilazione e defosforilazione delle proteine svolga un ruolo fondamentale nella regolazione di numerose funzioni cellulari come la proliferazione e differenziazione (Nonoyama et al., 2021; Suzuki et al., 1999; Anagnostou et al., 1996). L'aumento dell'attività della fosfatasi alcalina è stato associato all'aumento dell'espressione delle TJ (Liu et al., 2016) durante il processo di differenziazione delle cellule staminali intestinali in enterociti (Ichikawa-Tomikawa et al., 2011). Per questo motivo, la fosfatasi alcalina viene considerata un marker di differenziazione epiteliale.

I polifenoli sembrerebbero regolare l'attività della fosfatasi alcalina (Negrão et al., 2006; Zhou et al., 2016). In particolare, è stato osservato che l'acido clorogenico possiede la capacità di incrementare l'attività di tale enzima, e di conseguenza ha un impatto positivo nel miglioramento della permeabilità intestinale (Zhou et al., 2016). Sulla base di queste osservazioni, è stato valutato l'effetto di CCLE, ricco in polifenoli, sull'attività della fosfatasi alcalina in cellule Caco-2. Le cellule sono state trattate durante l'intero periodo di differenziamento con CCLE a concentrazioni 5, 10 e 15 µg/mL, e successivamente è stata valutata l'attività della fosfatasi alcalina. Come illustrato in figura 14, CCLE ha indotto un incremento dell'attività di questo enzima. Sebbene il trattamento con la concentrazione 5 µg/mL non abbia determinato alcuna variazione significativa, i trattamenti eseguiti con concentrazioni maggiori (10 e 15 µg/mL) hanno entrambi indotto un notevole e significativo incremento dell'attività della fosfatasi alcalina, dimostrando ancora una volta l'effetto positivo di CCLE sul differenziamento del monostrato epiteliale intestinale.

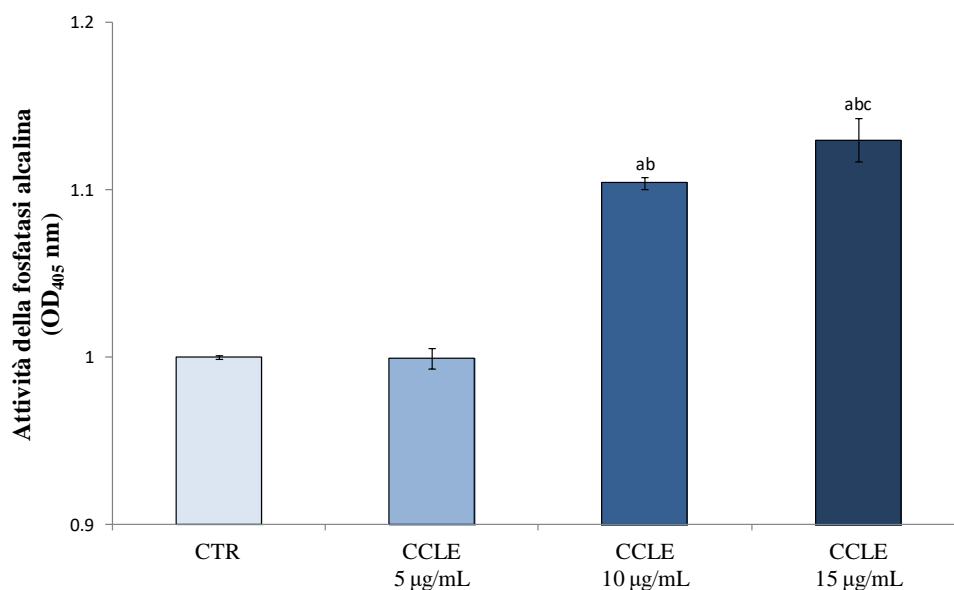


Figura 14. Attività della fosfatasi alcalina nelle cellule Caco-2. Le cellule Caco-2 sono state trattate durante tutta la fase del differenziamento con CCLE (5-10-15 µg/mL) e alla fine dei trattamenti è stata valutata l'attività della fosfatasi alcalina. Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,02%) sono state utilizzate come controllo (CTR). I risultati sono riportati come variazione rispetto al controllo ed espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. ^a $p < 0,05$ vs. CTR; ^b $p < 0,05$ vs. CCLE 5 µg/mL; ^c $p < 0,05$ vs. CCLE 10 µg/mL.

Le proteine delle TJ svolgono un importante ruolo nella regolazione della permeabilità paracellulare e nella funzionalità della barriera epiteliale intestinale. Poiché le TJ si sviluppano durante il processo di differenziazione, molecole che migliorano la differenziazione delle cellule epiteliali intestinali potrebbero essere degli ottimi candidati per migliorare la funzionalità e la salute dell'epitelio intestinale (Sun e Zhu, 2017). Al fine di valutare l'effetto di CCLE nei confronti dell'espressione delle TJ, sono stati valutati i livelli proteici di claudina-1, occludina e ZO-1.

I risultati hanno dimostrato la capacità di CCLE di incrementare i livelli di queste proteine. In particolare, l'aumento dei livelli di claudina-1 e occludina è stato osservato in cellule trattate con concentrazioni 10 e 15 µg/mL di CCLE, mentre i livelli proteici di ZO-1, proteina coinvolta nell'assemblaggio e nella stabilizzazione delle TJ, si sono dimostrati maggiori in cellule trattate con CCLE a tutte le concentrazioni testate (Figura 15).

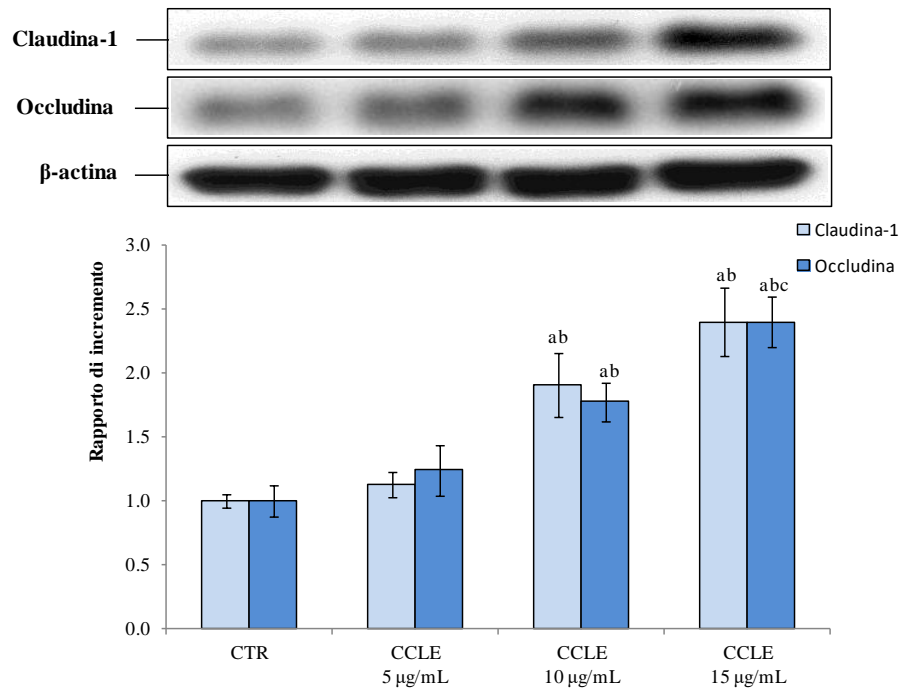
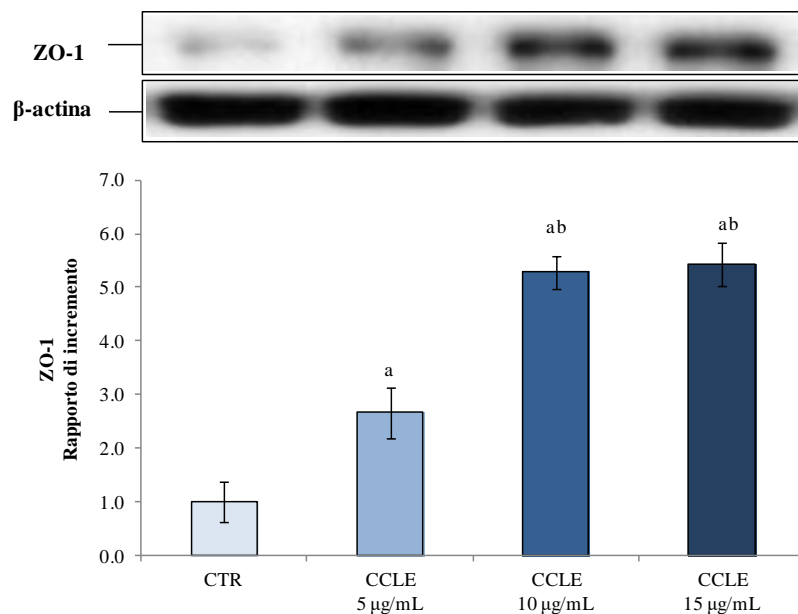
A**B**

Figura 15. Livelli delle proteine delle TJ. Le cellule Caco-2 sono state trattate durante tutta la fase di differenziamento con CCLE (5-10-15 μ g/mL) e alla fine dei trattamenti sono stati valutati i livelli proteici di (A) claudina-1, (A) occludina e (B) ZO-1 nei lisati proteici totali. Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,02%) sono state utilizzate come controllo (CTR). I risultati della densitometria sono stati normalizzati con i corrispondenti valori di β -actina, riportati come rapporto di incremento rispetto al controllo ed espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. ^a $p < 0,05$ vs. CTR; ^b $p < 0,05$ vs. CCL 5 μ g/mL; ^c $p < 0,05$ vs. CCL 10 μ g/mL.

Il corretto assemblaggio delle proteine delle TJ richiede concentrazioni extracellulari ottimali del Ca^{2+} che interagisce direttamente e stabilizza le TJ (Pongkorpsakol et al., 2021). Per la valutazione dell'effetto di CCLE sulla stabilizzazione delle TJ, le cellule Caco-2 sono state trattate dalla semina fino al completo differenziamento con CCLE (5-10-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e successivamente è stato eseguito il saggio del *calcium switch*. In seguito al ripristino del Ca^{2+} in cellule trattate con CCLE è stato rilevato un miglioramento dei valori di TEER rispetto alle cellule controllo già dopo 2 ore a tutte le concentrazioni testate e questo aumento rispetto alle cellule controllo è stato osservato fino a 10 ore dopo il ripristino del Ca^{2+} . Dopo 6 ore dal ripristino del Ca^{2+} , l'incremento dei valori di TEER nelle cellule trattate con CCLE era di circa il doppio rispetto alle cellule controllo (Figura 16).

Dunque, questi risultati riflettono la capacità di CCLE di favorire un ripristino più rapido dell'assemblaggio delle proteine delle TJ che si riflette in un miglioramento della funzionalità della barriera epiteliale intestinale.

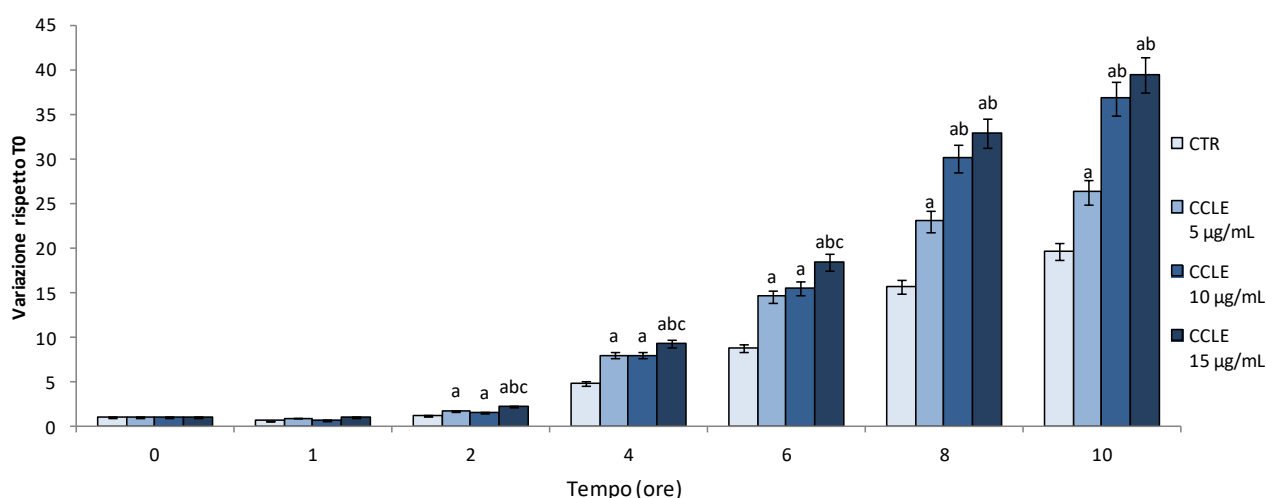


Figura 16. Calcium switch assay: andamento temporale della funzionalità del monostrato epiteliale dopo ripristino del Ca^{2+} . Le cellule Caco-2 sono state trattate fino al completo differenziamento con CCLE (5-10-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Al termine dei trattamenti sono state private del Ca^{2+} per 16 ore e dopo il ripristino del Ca^{2+} sono stati misurati i valori di TEER. Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,02%) sono state utilizzate come controllo (CTR). I risultati sono riportati come variazione rispetto i valori al tempo 0 ed espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. ^a $p < 0,05$ vs. CTR della stessa tempistica; ^b $p < 0,05$ vs. CCLE 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ della stessa tempistica; ^c $p < 0,05$ vs. CCLE 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ della stessa tempistica.

4.1.3 CCLE promuove l'attivazione del pathway AMPK/SIRT1

Recentemente è stato osservato che l'attivazione di AMPK indotta dai polifenoli migliora le giunzioni apicali epiteliali e protegge la barriera intestinale dagli stress ambientali (Peng et al., 2009; Sun et al., 2018a; Wang et al., 2016), mentre l'inibizione di AMPK causata da disordini metabolici è correlata all'alterazione della funzionalità della barriera epiteliale (Kahn et al., 2005; Meddings, 2008). Difatti, AMPK è in grado di promuovere la differenziazione delle cellule epiteliali intestinali e la funzionalità della barriera intestinale (Sun et al., 2017; Sun et al., 2018a; Sun et al., 2018b).

AMPK è una serina/treonina chinasi che regola l'omeostasi energetica mediante promozione della sintesi di ATP e ripristino energetico nel momento in cui il rapporto AMP/ATP è elevato (Kahn et al., 2005). AMPK è strutturalmente composta da 3 subunità: α catalitica, β strutturale e γ regolatoria. In condizione di elevati livelli di AMP, la subunità γ si lega all'AMP e tale legame rende AMPK un miglior substrato per la fosforilazione indotta dalla chinasi epatica B (*liver kinase B1* - LKB1) a livello della Thr172 nella subunità catalitica α , e inoltre ne inibisce la sua defosforilazione (Oakhill et al., 2011; Ross et al., 2016; Davies et al., 1995). L'attivazione di AMPK può anche essere indotta da elevati livelli cellulari di Ca^{2+} , i quali conducono alla fosforilazione di Thr172 operata dalla chinasi- β della proteina chinasi Ca^{2+} /calmodulina dipendente (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta* - CaMKK β) (Fujiwara et al., 2016). Di contro, la defosforilazione di AMPK è indotta dalla proteina fosfatasi 2C α (*protein phosphatase 2C alpha* - PP-2C α). L'attivazione di AMPK è influenzata da numerosi fattori fisiologici come ormoni, citochine e sostanze nutritive, ma anche da condizioni patologiche come l'invecchiamento, la sindrome metabolica, tumori e infiammazioni croniche (Steinberg e Kemp, 2009).

Pertanto, allo scopo di chiarire i meccanismi alla base dell'effetto di CCLE sulla stimolazione del differenziamento delle cellule epiteliali intestinali, e quindi dell'effetto benefico di questo estratto sulla funzionalità della barriera epiteliale intestinale, è stata valutata, alla fine del differenziamento

su cellule Caco-2, l'attivazione di AMPK. Come osservato in figura 17, il trattamento con CCLE, a tutte le concentrazioni testate e in modo dose dipendente, ha indotto un notevole e significativo incremento dei livelli proteici di AMPK fosforilato/attivato (p-AMPK).

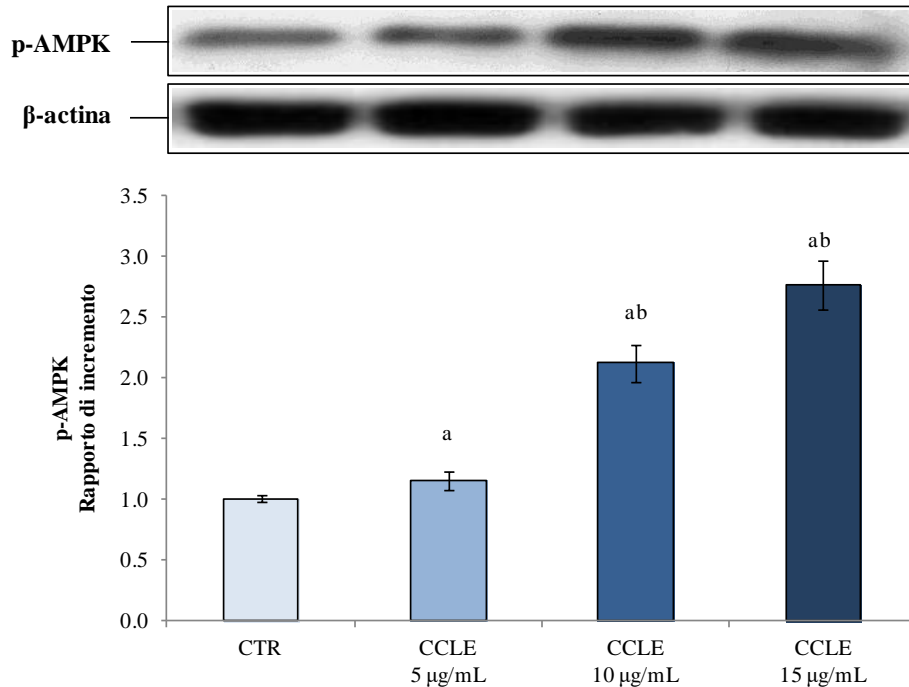


Figura 17. Livelli proteici di AMPK attivato (p-AMPK). Le cellule Caco-2 sono state trattate durante tutta la fase del differenziamento con CCLE (5-10-15 μg/mL) e alla fine dei trattamenti sono stati valutati i livelli proteici di p-AMPK nei lisati proteici totali. Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,02%) sono state utilizzate come controllo (CTR). I risultati della densitometria, normalizzati con i corrispondenti valori di β-actina, sono riportati come rapporto di incremento rispetto al controllo ed espressi come media ± SD di tre esperimenti indipendenti. ^a*p* < 0,05 vs CTR; ^b*p* < 0,05 vs concentrazioni più basse di CCLE.

Inoltre, per confermare il coinvolgimento di AMPK nell'effetto benefico di CCLE sull'espressione delle TJ, le cellule Caco-2 sono state trattate dal raggiungimento della confluenza e per i successivi 7 giorni con un inibitore irreversibile di AMPK, Compound C (Comp. C, 1 μM). I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'effetto benefico di CCLE è dovuto alla sua capacità di attivare AMPK e che la sua attivazione è essenziale per la corretta espressione delle TJ. Difatti, come osservato in figura 18, il Comp. C inibendo l'attivazione di AMPK ha determinato una riduzione dei livelli proteici basali di occludina e, soprattutto, ha bloccato la capacità di CCLE di aumentare i livelli di questa

proteina delle TJ. Dunque, questi risultati hanno dimostrato che l'effetto benefico di CCLE sulla stimolazione della differenziazione delle cellule epiteliali intestinale e sulla funzionalità della barriera epiteliale è correlato alla sua capacità di attivare AMPK.

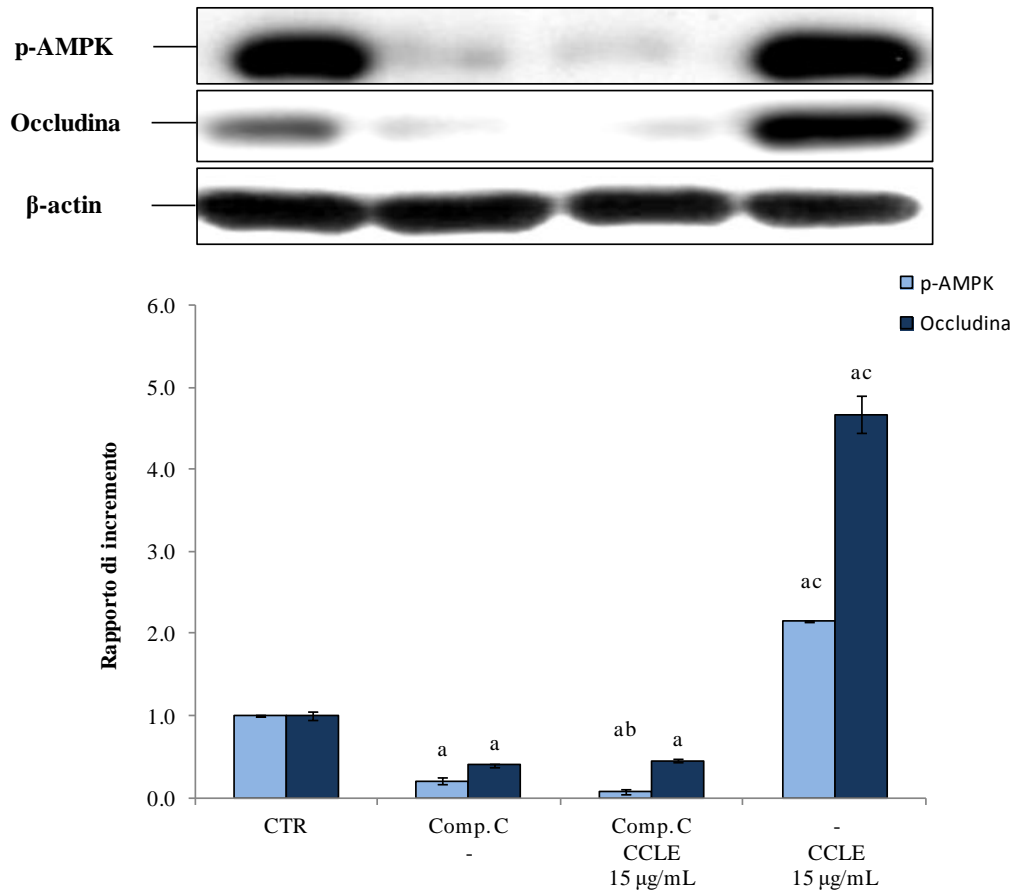


Figura 18. Livelli proteici di p-AMPK e occludina in presenza di Compound C. Le cellule Caco-2 sono state trattate dalla semina fino ai successivi 10 giorni con CCLE (15 μ g/mL) e/o con il Comp. C (1 μ M) dal raggiungimento della confluenza e per i successivi 7 giorni. Alla fine dei trattamenti sono stati valutati i livelli proteici di p-AMPK e occludina utilizzando i lisati proteici totali. Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,02%) sono state utilizzate come controllo (CTR). I risultati della densitometria sono riportati come rapporto di incremento rispetto al controllo ed espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. I valori d'intensità di p-AMPK e occludina sono stati normalizzati con i corrispondenti valori di β -actina. ^a $p < 0,05$ vs CTR; ^b $p < 0,05$ vs Comp. C; ^c $p < 0,05$ vs Comp. C + CCLE 15 μ g/mL.

È stato evidenziato che l'attivazione/fosforilazione di AMPK è correlata all'induzione della proteina effettrice a valle sirtuina-1 deacetilasi NAD-dipendente (SIRT1, NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1), un enzima che regola l'omeostasi metabolica (Paraíso et al., 2019; Manna et al., 2017; Salomone et al., 2017; Chalkiadaki e Guarente, 2012). Diversi studi suggeriscono che l'attivazione di SIRT1 sia modulata dall'azione di AMPK.

AMPK, incrementando la disponibilità di NAD⁺ (Cantó et al., 2009; Fulco et al., 2008) favorisce l'azione di SIRT1, attivando direttamente SIRT1 mediante fosforilazione (Nin et al., 2012). Inoltre, gli effetti protettivi a livello della barriera intestinale, dovuti all'attivazione di AMPK sembrerebbero essere dipendenti dall'attivazione di SIRT1 (Deng et al., 2018; Fu et al., 2019; Ren et al., 2020; Jang et al., 2019). Difatti, numerose evidenze suggeriscono che SIRT1, a sua volta, regola l'attivazione di AMPK fungendo da modulatore a monte di questa chinasi (Kulkarni e Cantó, 2015) deacetilando LKB1 (Lan et al., 2008).

Data la rilevante importanza di AMPK nella regolazione delle TJ e del coinvolgimento dell'attività di SIRT1, è stato valutato l'effetto di CCLE nei confronti dell'espressione genica di SIRT1 su cellule Caco-2. In cellule trattate con CCLE dalla semina fino al completo differenziamento è stato osservato un significativo incremento dell'espressione genica di SIRT1 a tutte le concentrazioni testate (Figura 19). Questi dati, in accordo con i livelli proteici di p-AMPK precedentemente descritti, dimostrano l'effetto benefico di CCLE sull'epitelio intestinale attraverso l'attivazione del pathway AMPK/SIRT1.

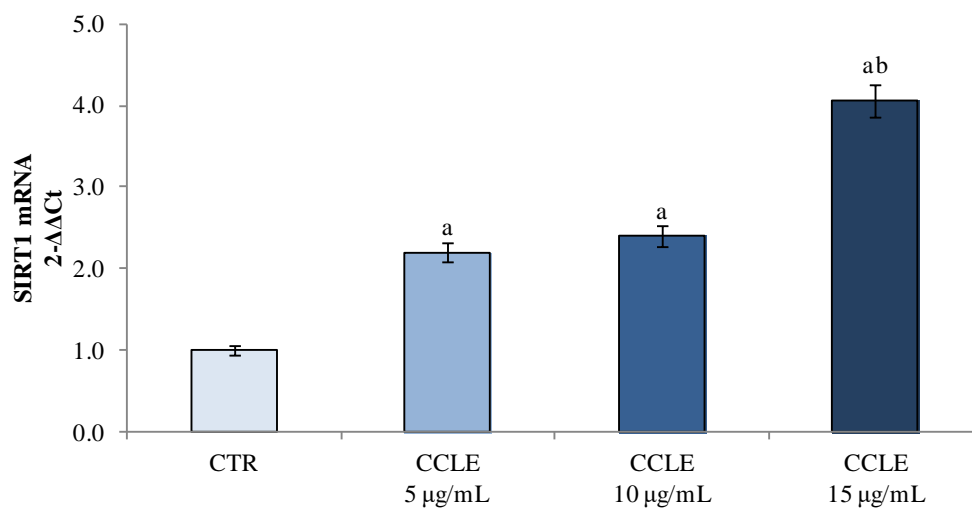


Figura 19. Espressione genica di SIRT1. Le cellule Caco-2 sono state trattate dalla semina fino al completo differenziamento con CCLE (5-10-15 $\mu\text{g/mL}$). Le cellule trattate con il solo veicolo (DMSO 0,02%) sono state utilizzate come controllo (CTR). I valori sono espressi come $2^{-\Delta\Delta C_t}$ normalizzati rispetto al controllo. L'rRNA 18S è stato utilizzato come gene housekeeping. ^a $p < 0,05$ vs CTR; ^b $p < 0,05$ vs concentrazioni più basse di CCLE.

4.2 Effetti di CCLE contro l'infiammazione intestinale indotta da TNF- α

4.2.1 Effetto protettivo di CCLE sull'attivazione del pathway NF- κ B indotta da TNF- α

NF- κ B è un fattore trascrizionale pleiotropico ed il principale regolatore coinvolto nella trascrizione di geni modulanti l'infiammazione. La sua forma più comune nell'uomo è un eterodimero composto dalle subunità p65 e p50 (Bernotti et al., 2003), e la subunità p65 attiva la trascrizione di geni proinfiammatori. In condizioni basali, i dimeri inattivi di NF- κ B risiedono nel citoplasma trattenuti grazie al legame con le proteine inibitrici I κ B. In seguito a stimoli quali LPS, virus e citochine proinfiammatorie come TNF- α o IL-1, viene attivato il complesso IKK, il quale è composto dalle subunità catalitiche IKK α e IKK β e dalla subunità regolatoria IKK γ (Karin e Greten, 2005). Una volta attivato il complesso IKK, questo è in grado di fosforilare le proteine I κ B permettendo il rilascio di NF- κ B che sarà libero di traslocare nel nucleo e modulare la trascrizione di numerosi geni (Hayden e Ghosh, 2004).

Per chiarire l'effetto di CCLE nei confronti della risposta infiammatoria è stata valutata l'attivazione del pathway infiammatorio di NF- κ B determinando la traslocazione nucleare di p65 mediante la tecnica del Western blot. Come osservato dall'aumento dei livelli di p65 nella frazione nucleare di cellule Caco-2 esposte a TNF- α 50 ng/mL, l'esposizione al TNF- α induce l'attivazione del pathway di NF- κ B (Figura 20 A). Il pretrattamento con CCLE ha soppresso significativamente l'attivazione del pathway infiammatorio indotta da TNF- α , riducendo i livelli nucleari di p65 ai valori rilevati in cellule controllo. Inoltre, in cellule pretrattate per 24 ore con CCLE 15 μ g/mL prima dell'esposizione al TNF- α , sono stati osservati livelli nucleari di NF- κ B significativamente minori rispetto alle cellule controllo. Il pretrattamento con solo CCLE non ha influenzato invece i livelli nucleari basali di p65.

Dal momento che la traslocazione di NF- κ B dipende dall'attivazione del complesso IKK, al fine di determinare se CCLE riduce l'accumulo nucleare di p65 mediante inibizione di IKK, è stato valutato il suo effetto sulla fosforilazione/attivazione di questo complesso. Come osservato in figura

20 A, il pretrattamento con CCLE ha soppresso la fosforilazione/attivazione di IKK α/β indotta dal TNF- α , ottenendo, già con la concentrazione 10 $\mu\text{g/mL}$, valori simili a quelli riscontrati in cellule controllo. Anche in questo caso, CCLE 15 $\mu\text{g/mL}$ è stato capace di ridurre i livelli di pIKK α/β al di sotto del controllo. Pertanto, questi dati confermano l'effetto inibitorio di CCLE sul pathway NF- κB indotto dal TNF- α mediante inibizione dell'attivazione del complesso IKK.

L'attivazione dei dimeri di NF- κB conduce al legame di questo fattore trascrizionale a specifiche sequenze del DNA con conseguente modulazione della trascrizione genica di molecole quali le citochine pro-infiammatorie (Oeckinghaus e Ghosh, 2009), ed esacerbazione dell'infiammazione intestinale. Allo scopo di confermare l'attività trascrizionale di NF- κB , è stata valutata l'espressione genica di IL-8 mediante real-time PCR. Le cellule Caco-2 esposte a TNF- α hanno mostrato overespressione di IL-8 rispetto alle cellule controllo (Figura 20 B). Di contro, il pretrattamento con CCLE ha ridotto l'espressione genica di IL-8 in modo dose-dipendente. Il solo trattamento con CCLE, in assenza di esposizione a TNF- α , non ha avuto effetti sulla modulazione dell'espressione genica basale di IL-8.

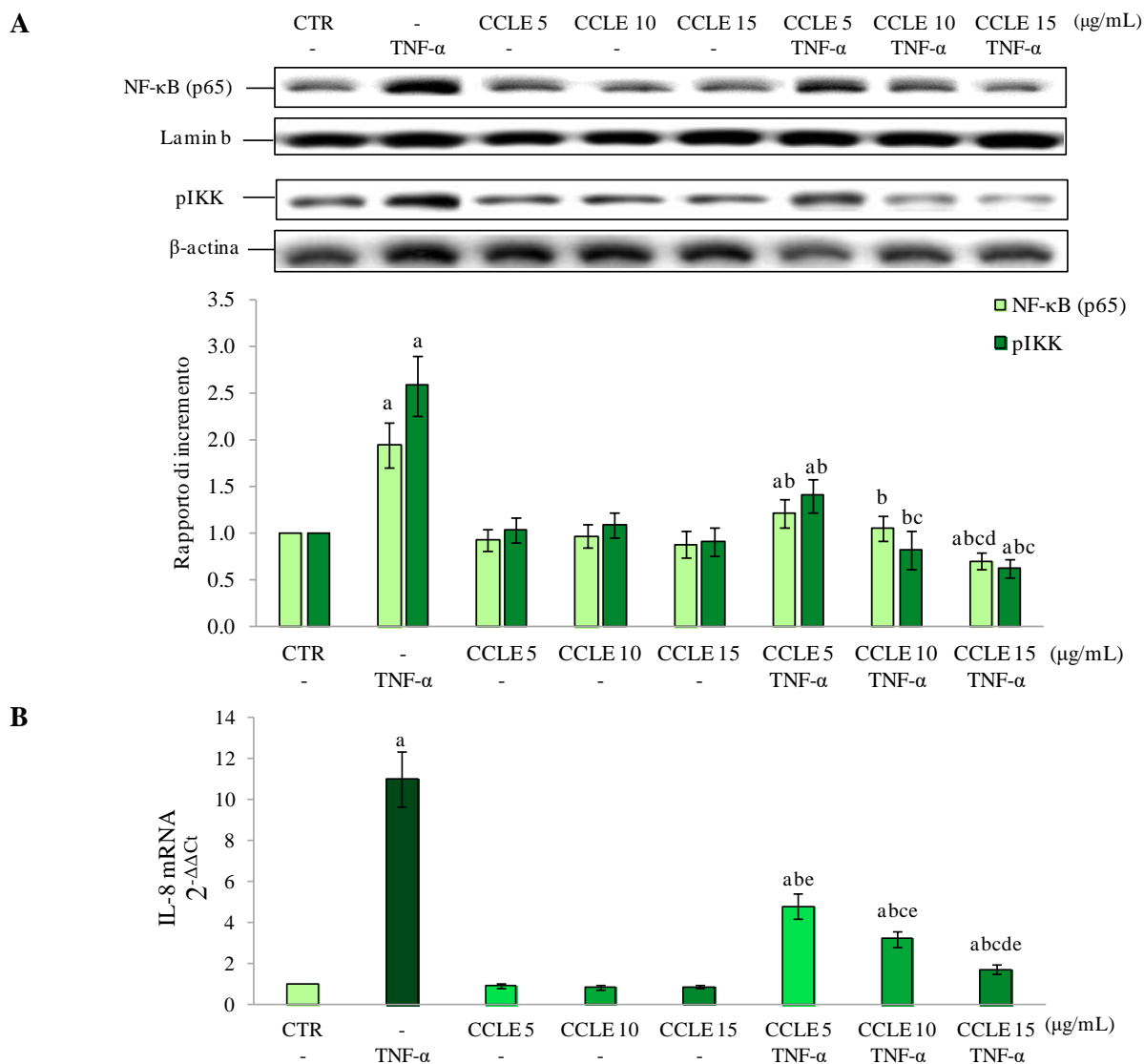


Figura 20. Effetti sul pathway di NF-κB: (A) Livelli nucleari di p65 e livelli citoplasmatici di pIKK α/β; (B) Espressione genica di IL-8. (A) Per valutare la localizzazione nucleare di p65 sono stati analizzati mediante Western blot i lisati nucleari delle cellule Caco-2; i valori d'intensità di NF-κB (p65) sono stati normalizzati con i corrispondenti valori di Lamin b; i risultati sono riportati come rapporto di incremento rispetto al CTR. I valori d'intensità di pIKK α/β sono stati normalizzati con i corrispondenti valori di β-actina; i risultati sono riportati come rapporto di incremento rispetto al CTR. (B) I livelli di espressione genica di IL-8 sono stati analizzati mediante real-time PCR e i dati sono stati espressi come $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e normalizzati per il CTR; il gene 18S rRNA è stato usato come housekeeping. I risultati derivano da tre esperimenti indipendenti e sono riportati come media \pm SD. ^ap < 0.05 vs CTR; ^bp < 0.05 vs TNF-α; ^cp < 0.05 vs CCLE 5 μg/mL + TNF-α; ^dp < 0.05 vs CCLE 10 μg/mL + TNF-α; ^ep < 0.05 vs tutte le concentrazioni di CCLE senza esposizione a TNF-α.

4.2.2 CCLE inibisce l'espressione di COX-2 indotta da TNF- α

COX-2 è un enzima inducibile che influenza la produzione di prostaglandine e trombossani, i quali sono coinvolti nella patogenesi delle IBD (Sheibanie et al., 2007). Poiché questo enzima è indotto attraverso il pathway di NF- κ B (Tsatsanis et al., 2006), ne sono state valutate le concentrazioni intracellulari. Come osservato in figura 21, nelle cellule Caco-2 la stimolazione con TNF- α 50 ng/mL ha indotto un incremento dei livelli proteici di COX-2. Di contro, in quelle pretrattate con CCLE, a partire dalla concentrazione 10 μ g/mL, i livelli di COX-2 erano significativamente ridotti in modo dose-dipendente. Il solo trattamento con CCLE, in assenza di esposizione a TNF- α , non ha influenzato i livelli basali di COX-2. Questi risultati confermano ancora una volta l'effetto protettivo di CCLE contro l'infiammazione intestinale indotta da TNF- α .

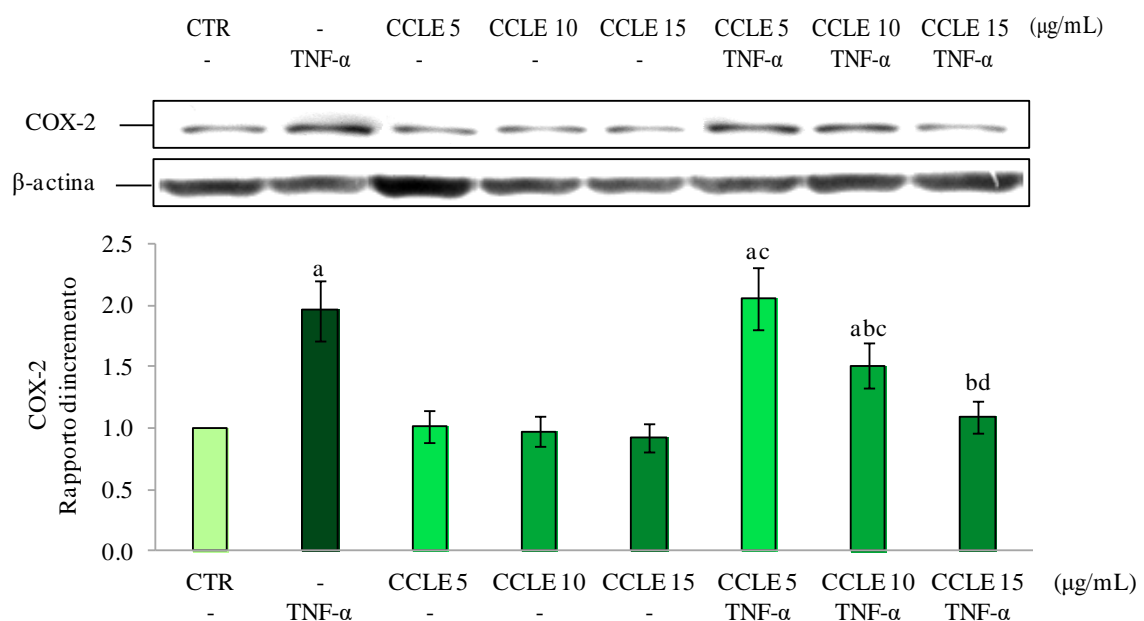


Figura 21. Espressione proteica di COX-2. I monostrati di cellule Caco-2 sono stati pretrattati con CCLE (5, 10 e 15 μ g/mL) per 24 ore e successivamente esposti a TNF- α 50 ng/mL per 6 ore. I monostrati trattati con solo veicolo con solo veicolo (DMSO 0,02%) sono stati usate come controlli (CTR). I lisati cellulari totali delle Caco-2 sono stati analizzati mediante Western blot. I risultati sono riportati come rapporto di incremento rispetto al CTR ed espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. I valori d'intensità di COX-2 sono stati normalizzati con i corrispondenti valori di β -actina. ^ap < 0.05 vs CTR; ^bp < 0.05 vs TNF- α ; ^cp < 0.05 vs tutte le concentrazioni di CCLE senza esposizione a TNF- α ; ^dp < 0.05 vs concentrazioni più basse di CCLE + TNF- α .

4.2.3 Effetto protettivo di CCLE sull'alterazione dello stato redox intracellulare indotto da TNF- α

L'attività del fattore trascrizionale redox-sensibile NF- κ B è correlata allo stato redox intracellulare e la sua attivazione/traslocazione nucleare è stimolata dai ROS (Buelna-Chontal e Zazueta, 2013). Di contro, l'espressione genica di citochine regolate da NF- κ B può essere inibita da composti naturali con azione antiossidante (Khan et al., 2020).

Dal momento che è stata ampiamente dimostrata la capacità dei polifenoli di migliorare lo stato redox intracellulare (Bjørklund e Chirumbolo, 2017; Teixeira et al., 2019), è stato valutato l'effetto di CCLE contro lo stress ossidativo indotto da TNF- α in cellule Caco-2 valutando i livelli di ROS e TAA, i quali sono marker dello stato redox intracellulare. Come dimostrato dal significativo incremento dei livelli di ROS e dai ridotti livelli di TAA intracellulari, l'esposizione delle cellule Caco-2 a TNF- α ha causato uno squilibrio dello stato redox cellulare. Viceversa, il pretrattamento con CCLE ha indotto un effetto protettivo contro l'alterazione dello stato redox cellulare indotto da TNF- α (Figura 22 A e B). È interessante notare che il pretrattamento con CCLE è stato capace di incrementare i valori di TAA e di ridurre i livelli di ROS a tutte le concentrazioni testate, e tale effetto è stato osservato non solo in cellule esposte a TNF- α ma anche in quelle non esposte. Per di più, la concentrazione maggiore testata di CCLE (15 μ g/mL) ha ridotto significativamente i livelli di ROS rispetto alle cellule controllo. Inoltre, sono stati determinati anche i livelli intracellulari di GSH, un antiossidante coinvolto in numerose funzioni biologiche e un importante marker dello stato redox intracellulare (Cimino e Saija, 2008). L'esposizione dei monostrati cellulari a TNF- α per 6 ore ha indotto una deplezione dei livelli intracellulari di GSH. Al contrario, il pretrattamento con CCLE ha impedito la riduzione di livelli di GSH indotta da TNF- α . Anche in questo caso l'effetto positivo di CCLE è stato osservato sia in cellule esposte che non a TNF- α (Figura 22 C).

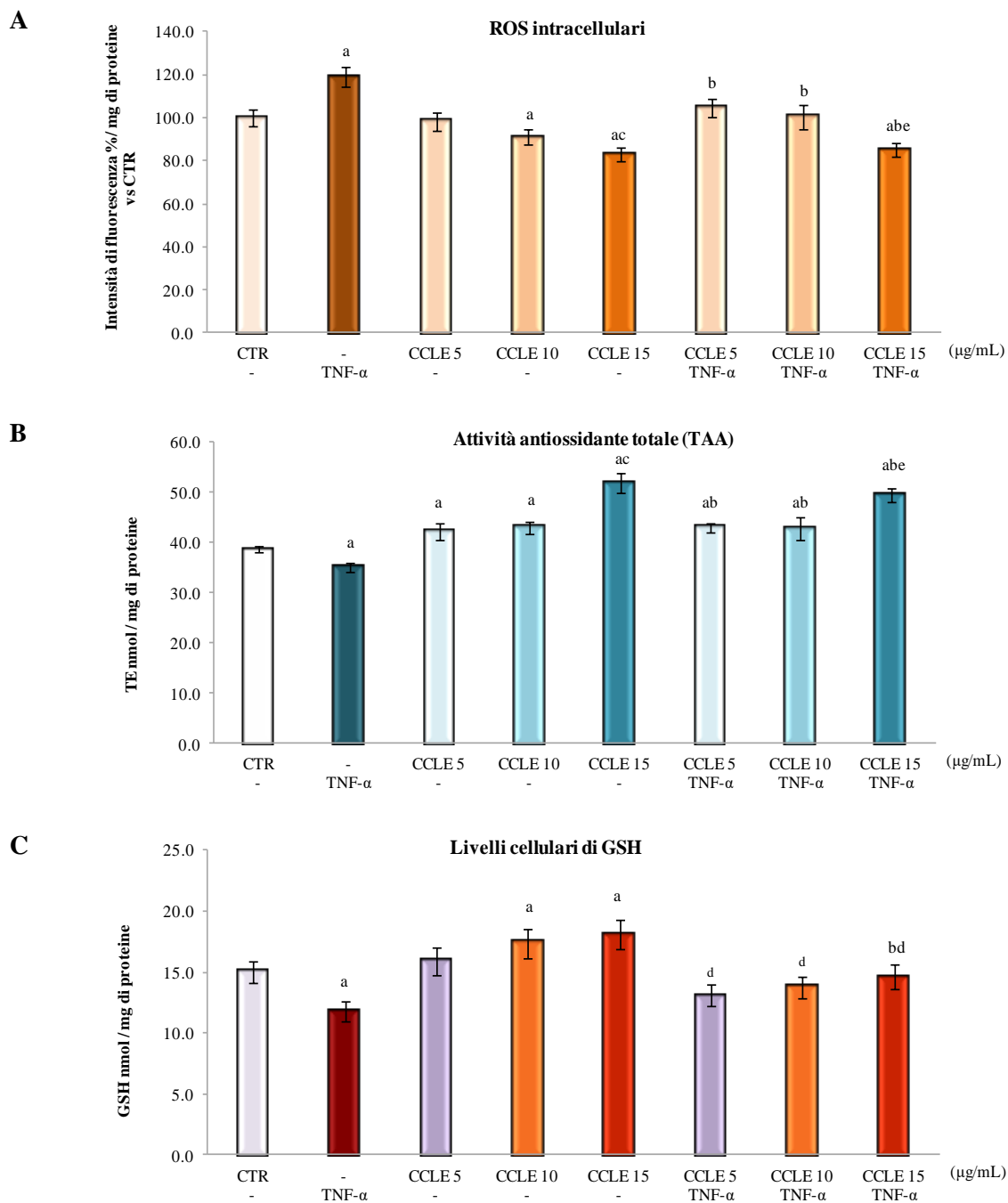


Figura 22. Stato redox intracellulare. I monostrati di cellule Caco-2 sono stati pretrattati con CCLE (5, 10 e 15 $\mu\text{g/mL}$) per 24 ore, e successivamente esposti a $\text{TNF-}\alpha$ 50 ng/mL per 6 ore. Le colture cellulari trattate con il solo veicolo (DMSO 0,02%) sono state usate come controlli (CTR). I livelli di ROS (A) sono riportati come % d'intensità di fluorescenza di DCFH-DA relativa al controllo. L'attività antiossidante totale (TAA) (B) e i livelli cellulari di GSH (C) e sono riportati rispettivamente come nmoli di trolox equivalenti/mg di proteine e nmoli di GSH/mg di proteine ed espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. ^a $p < 0.05$ vs CTR; ^b $p < 0.05$ vs $\text{TNF-}\alpha$; ^c $p < 0.05$ vs concentrazioni più basse di CCLE; ^d $p < 0.05$ vs le stesse concentrazioni di CCLE senza esposizione a $\text{TNF-}\alpha$; ^e $p < 0.05$ vs concentrazioni più basse di CCLE + $\text{TNF-}\alpha$.

4.2.4 CCLE esercita il suo effetto protettivo attivando il pathway di Nrf2

Numerose evidenze scientifiche hanno dimostrato l'abilità dei polifenoli di modulare il potere antiossidante endogeno mediante attivazione del pathway di Nrf2 (Bowtell e Kelly, 2019; Zhou et al., 2019). Il fattore trascrizionale redox-sensibile Nrf2 è il principale regolatore della risposta antiossidante (Saha et al., 2020), ed è in grado di proteggere le cellule da agenti stressanti che incrementano la produzione di ROS (Huang et al., 2015). Fattori di stress o induttori di Nrf2 incrementano l'accumulo nucleare di Nrf2 (Zhang e Hannink, 2003), il quale stimola la sintesi di antiossidanti endogeni e enzimi detossificanti di fase II (Forman et al., 2014; Abed et al., 2015; Mutter et al., 2015). Pertanto, allo scopo di determinare il potenziale meccanismo con il quale CCLE è capace di esercitare i suoi effetti protettivi, sono stati valutati i livelli nucleari di Nrf2 in cellule Caco-2. In accordo con precedenti dati riportati dal nostro gruppo di ricerca (Ferrari et al., 2016), il TNF- α non ha dimostrato effetti sull'attivazione/traslocazione di Nrf2. Di contro, il pretrattamento con CCLE ha indotto un significativo incremento nei livelli nucleari di Nrf2 rispetto alle cellule controllo, sia in cellule esposte che non esposte a TNF- α (Figura 23).

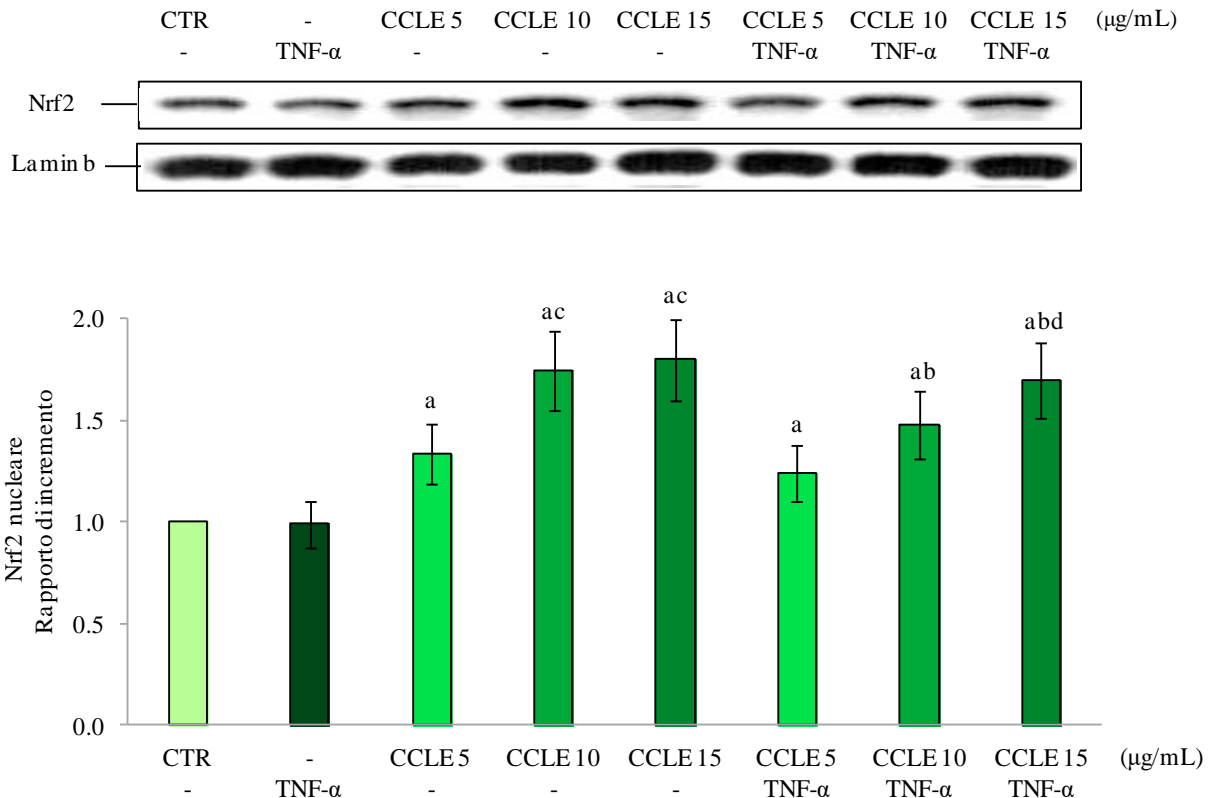


Figura 23. Livelli nucleari di Nrf2. I monostrati di cellule Caco-2 sono stati pretrattati con CCLE (5, 10, e 15 µg/mL) per 24 ore e successivamente esposti a TNF-α 50 ng/mL per 6 ore. I monostrati trattati con solo veicolo (DMSO 0,02%) sono stati usati come controllo (CTR). Per valutare la localizzazione nucleare di Nrf2 sono stati analizzati mediante Western blot i lisati nucleari delle cellule Caco-2. I valori d'intensità di Nrf2 sono stati normalizzati con i corrispondenti valori di Lamin b. I risultati sono riportati come rapporto di incremento rispetto al CTR ed espressi come media ± SD di tre esperimenti indipendenti. ^ap < 0.05 vs CTR; ^bp < 0.05 vs TNF-α; ^cp < 0.05 vs CCLE 5 µg/mL; ^dp < 0.05 vs CCLE 5 µg/mL + TNF-α.

La glutammato-cisteina ligasi (*glutamate-cysteine ligase - GCL*) è un enzima che catalizza la prima reazione, limitante, nella biosintesi del GSH. Esso consiste di due subunità, una catalitica detta GCLC e una modificata anche nota come GCLM, e la loro espressione è modulata da Nrf2 (Lu, 2013). La NAD(P)H chinone ossidoreduttasi-1 (*NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 - NQO1*), invece, è un noto enzima detossificante di fase I modulato da Nrf2 (Hayes et al., 2016). Pertanto, al fine di confermare la capacità di CCLE di attivare una risposta antiossidante adattativa mediante attivazione del pathway di Nrf2, è stata valutata l'espressione dei due geni che codificano per queste proteine, GCLC e NQO1, e che sono regolati da questo fattore trascrizionale. Come riportato in

figura 24, CCLE è stato abile nell'incrementare significativamente, a tutte le concentrazioni testate, l'espressione genica di GCLC e NQO1 sia in cellule esposte che non esposte a TNF- α . Dunque, questi risultati supportano l'ipotesi che l'effetto protettivo di CCLE contro l'infiammazione epiteliale intestinale indotta da TNF- α sia dovuta all'attivazione del pathway di Nrf2.

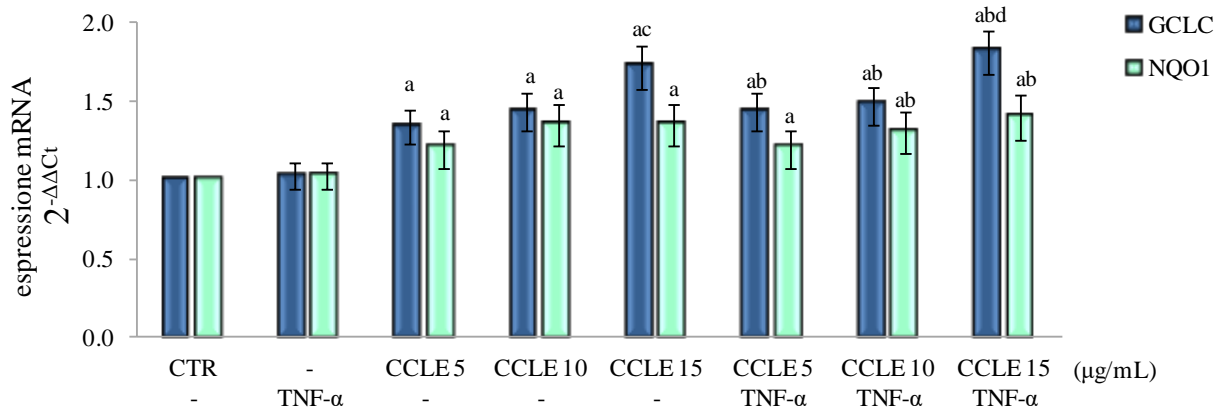


Figura 24. Espressione genica di GCLC e NQO1. I monostrati di cellule Caco-2 sono stati pretrattati con CCLE (5, 10, e 15 $\mu\text{g/mL}$) per 24 ore e successivamente esposti a TNF- α 50 ng/mL per 6 ore. Le colture cellulari trattate con solo veicolo (DMSO 0,02%) sono state usate come controlli (CTR). I livelli di espressione genica sono stati analizzati mediante real-time PCR e i dati sono stati espressi come $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e normalizzati per il CTR. Il gene 18S rRNA è stato usato come housekeeping. I risultati derivano da tre esperimenti indipendenti e sono riportati come media \pm SD. ^ap < 0.05 vs CTR; ^bp < 0.05 vs TNF- α ; ^cp < 0.05 vs CCLE 5 $\mu\text{g/mL}$; ^dp < 0.05 vs concentrazioni più basse di CCLE + TNF- α .

5. Discussione e conclusioni

L'intero studio è stato volto alla valutazione *in vitro* dei meccanismi molecolari coinvolti negli effetti benefici di un estratto standardizzato e commercialmente disponibile ottenuto dalle foglie di *Cynara cardunculus* L. subsp. *scolymus*, ricco in polifenoli (acido clorogenico, luteolina e loro derivati), sulla funzionalità e l'integrità della barriera intestinale e sull'infiammazione in cellule epiteliali intestinali Caco-2. Inizialmente l'attenzione è stata rivolta all'effetto di tale estratto (CCLE) sulla funzionalità dell'epitelio intestinale durante il processo di differenziamento. Dai risultati ottenuti emerge la capacità di CCLE di migliorare la funzionalità e l'integrità della barriera intestinale, e di stimolare la differenziazione epiteliale. Tenendo in considerazione che l'integrità della barriera intestinale è attribuita all'espressione delle TJ, e che esse si sviluppano durante il processo di differenziamento delle cellule staminali intestinali in enterociti maturi (Ichikawa-Tomikawa et al., 2011), in accordo con i risultati precedentemente discussi, CCLE ha dimostrato la capacità di stimolare un aumento dell'espressione delle TJ. Inoltre, in seguito all'alterazione delle TJ mediante deprivazione dei livelli di Ca^{2+} , CCLE ha indotto una più rapida stabilizzazione delle TJ, dimostrando un importante ruolo di CCLE nell'assemblaggio delle TJ supportando il miglioramento della funzionalità della barriera epiteliale.

Questi dati risultano in accordo con altri studi in cui sono stati valutati gli effetti dei polifenoli sulla funzionalità della barriera epiteliale intestinale. Il trattamento di cellule Caco-2 per 12 e 24 ore con luteolina (100 $\mu\text{mol/L}$) ha indotto un incremento dei valori di TEER rispetto alle cellule controllo (Noda et al., 2012). In uno studio *in vivo* condotto su ratti, la supplementazione per 14 giorni con acido clorogenico (20 e 50 mg/kg) ha migliorato l'integrità della barriera intestinale, alterata da LPS, incrementando l'espressione di ZO-1 e occludina sia nella mucosa del digiuno che del colon (Ruan et al., 2014). In un altro studio *in vivo* la somministrazione intragastrica di acido clorogenico (120 mg/kg/die) per 28 giorni ha indotto un incremento dell'attività della fosfatasi alcalina in ratti con danno intestinale indotto da un'endotossina, dimostrando che questa molecola potrebbe avere un impatto positivo nel miglioramento della permeabilità intestinale (Zhou et al., 2016).

Gli effetti indotti da CCLE sulla modulazione dell'espressione delle TJ sono stati attribuiti alla capacità dell'estratto di attivare la via AMPK/SIRT1. Infatti, il blocco di AMPK mediante un inibitore farmacologico annullava l'effetto protettivo di CCLE, che non era più in grado di indurre l'espressione delle TJ. Questi dati trovano supporto dalla letteratura poiché un estratto ricco in polifenoli ha indotto un miglioramento della funzionalità della barriera intestinale in cellule Caco-2 trattate per 48 ore e promuoveva l'espressione genica di occludina in ratti alimentati per 14 giorni con lo 0,3% *p/p* di estratto, e tali effetti sono stati correlati, almeno in parte, all'attivazione di AMPK e ERK1/2 (Wang et al., 2016). Il trattamento durante l'intero periodo di differenziamento con un estratto di patate viola arricchito in polifenoli (10 µg/mL), ha aumentato i valori di TEER e ha stimolato la differenziazione delle cellule epiteliali intestinali migliorando l'attività della fosfatasi alcalina, l'espressione di villina ed E-caderina e l'assemblaggio delle TJ come occludina, ZO-1, claudina-1 e claudina-2, e tali effetti erano correlati all'induzione dell'attivazione di AMPK (Sun et al., 2018a). L'aumento dell'espressione delle TJ è stata quindi correlata all'attivazione del pathway AMPK/SIRT1 sia su monostrati di cellule Caco-2, che in topi alimentati con una dieta ricca di grassi (Li et al., 2021) e ciò lascia ipotizzare che l'effetto protettivo dei polifenoli contenuti in CCLE sia dovuto all'attivazione del pathway AMPK/SIRT1.

Nella seconda parte dello studio sono stati valutati i meccanismi molecolari coinvolti nell'effetto protettivo *in vitro* di CCLE contro l'infiammazione intestinale acuta indotta da TNF- α su cellule differenziate Caco-2. Molecole naturali bioattive capaci di modulare differenti vie di segnale cellulari potrebbero essere utili come nuove strategie terapeutiche nelle IBD. Numerosi studi hanno infatti dimostrato i benefici dei polifenoli nel controllo dell'infiammazione nelle IBD grazie alla loro capacità nel inibire il pathway proinfiammatorio di NF- κ B (Kim et al., 2005; Nishitani et al., 2013; Chao et al., 2017; Zhang et al., 2017; Mazieiro et al., 2018; Nunes et al., 2018), ma anche di attivare la via di segnale antiossidante di Nrf2 (Ferrari et al., 2016; Li et al., 2016; Nunes et al., 2016; Serra et al., 2016; Zhou et al., 2019; Li et al., 2020). I risultati ottenuti hanno dimostrato l'abilità di CCLE di proteggere le cellule epiteliali intestinali dal danno indotto da TNF- α attraverso

l'inibizione del pathway infiammatorio NF- κ B. Gli effetti protettivi di CCLE sono stati per di più confermati dalla riduzione della sovraespressione genica di IL-8 indotta da TNF- α e dalla riduzione dei livelli proteici dell'enzima inducibile COX-2. Lo stress ossidativo e i ROS possono mediare direttamente o sinergicamente l'attivazione di NF- κ B. È stato dimostrato che la riduzione dei livelli intracellulari di GSH e l'aumento dei livelli di glutatione ossidato (GSSG) sono correlati alla modulazione della fosforilazione di I κ B α e la conseguenziale attivazione di NF- κ B (Fraternale et al., 2021). Nel nostro modello sperimentale il pretrattamento con CCLE non solo ha ridotto lo stress ossidativo indotto dal TNF- α ma è stato capace di migliorare il potenziale redox intracellulare anche in assenza di TNF- α . Diversi polifenoli sono noti per le loro capacità di aumentare le difese antiossidanti e detossificanti cellulari attraverso la modulazione del pathway adattativo di Nrf2 (Zhou et al., 2019). Nelle nostre condizioni sperimentali abbiamo osservato che CCLE stimola una risposta cellulare adattativa attivando la via di segnale di Nrf2. I risultati ottenuti hanno dimostrato che CCLE induce la traslocazione nucleare di Nrf2 e l'espressione di geni a valle regolati da Nrf2 come GCLC e NQO1 in cellule Caco-2 esposte e non esposte a TNF- α , confermando in tal modo che gli effetti benefici di CCLE contro l'infiammazione intestinale possano essere mediati da una risposta antiossidante adattativa. Questi dati supportano anche l'ipotesi di un crosstalk inibitorio tra i pathway NF- κ B e Nrf2 già dimostrato in altri modelli sperimentali (Saha et al., 2020; Speciale et al., 2013). In accordo con questa ipotesi, è stato riscontrato che gli isomeri dell'acido clorogenico attivano la via di segnale di Nrf2, inibiscono la produzione di IL-8 e incrementano i livelli di GSH in cellule Caco-2 differenziate esposte a IFN- γ e forbolo miristato acetato (*phorbol myristate acetate* - PMA) (Liang e Kitts, 2018b; Liang e Kitts, 2018a; Liang et al., 2019). Inoltre, la luteolina può ridurre il danno indotto da TNF- α e IFN- γ in cellule Caco-2 mediante inattivazione della via di segnale STAT3 (Li et al., 2021), e attenua il danno indotto da etanolo inibendo il pathway MAPK/NF- κ B/MLCK e sovregolando il pathway di Nrf2 in monostrati di cellule Caco-2 (Yuan et al., 2021).

In conclusione, questi dati evidenziano la capacità di CCLE di migliorare la funzionalità della barriera intestinale e di contrastare l'infiammazione intestinale acuta, e supportano il possibile utilizzo delle foglie di *Cynara cardunculus* L. subsp. *scolymus*, considerate un prodotto di scarto, per l'ottenimento di estratti ricchi in polifenoli bioattivi potenzialmente utili per la funzionalità intestinale e per la prevenzione e/o trattamento delle malattie infiammatorie intestinali.

BIBLIOGRAFIA

- Abed, D. A., Goldstein, M., Albanyan, H., Jin, H., and Hu, L. (2015). Discovery of Direct Inhibitors of Keap1-Nrf2 Protein-Protein Interaction as Potential Therapeutic and Preventive Agents. *Acta Pharm. Sin B* 5 (4), 285–299.
- Abu-Reidah, I. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC–DAD–ESI-QTOF-MS. *Food chemistry*, 141(3), 2269–2277.
- Acquadro, A., Barchi, L., Portis, E., Mangino, G., Valentino, D., Mauromicale, G., & Lanteri, S. (2017). Genome reconstruction in *Cynara cardunculus* taxa gains access to chromosome-scale DNA variation. *Scientific reports*, 7(1), 5617.
- Adak, A., & Khan, M. R. (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 76(3), 473–493.
- Ahmadi MN, Madani H, Mahzoni P (2008) Hypoglycemic and hypolipidemic effect of hydro-alcoholic of *Cynara scolymus* L. extract in alloxan monohydrate-induced diabetes rats to compare with glibenclamide. *Iran J Med Aromat Plants* 40:148–161
- Al-Sadi, R., Guo, S., Ye, D., Rawat, M., and Ma, T. Y. (2016). TNF- α Modulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by NIK/IKK- α Axis Activation of the Canonical NF-K β Pathway. *Am. J. Pathol.* 186 (5), 1151–1165.
- Al-Sadi, R., Khatib, K., Guo, S., Ye, D., Youssef, M., & Ma, T. (2011). Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(6), G1054-G1064.
- Al-Sadi, R., Ye, D., Said, H. M., and Ma, T. Y. (2010). IL-1 β -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by MEKK-1 activation of canonical NF-kappaB pathway. *Am. J. Pathol.* 177, 2310–2322.
- Alam, M. A., Subhan, N., Hossain, H., Hossain, M., Reza, H. M., Rahman, M. M., & Ullah, M. O. (2016). Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutrition & metabolism*, 13(1), 1-13.
- Anagnostou, F., Plas, C., & Forest, N. (1996). Ecto-alkaline phosphatase considered as levamisole-sensitive phosphohydrolase at physiological pH range during mineralization in cultured fetal calvaria cells. *Journal of cellular biochemistry*, 60(4), 484–494.
- Anderson, J. M., & Van Itallie, C. M. (2009). Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(2), a002584.
- Atreya, I., Atreya, R., and Neurath, M. F. (2008). NF-kappaB in Inflammatory Bowel Disease. *J. Intern. Med.* 263 (6), 591–596.
- Awuh, J. A., Haug, M., Mildenerger, J., Marstad, A., Do, C. P. N., Louet, C., ... & Flo, T. H. (2015). Keap1 regulates inflammatory signaling in Mycobacterium avium-infected human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(31), E4272-E4280.
- Aydin, C., Sarac, B., Koyuncu, A., Yildirim, S., Sen, M., & Sarioglu, Y. (2003). Relaxant effect of omeprazole and lansoprazole in guinea pig gallbladder muscle strips in vitro. *Journal of gastroenterology*, 38(8), 765–771.
- Azzini, E., Bugianesi, R., Romano, F., Di Venere, D., Miccadei, S., Durazzo, A., ... & Maiani, G. (2007). Absorption and metabolism of bioactive molecules after oral consumption of cooked edible heads of *Cynara scolymus* L. (cultivar Violetto di Provenza) in human subjects: a pilot study. *British Journal of Nutrition*, 97(5), 963-969.
- Baldwin A. S., Jr (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology*, 14, 649–683.
- Basuroy, S., Seth, A., Elias, B., Naren, A. P., & Rao, R. (2006). MAPK interacts with occludin and mediates EGF-induced prevention of tight junction disruption by hydrogen peroxide. *The Biochemical journal*, 393(Pt 1), 69–77.
- Baum B, Georgiou M (2011) Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol* 192:907–917
- Bazzoni G (2003) The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 15:525–530

- Ben Salem, M., Affes, H., Ksouda, K., Dhouibi, R., Sahnoun, Z., Hammami, S., & Zeghal, K. M. (2015). Pharmacological Studies of Artichoke Leaf Extract and Their Health Benefits. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 70(4), 441–453.
- Ben Salem, M. B., Affes, H., Athmouni, K., Ksouda, K., Dhouibi, R., Sahnoun, Z., ... & Zeghal, K. M. (2017a). Research Article Chemicals Compositions, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of *Cynara scolymus* Leaves Extracts, and Analysis of Major Bioactive Polyphenols by HPLC.
- Ben Salem, M., Ben Abdallah Kolsi, R., Dhouibi, R., Ksouda, K., Charfi, S., Yaich, M., Hammami, S., Sahnoun, Z., Zeghal, K. M., Jamoussi, K., & Affes, H. (2017b). Protective effects of *Cynara scolymus* leaves extract on metabolic disorders and oxidative stress in alloxan-diabetic rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 328.
- Ben Salem, M., Ksouda, K., Dhouibi, R., Charfi, S., Turki, M., Hammami, S., Ayedi, F., Sahnoun, Z., Zeghal, K. M., & Affes, H. (2019). LC-MS/MS Analysis and Hepatoprotective Activity of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Leaves Extract against High Fat Diet-Induced Obesity in Rats. *BioMed research international*, 2019, 4851279.
- Benjamin, J. L., Hedin, C. R., Koutsoumpas, A., Ng, S. C., McCarthy, N. E., Prescott, N. J., Pessoa-Lopes, P., Mathew, C. G., Sanderson, J., Hart, A. L., Kamm, M. A., Knight, S. C., Forbes, A., Stagg, A. J., Lindsay, J. O., & Whelan, K. (2012). Smokers with active Crohn's disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota. *Inflammatory bowel diseases*, 18(6), 1092–1100.
- Bernardi, S., Del Bo', C., Marino, M., Gargari, G., Cherubini, A., Andrés-Lacueva, C., Hidalgo-Liberona, N., Peron, G., González-Dominguez, R., Kroon, P., Kirkup, B., Porrini, M., Guglielmetti, S., & Riso, P. (2020). Polyphenols and Intestinal Permeability: Rationale and Future Perspectives. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(7), 1816–1829.
- Bernotti, S., Seidman, E., Sinnett, D., Brunet, S., Dionne, S., Delvin, E., et al. (2003). Inflammatory Reaction without Endogenous Antioxidant Response in Caco-2 Cells Exposed to Iron/ascorbate-Mediated Lipid Peroxidation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285 (5), G898–G906.
- Besray Unal, E., Kiel, C., Benisty, H., Campbell, A., Pickering, K., Blüthgen, N., Sansom, O. J., & Serrano, L. (2018). Systems level expression correlation of Ras GTPase regulators. *Cell communication and signaling : CCS*, 16(1), 46.
- Biasi, F., Leonarduzzi, G., Oteiza, P. I., and Poli, G. (2013). Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms, Redox Considerations, and Therapeutic Targets. *Antioxid. Redox Signal.* 19 (14), 1711–1747.
- Bjørklund, G., and Chirumbolo, S. (2017). Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Daily Nutrition and Human Health. *Nutrition* 33, 311–321.
- Blair SA, Kane SV, Clayburgh DR, Turner JR (2006) Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. *Lab Invest* 86:191–201
- Blando, F., Calabriso, N., Berland, H., Maiorano, G., Gerardi, C., Carluccio, M. A., & Andersen, Ø. M. (2018). Radical scavenging and anti-inflammatory activities of representative anthocyanin groupings from pigment-rich fruits and vegetables. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 169.
- Bonomi BM (2001) *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione* 30: 361–370
- Bos, J. L., Rehmann, H., & Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 129(5), 865–877.
- Bowtell, J., and Kelly, V. (2019). Fruit-Derived Polyphenol Supplementation for Athlete Recovery and Performance. *Sports Med.* 49, 3–23.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Buckley, A., & Turner, J. R. (2018). Cell biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(1), a029314.
- Buelna-Chontal, M., and Zazueta, C. (2013). Redox Activation of Nrf2 & NF-Kb: a Double End Sword? *Cell Signal* 25 (12), 2548–2557.
- Bundy, R., Walker, A. F., Middleton, R. W., Marakis, G., & Booth, J. C. (2004). Artichoke leaf extract reduces symptoms of irritable bowel syndrome and improves quality of life in otherwise healthy volunteers suffering from concomitant dyspepsia: a subset analysis. *Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)*, 10(4), 667–669.

- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J. F., Gibson, G. R., Casteilla, L., Delzenne, N. M., ... Burcelin, R. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, *56*(7), 1761–1772.
- Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P., & Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, *458*(7241), 1056–1060.
- Cario, E., Gerken, G., & Podolsky, D. K. (2004). Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology*, *127*(1), 224–238.
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. (2015). Natural food additives: Quo vadis?. *Trends in food science & technology*, *45*(2), 284-295.
- Castellino, G., Nikolic, D., Magán-Fernández, A., Malfa, G. A., Chianetta, R., Patti, A. M., Amato, A., Montalto, G., Toth, P. P., Banach, M., Cicero, A. F. G., & Rizzo, M. (2019). Altilix[®] Supplement Containing Chlorogenic Acid and Luteolin Improved Hepatic and Cardiometabolic Parameters in Subjects with Metabolic Syndrome: A 6 Month Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Nutrients*, *11*(11), 2580.
- Ceccarelli N, Curadi MP, Picciarelli L, Martelloni C, Sbrana MG (2007) Globe artichoke as functional food. *Mediterr J Nutr Metab* 31:97–201
- Ceccarelli N, Curadi M, Picciarelli P, Martelloni L, Sbrana C, Giovannetti M (2010) Globe artichoke as functional food. *Mediterr J Nutr Metab* 3:197–201
- Chan, J. R., & Stinson, R. A. (1986). Dephosphorylation of phosphoproteins of human liver plasma membranes by endogenous and purified liver alkaline phosphatases. *The Journal of biological chemistry*, *261*(17), 7635–7639.
- Chao, L., Zheng, P., Xia, L., Yong, Y., Lu, G., Tang, F., et al. (2017). Calycosin Attenuates Dextran Sulfate Sodium (DSS)-induced Experimental Colitis. *Iran J. Basic Med. Sci.* *20* (9), 1056–1062
- Chassaing, B., Kumar, M., Baker, M. T., Singh, V., & Vijay-Kumar, M. (2014). Mammalian gut immunity. *Biomedical journal*, *37*(5), 246–258.
- Chen, H., Hu, Y., Fang, Y., Djukic, Z., Yamamoto, M., Shaheen, N. J., ... & Chen, X. (2014). Nrf2 deficiency impairs the barrier function of mouse oesophageal epithelium. *Gut*, *63*(5), 711-719.
- Choi, W., Yeruva, S., & Turner, J. R. (2017). Contributions of intestinal epithelial barriers to health and disease. *Experimental cell research*, *358*(1), 71–77.
- Cicero, A., Colletti, A., Bajraktari, G., Descamps, O., Djuric, D. M., Ezhov, M., Fras, Z., Katsiki, N., Langlois, M., Latkovskis, G., Panagiotakos, D. B., Paragh, G., Mikhailidis, D. P., Mitchenko, O., Paulweber, B., Pella, D., Pitsavos, C., Reiner, Ž., Ray, K. K., Rizzo, M., ... Banach, M. (2017). Lipid-lowering nutraceuticals in clinical practice: position paper from an International Lipid Expert Panel. *Nutrition reviews*, *75*(9), 731–767.
- Cimino, F., and Saija, A. (2008). “Glutathione Metabolism: Glutathione Metabolism: Favorable versus Unfavorable Effects,” in *Oxidants in Biology: A Question of Balance*. Editors G. Valacchi and P. A. Davis. (Netherlands: Dordrecht: Springer), 203–229.
- Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2012). Intestinal redox biology and oxidative stress. *Seminars in cell & developmental biology*, *23*(7), 729–737.
- Claus, T., Maruyama, S. A., Palombini, S. V., Montanher, P. F., Bonafé, E. G., Junior, O. D. O. S., ... & Visentainer, J. V. (2015). Chemical characterization and use of artichoke parts for protection from oxidative stress in canola oil. *LWT-Food Science and Technology*, *61*(2), 346-351.
- Clayburgh DR, Shen L, Turner JR (2004) A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest* 84:282–291
- Colantuono, A., Ferracane, R., & Vitaglione, P. (2018). Potential bioaccessibility and functionality of polyphenols and cynaropicrin from breads enriched with artichoke stem. *Food Chemistry*, *245*, 838-844.
- Cook, T. J., & Shenoy, S. S. (2003). Intestinal permeability of chlorpyrifos using the single-pass intestinal perfusion method in the rat. *Toxicology*, *184*(2-3), 125–133.
- Chalkiadaki, A., & Guarente, L. (2012). Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability. *Nature reviews. Endocrinology*, *8*(5), 287–296.
- Christen, U., & von Herrath, M. G. (2004). Induction, acceleration or prevention of autoimmunity by molecular mimicry. *Molecular immunology*, *40*(14-15), 1113–1120.

- Cunningham, K. E., & Turner, J. R. (2012). Myosin light chain kinase: pulling the strings of epithelial tight junction function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1258(1), 34–42.
- Curci, P. L., De Paola, D., Danzi, D., Vendramin, G. G., & Sonnante, G. (2015). Complete chloroplast genome of the multifunctional crop globe artichoke and comparison with other Asteraceae. *PLoS one*, 10(3), e0120589.
- D'Antuono, I., Garbetta, A., Linsalata, V., Minervini, F., & Cardinali, A. (2015). Polyphenols from artichoke heads (*Cynara cardunculus* (L.) subsp. *scolymus* Hayek): In vitro bio-accessibility, intestinal uptake and bioavailability. *Food & function*, 6(4), 1268-1277.
- Dabbou, S.; Dabbou, S.; Flamini, G.; Peiretti, G.P.; Pandino, G.; Helal, A.N. Biochemical characterization and antioxidant activities of the edible part of globe artichoke cultivars grown in Tunisia. *Int. J. Food Prop.* 2017, 20, D810–S819
- Davies, S. P., Helps, N. R., Cohen, P. T., & Hardie, D. G. (1995). 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS letters*, 377(3), 421–425.
- de Falco, B., Incerti, G., Amato, M., & Lanzotti, V. (2015). Artichoke: botanical, agronomical, phytochemical, and pharmacological overview. *Phytochemistry reviews*, 14(6), 993-1018.
- de Faria, E. L., Gomes, M. V., Cláudio, A. F. M., Freire, C. S., Silvestre, A. J., & Freire, M. G. (2018). Extraction and recovery processes for cynaropicrin from *Cynara cardunculus* L. using aqueous solutions of surface-active ionic liquids. *Biophysical reviews*, 10(3), 915-925.
- Dehimi, K., Speciale, A., Saija, A., Dahamna, S., Raciti, R., Cimino, F., & Cristani, M. (2016). Antioxidant and Anti-inflammatory Properties of Algerian *Thymelaea microphylla* Coss. and Dur. Extracts. *Pharmacognosy magazine*, 12(47), 203–210.
- Deng, J., Zeng, L., Lai, X., Li, J., Liu, L., Lin, Q., & Chen, Y. (2018). Metformin protects against intestinal barrier dysfunction via AMPK α 1-dependent inhibition of JNK signalling activation. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(1), 546–557.
- Dillon, A., & Lo, D. D. (2019). M Cells: Intelligent Engineering of Mucosal Immune Surveillance. *Frontiers in immunology*, 10, 1499.
- Durante, W. (2011). Protective role of heme oxygenase-1 against inflammation in atherosclerosis. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 16, 2372.
- El Senousy, A. S., Farag, M. A., Al-Mahdy, D. A., & Wessjohann, L. A. (2014). Developmental changes in leaf phenolics composition from three artichoke cvs. (*Cynara scolymus*) as determined via UHPLC–MS and chemometrics. *Phytochemistry*, 108, 67-76.
- Eljounaidi, K., Comino, C., Moglia, A., Cankar, K., Genre, A., Hehn, A., Bourgaud, F., Beekwilder, J. and Lanteri, S., 2015. Accumulation of cynaropicrin in globe artichoke and localization of enzymes involved in its biosynthesis. *Plant Science*, 239, pp.128-136.
- Elphick, D. A., & Mahida, Y. R. (2005). Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut*, 54(12), 1802–1809.
- Elsebai, M. F., Koutsoudakis, G., Saludes, V., Pérez-Vilaró, G., Turpeinen, A., Mattila, S., Pirttila, A.M., Fontaine-Vive, F., Mehiri, M., Meyerhans, A., & Diez, J. (2016). Pan-genotypic hepatitis C virus inhibition by natural products derived from the wild Egyptian artichoke. *Journal of virology*, 90(4), 1918-1930.
- Esfandiari HS, Yadollah (2011) Hypolipidemic and hypoglycemic effects of aerial part of *Cynara scolymus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Plants Res* 52:717–2723
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
- Fan, X., Staitieh, B. S., Jensen, J. S., Mould, K. J., Greenberg, J. A., Joshi, P. C., ... & Guidot, D. M. (2013). Activating the Nrf2-mediated antioxidant response element restores barrier function in the alveolar epithelium of HIV-1 transgenic rats. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 305(3), L267-L277.
- Farhadi, A., Banan, A., Fields, J., & Keshavarzian, A. (2003). Intestinal barrier: an interface between health and disease. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 18(5), 479–497.

- Farhadi, A., Keshavarzian, A., Ranjbaran, Z., Fields, J. Z., & Banan, A. (2006). The role of protein kinase C isoforms in modulating injury and repair of the intestinal barrier. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 316(1), 1–7.
- Ferrari, D., Cimino, F., Fratantonio, D., Molonia, M. S., Bashllari, R., Busà, R., et al. (2017). Cyanidin-3-O-Glucoside Modulates the In Vitro Inflammatory Crosstalk between Intestinal Epithelial and Endothelial Cells. *Mediators Inflamm.* 2017, 3454023.
- Ferrari, D., Speciale, A., Cristani, M., Fratantonio, D., Molonia, M. S., Ranaldi, G., et al. (2016). Cyanidin-3-O-glucoside Inhibits NF- κ B Signalling in Intestinal Epithelial Cells Exposed to TNF- α and Exerts Protective Effects via Nrf2 Pathway Activation. *Toxicol. Lett.* 264, 51–58.
- Ferruzza, S., Rossi, C., Scarino, M. L., & Sambuy, Y. (2012). A protocol for in situ enzyme assays to assess the differentiation of human intestinal Caco-2 cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 26(8), 1247–1251.
- Fintelman, V. (1996) Therapeutic profile and mechanism of action of artichoke leaf extract: hypolipemic, antioxidant, hepatoprotective and choleric properties. *Phytomedica* 201:50–60
- Fissore, E. N., Santo Domingo, C., Gerschenson, L. N., & Giannuzzi, L. (2015). A study of the effect of dietary fiber fractions obtained from artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) on the growth of intestinal bacteria associated with health. *Food & function*, 6(5), 1667-1674.
- Fogh, J., Wright, W. C., & Loveless, J. D. (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 58(2), 209–214.
- Forman, H. J., Davies, K. J., and Ursini, F. (2014). How Do Nutritional Antioxidants Really Work: Nucleophilic Tone and Para-Hormesis versus Free Radical Scavenging In Vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 66, 24–35.
- Forster, S. C., Browne, H. P., Kumar, N., Hunt, M., Denise, H., Mitchell, A., Finn, R. D., & Lawley, T. D. (2016). HPMCD: the database of human microbial communities from metagenomic datasets and microbial reference genomes. *Nucleic acids research*, 44(D1), D604–D609.
- Foster, J. A., & McVey Neufeld, K. A. (2013). Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in neurosciences*, 36(5), 305–312.
- Fraternali, A., Zara, C., De Angelis, M., Nencioni, L., Palamara, A. T., Retini, M., et al. (2021). Intracellular Redox-Modulated Pathways as Targets for Effective Approaches in the Treatment of Viral Infection. *Int. J. Mol. Sci.* 22(7).
- Fu, C., Hao, S., Xu, X., Zhou, J., Liu, Z., Lu, H., Wang, L., Jin, W., & Li, S. (2019). Activation of SIRT1 ameliorates LPS-induced lung injury in mice via decreasing endothelial tight junction permeability. *Acta pharmacologica Sinica*, 40(5), 630–641.
- Fujiwara, Y., Kawaguchi, Y., Fujimoto, T., Kanayama, N., Magari, M., & Tokumitsu, H. (2016). Differential AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Recognition Mechanism of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase Isoforms. *The Journal of biological chemistry*, 291(26), 13802–13808.
- Fulco, M., Cen, Y., Zhao, P., Hoffman, E. P., McBurney, M. W., Sauve, A. A., & Sartorelli, V. (2008). Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Developmental cell*, 14(5), 661–673.
- Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141:1539–1550
- Gatto, A., De Paola, D., Bagnoli, F., Vendramin, G. G., & Sonnante, G. (2013). Population structure of *Cynara cardunculus* complex and the origin of the conspecific crops artichoke and cardoon. *Annals of botany*, 112(5), 855-865.
- Gebhardt R (1996) Inhibition of hepatic cholesterol biosynthesis by artichoke leaf extracts is mainly due to luteolin. *Cell Biol Toxicol* 10:89–150
- Gebhardt R (1997) Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 144:279–286
- Gebhardt (2002) Inhibition of cholesterol biosynthesis in HepG2 cells by artichoke extracts was reinforced by glucosidase pretreatment. *Phytother Res* 16:368–372
- Gebhardt R, Fausel M. Antioxidant and hepatoprotective effects of artichoke extracts and constituents in cultured rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro.* 1997;11(5):669-672.

- Ghosh, S., May, M. J., & Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology*, 16, 225–260.
- Gouveia, S. C., & Castilho, P. C. (2012). Phenolic composition and antioxidant capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke-based dietary supplements. *Food research international*, 48(2), 712-724.
- Hall A. (2012). Rho family GTPases. *Biochemical Society transactions*, 40(6), 1378–1382.
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes & development*, 18(18), 2195–2224.
- Hayes, J. D., Ebisine, K., Sharma, R. S., Chowdhry, S., Dinkova-Kostova, A. T., and Sutherland, C. (2016). Regulation of the CNC-bZIP Transcription Factor Nrf2 by Keap1 and the axis between GSK-3 and β -TrCP. *Curr. Opin. Toxicol.* 1, 92–103.
- Helander, H. F., & Fändriks, L. (2014). Surface area of the digestive tract–revisited. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 49(6), 681-689.
- Heckers H, Dittmar K, Schmahl FW, Huth K (1977) Inefficiency of cynarin as therapeutic regimen in familial type I I hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis* 262:49–53
- Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A. H., Bürgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W., & Schulzke, J. D. (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*, 129(2), 550–564.
- Hollander, D., & Kaunitz, J. D. (2020). The "Leaky Gut": Tight Junctions but Loose Associations?. *Digestive diseases and sciences*, 65(5), 1277–1287.
- Holmes, J. L., Van Itallie, C. M., Rasmussen, J. E., & Anderson, J. M. (2006). Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expression Patterns*, 6, 581–588.
- Holtmann, M. H., & Neurath, M. F. (2004). Differential TNF-signaling in chronic inflammatory disorders. *Current molecular medicine*, 4(4), 439–444.
- Hu, Q., Ren, J., Li, G., Wu, J., Wu, X., Wang, G., ... & Li, J. (2018). The mitochondrially targeted antioxidant MitoQ protects the intestinal barrier by ameliorating mitochondrial DNA damage via the Nrf2/ARE signaling pathway. *Cell death & disease*, 9(3), 1-15.
- Huang, Y., Li, W., Su, Z. Y., and Kong, A. N. (2015). The Complexity of the Nrf2 Pathway: beyond the Antioxidant Response. *J. Nutr. Biochem.* 26 (12), 1401–1413.
- Ichikawa-Tomikawa, N., Sugimoto, K., Satohisa, S., Nishiura, K., & Chiba, H. (2011). Possible involvement of tight junctions, extracellular matrix and nuclear receptors in epithelial differentiation. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 253048.
- Ierna A, Mauromicale G (2010) *Cynara cardunculus* L. genotypes as a crop for energy purposes in a Mediterranean environment. *Biomass Bioenergy* 34:754–760
- Imhann, F., Bonder, M. J., Vich Vila, A., Fu, J., Mujagic, Z., Vork, L., Tigchelaar, E. F., Jankipersadsing, S. A., Cenit, M. C., Harmsen, H. J., Dijkstra, G., Franke, L., Xavier, R. J., Jonkers, D., Wijmenga, C., Weersma, R. K., & Zhernakova, A. (2016). Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut*, 65(5), 740–748.
- Ishida, K., Kojima, R., Tsuboi, M., Tsuda, Y., & Ito, M. (2010). Effects of artichoke leaf extract on acute gastric mucosal injury in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(2), 223-229.
- Israël A. (2000). The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB?. *Trends in cell biology*, 10(4), 129–133.
- Jacociunas, L. V., Dihl, R. R., Lehmann, M., Ferraz, A. D. B. F., Richter, M. F., Silva, J. D., & Andrade, H. H. R. D. (2014). Effects of artichoke (*Cynara scolymus*) leaf and bloom head extracts on chemically induced DNA lesions in *Drosophila melanogaster*. *Genetics and molecular biology*, 37, 93-104.
- Jakobek, L., & Matić, P. (2019). Non-covalent dietary fiber-polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 235-247.
- Jang, H. M., Han, S. K., Kim, J. K., Oh, S. J., Jang, H. B., & Kim, D. H. (2019). *Lactobacillus sakei* Alleviates High-Fat-Diet-Induced Obesity and Anxiety in Mice by Inducing AMPK Activation and SIRT1 Expression and Inhibiting Gut Microbiota-Mediated NF- κ B Activation. *Molecular nutrition & food research*, 63(6), e1800978.
- Johansson, M. E., & Hansson, G. C. (2011). Microbiology. Keeping bacteria at a distance. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6053), 182–183.

- Johansson, M. E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., & Hansson, G. C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), 15064–15069.
- Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D., & Hardie, D. G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell metabolism*, 1(1), 15–25.
- Kameswara RB, Renuka SP, Rajasekhar MD, Nagaraju N, Appa RC (2003) Antidiabetic activity of Terminalia pallida fruit in alloxan induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 85:169–172
- Karin, M., and Greten, F. R. (2005). NF-kappaB: Linking Inflammation and Immunity to Cancer Development and Progression. *Nat. Rev. Immunol.* 5 (10), 749–759.
- Kaulmann, A., & Bohn, T. (2016). Bioactivity of Polyphenols: Preventive and Adjuvant Strategies toward Reducing Inflammatory Bowel Diseases-Promises, Perspectives, and Pitfalls. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 9346470.
- Kazi TG, Afridi HI, Kazi N, Jamali MK, Arain MB, Jalbani N, Kandhro GA (2008) Copper, chromium, manganese, iron, nickel, and zinc levels in biological samples of diabetes mellitus patients. *Biol Trace Elem Res* 122:1–18
- Keir, M., Yi, Y., Lu, T., & Ghilardi, N. (2020). The role of IL-22 in intestinal health and disease. *The Journal of experimental medicine*, 217(3), e20192195.
- Kesika, P., Suganthi, N., Sivamaruthi, B. S., & Chaiyasut, C. (2021). Role of gut-brain axis, gut microbial composition, and probiotic intervention in Alzheimer's disease. *Life sciences*, 264, 118627.
- Khan, H., Ullah, H., Castilho, P. C. M. F., Gomila, A. S., D'Onofrio, G., Filosa, R., et al. (2020). Targeting NF-Kb Signaling Pathway in Cancer by Dietary Polyphenols. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60 (16), 2790–2800.
- Khor, T. O., Huang, M. T., Kwon, K. H., Chan, J. Y., Reddy, B. S., & Kong, A. N. (2006). Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Cancer research*, 66(24), 11580-11584.
- Kim, H., Kong, H., Choi, B., Yang, Y., Kim, Y., Lim, M. J., et al. (2005). Metabolic and Pharmacological Properties of Rutin, a Dietary Quercetin Glycoside, for Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Pharm. Res.* 22 (9), 1499–1509.
- Kinashi, Y., & Hase, K. (2021). Partners in Leaky Gut Syndrome: Intestinal Dysbiosis and Autoimmunity. *Frontiers in immunology*, 12, 673708.
- Kraft K (1997) Artichoke leaf extract—recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver, and gastrointestinal tracts. *Phytomedicine* 43:69–78
- Kulkarni, S. S., & Cantó, C. (2015). The molecular targets of resveratrol. *Biochimica et biophysica acta*, 1852(6), 1114–1123.
- Kulza M, Adamska K, Seńczuk-Przybyłowska M et al (2010) Globe artichokes and the liver. *Phytomedicine* 69:1122–1126
- Lakhan, S. E., & Kirchgessner, A. (2011). Anti-inflammatory effects of nicotine in obesity and ulcerative colitis. *Journal of translational medicine*, 9, 129.
- Lan, F., Cacicedo, J. M., Ruderman, N., & Ido, Y. (2008). SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *The Journal of biological chemistry*, 283(41), 27628–27635.
- Lattanzio V, Paul AK, Lansalta V, Cardinali A (2009) Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. *J Funct Foods* 1:131–144
- Lau, W. L., Liu, S. M., Pahlevan, S., Yuan, J., Khazaeli, M., Ni, Z., ... & Vaziri, N. D. (2015). Role of Nrf2 dysfunction in uremia-associated intestinal inflammation and epithelial barrier disruption. *Digestive Diseases and Sciences*, 60(5), 1215-1222.
- Le Sage, F., Meilhac, O., and Gonthier, M. P. (2017). Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of Polyphenols Extracted from Antirhea Borbonica Medicinal Plant on Adipocytes Exposed to Porphyromonas Gingivalis and Escherichia coli Lipopolysaccharides. *Pharmacol. Res.* 119, 303–312.
- Lea, T. (2015). Caco-2 Cell Line. In K. Verhoeckx (Eds.) et. al., *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. (pp. 103–111). Springer.
- Lee, S. H., Yun, Y., Kim, S. J., Lee, E. J., Chang, Y., Ryu, S., Shin, H., Kim, H. L., Kim, H. N., & Lee, J. H. (2018). Association between Cigarette Smoking Status and Composition of Gut Microbiota: Population-Based Cross-Sectional Study. *Journal of clinical medicine*, 7(9), 282.

- Lerner, A., & Matthias, T. (2015). Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmunity reviews*, 14(6), 479–489.
- Li, D., Cui, Y., Wang, X., Liu, F., & Li, X. (2021). Apple polyphenol extract alleviates lipid accumulation in free-fatty-acid-exposed HepG2 cells via activating autophagy mediated by SIRT1/AMPK signaling. *Phytotherapy research : PTR*, 35(3), 1416–1431.
- Li, H., Christman, L. M., Li, R., and Gu, L. (2020). Synergic Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota in Mitigating Inflammatory Bowel Diseases. *Food Funct.* 11 (6), 4878–4891.
- Li, H., Xia, N., Brausch, I., Yao, Y., & Förstermann, U. (2004). Flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) up-regulate endothelial-type nitric-oxide synthase gene expression in human endothelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310(3), 926-932.
- Li, H., Wu, Q., Xu, L., Li, X., Duan, J., Zhan, J., Feng, J., Sun, X., & Chen, H. (2015). Increased oxidative stress and disrupted small intestinal tight junctions in cigarette smoke-exposed rats. *Molecular medicine reports*, 11(6), 4639–4644.
- Li, W., & Kong, A. N. (2009). Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 48(2), 91-104.
- Li, Y., Shen, L., and Luo, H. (2016). Luteolin Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice Possibly through Activation of the Nrf2 Signaling Pathway. *Int. Immunopharmacol* 40, 24–31.
- Li, Z., Gao, M., Yang, B., Zhang, H., Wang, K., Liu, Z., Xiao, X., & Yang, M. (2018). Naringin attenuates MLC phosphorylation and NF-κB activation to protect sepsis-induced intestinal injury via RhoA/ROCK pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 103, 50–58.
- Lian, P., Braber, S., Garssen, J., Wichers, H. J., Folkerts, G., Fink-Gremmels, J., & Varasteh, S. (2020). Beyond Heat Stress: Intestinal Integrity Disruption and Mechanism-Based Intervention Strategies. *Nutrients*, 12(3), 734.
- Liang, N., Dupuis, J. H., Yada, R. Y., and Kitts, D. D. (2019). Chlorogenic Acid Isomers Directly Interact with Keap 1-Nrf2 Signaling in Caco-2 Cells. *Mol. Cel Biochem* 457 (1-2), 105–118.
- Liang, N., and Kitts, D. D. (2018a). Amelioration of Oxidative Stress in Caco-2 Cells Treated with Pro-inflammatory Proteins by Chlorogenic Acid Isomers via Activation of the Nrf2-Keap1-ARE-Signaling Pathway. *J. Agric. Food Chem.* 66 (42), 11008–11017.
- Liang, N., and Kitts, D. D. (2018b). Chlorogenic Acid (CGA) Isomers Alleviate Interleukin 8 (IL-8) Production in Caco-2 Cells by Decreasing Phosphorylation of P38 and Increasing Cell Integrity. *Int J Mol Sci* 19(12).
- Liorach R, Espin JC, Tomas-Barberan FA, Ferreres F (2002) Artichoke byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *J Agric Food Chem* 50:58–64
- Lingappan, K. (2018). NF-κB in Oxidative Stress. *Curr. Opin. Toxicol.* 7, 81–86.
- Liu, W., Hu, D., Huo, H., Zhang, W., Adiliaghdam, F., Morrison, S., Ramirez, J. M., Gul, S. S., Hamarneh, S. R., & Hodin, R. A. (2016). Intestinal Alkaline Phosphatase Regulates Tight Junction Protein Levels. *Journal of the American College of Surgeons*, 222(6), 1009–1017.
- Liu, Y., Bao, Z., Xu, X., Chao, H., Lin, C., Li, Z., ... & Ji, J. (2017). Extracellular signal-regulated kinase/nuclear factor-erythroid2-like2/heme oxygenase-1 pathway-mediated mitophagy alleviates traumatic brain injury-induced intestinal mucosa damage and epithelial barrier dysfunction. *Journal of Neurotrauma*, 34(13), 2119-2131.
- Llorach R, Espin JC, Toma-Barberan FA, Ferrere F (2002) Artichoke (*Cynara scolymus* L.) byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *J Agric Food Chem* 50: 3458–3464
- Lombardo, S., Pandino, G., Mauromicale, G., Knödler, M., Carle, R., & Schieber, A. (2010). Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori]. *Food Chemistry*, 119(3), 1175-1181.
- Lu, S. C. (2013). Glutathione Synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (5), 3143–3153.
- Ma, T. Y., Iwamoto, G. K., Hoa, N. T., Akotia, V., Pedram, A., Boivin, M. A., et al. (2004). TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286, G367–G376.
- Mahboubi, M. (2018). *Cynara scolymus* (artichoke) and its efficacy in management of obesity. *Bulletin of faculty of pharmacy, Cairo University*, 56(2), 115-120.

- Manna, P., Achari, A. E., & Jain, S. K. (2017). Vitamin D supplementation inhibits oxidative stress and upregulate SIRT1/AMPK/GLUT4 cascade in high glucose-treated 3T3L1 adipocytes and in adipose tissue of high fat diet-fed diabetic mice. *Archives of biochemistry and biophysics*, 615, 22–34.
- Marsico G, Vicenti A, Ragni M, Laudadio V, Lestingi A, Vonghi G (1999) The use of artichoke (*Cynara scolymus* L.) bracts in lambs feeding. Effect on productive performances and quanti-qualitative traits of carcasses and meat. *Agricoltura Ricerca* 21:39–48
- Martinsen, T. C., Fossmark, R., & Waldum, H. L. (2019). The Phylogeny and Biological Function of Gastric Juice-Microbiological Consequences of Removing Gastric Acid. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 6031.
- Maugeri, A., Ferlazzo, N., De Luca, L., Gitto, R., & Navarra, M. (2019). The link between the AMPK/SIRT1 axis and a flavonoid-rich extract of Citrus bergamia juice: A cell-free, in silico, and in vitro study. *Phytotherapy research : PTR*, 33(7), 1805–1814.
- Mayer, E. A., Tillisch, K., & Gupta, A. (2015). Gut/brain axis and the microbiota. *The Journal of clinical investigation*, 125(3), 926–938.
- Mazieiro, R., Frizon, R. R., Barbalho, S. M., and Goulart, R. A. (2018). Is Curcumin a Possibility to Treat Inflammatory Bowel Diseases? *J. Med. Food* 21 (11), 1077–1085.
- McDougall B, King PJ, Wu BW, Hostomsky Z, Reinecke MG, Robinson WE (1998) Dicafeoylquinic and dicafeoyltartaric acids were selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase. *Antimicrob Agents Chemother* 42:140–146
- Meddings J. (2008). The significance of the gut barrier in disease. *Gut*, 57(4), 438–440.
- Menin, B., Comino, C., Portis, E., Moglia, A., Cankar, K., Bouwmeester, H. J., Lanteri, S., and Beekwilder, J. (2012). Genetic mapping and characterization of the globe artichoke (+)-germacrene A synthase gene, encoding the first dedicated enzyme for biosynthesis of the bitter sesquiterpene lactone cynaropicrin. *Plant Science*, 190, 1–8.
- Merck (2006) The Merck index 14th ed. an encyclopaedia of chemicals, drugs and biologicals. Merck Manuals, NJ
- Miao, W., Wu, X., Wang, K., Wang, W., Wang, Y., Li, Z., Liu, J., Li, L., & Peng, L. (2016). Sodium Butyrate Promotes Reassembly of Tight Junctions in Caco-2 Monolayers Involving Inhibition of MLCK/MLC2 Pathway and Phosphorylation of PKC β 2. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1696.
- Miccadei, S., Di Venere, D., Cardinali, A., Romano, F., Durazzo, A., Foddai, M. S., Fraioli, R., Mobarhan, S., & Maiani, G. (2008). Antioxidative and apoptotic properties of polyphenolic extracts from edible part of artichoke (*Cynara scolymus* L.) on cultured rat hepatocytes and on human hepatoma cells. *Nutrition and cancer*, 60(2), 276–283.
- Michielan, A., and D’Incà, R. (2015). Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators Inflamm*. 2015, 628157.
- Miláčková, I., Kapustová, K., Mučaji, P., & Hošek, J. (2017). Artichoke leaf extract inhibits AKR1B1 and reduces NF- κ B activity in human leukemic cells. *Phytotherapy research*, 31(3), 488-496.
- Mileo, A. M., Di Venere, D., Abbruzzese, C., & Miccadei, S. (2015). Long term exposure to polyphenols of artichoke (*Cynara scolymus* L.) exerts induction of senescence driven growth arrest in the MDA-MB231 human breast cancer cell line. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015.
- Miller N.J., Rice-Evans C.A. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*. Volume 60, Issue 3, Pages 331-337, 1997
- Mohammad A, Sahar N, Effat B (2013) Effet of *Cynara scolymus* on fasting blood sugar of rat. *Int J Pharm Ind Res* 3:180–182
- Moon YS, Kashyap ML (2004) Pharmacologic treatment of type 2 diabetic dyslipidemia. *Pharmacotherapy* 241:692–1713
- Moore, K. A., & Lemischka, I. R. (2006). Stem cells and their niches. *Science*, 311(5769), 1880-1885.
- Mörbe, U. M., Jørgensen, P. B., Fenton, T. M., von Burg, N., Riis, L. B., Spencer, J., & Agace, W. W. (2021). Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal immunology*, 14(4), 793–802.
- Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature reviews. Immunology*, 14(10), 667–685.

- Mucaji, P., Grancai, D., Nagy, M., Buděšínský, M., & Ubik, K. (2001). Monodesmosidic saponins in *Cynara cardunculus* L. *Ceska a Slovenska Farmacie: Casopis Ceske Farmaceuticke Spolecnosti a Slovenske Farmaceuticke Spolecnosti*, 50(6), 277-279.
- Mullin, J. M., Valenzano, M. C., Whitby, M., Lurie, D., Schmidt, J. D., Jain, V., Tully, O., Kearney, K., Lazowick, D., Mercogliano, G., & Thornton, J. J. (2008). Esomeprazole induces upper gastrointestinal tract transmucosal permeability increase. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 28(11-12), 1317–1325.
- Muniz, L. R., Knosp, C., & Yeretssian, G. (2012). Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Frontiers in immunology*, 3, 310.
- Mutlu, E. A., Engen, P. A., Soberanes, S., Urich, D., Forsyth, C. B., Nigdelioglu, R., Chiarella, S. E., Radigan, K. A., Gonzalez, A., Jakate, S., Keshavarzian, A., Budinger, G. R., & Mutlu, G. M. (2011). Particulate matter air pollution causes oxidant-mediated increase in gut permeability in mice. *Particle and fibre toxicology*, 8, 19.
- Mutter, F. E., Park, B. K., and Copple, I. M. (2015). Value of Monitoring Nrf2 Activity for the Detection of Chemical and Oxidative Stress. *Biochem. Soc. Trans.* 43 (4), 657–662.
- Nadova E, Miadokova P, Mucaji D, Grancai LC (2008) Growth inhibitory effect of ethyl acetate-soluble fraction of *Cynara cardunculus* L. in leukemia cells involves cell arrest, cytochrome c release and activation of caspases. *Phytother Res* 22:165–800
- Nakamura, Y., Mimuro, H., Kunisawa, J., Furusawa, Y., Takahashi, D., Fujimura, Y., Kaisho, T., Kiyono, H., & Hase, K. (2020). Microfold cell-dependent antigen transport alleviates infectious colitis by inducing antigen-specific cellular immunity. *Mucosal immunology*, 13(4), 679–690.
- Nalle, S. C., & Turner, J. R. (2015). Intestinal barrier loss as a critical pathogenic link between inflammatory bowel disease and graft-versus-host disease. *Mucosal immunology*, 8(4), 720–730.
- Negrão, M. R., Keating, E., Faria, A., Azevedo, I., & Martins, M. J. (2006). Acute effect of tea, wine, beer, and polyphenols on ecto-alkaline phosphatase activity in human vascular smooth muscle cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(14), 4982–4988.
- Neurath, M. F., Finotto, S., & Glimcher, L. H. (2002). The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nature medicine*, 8(6), 567–573.
- Neurath, M. F., Pettersson, S., Meyer zum Büschenfelde, K. H., & Strober, W. (1996). Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nature medicine*, 2(9), 998–1004.
- Ngo, B., Farrell, C. P., Barr, M., Wolov, K., Bailey, R., Mullin, J. M., et al. (2010). Tumor Necrosis Factor Blockade for Treatment of Inflammatory Bowel Disease: Efficacy and Safety. *Curr. Mol. Pharmacol.* 3 (3), 145–152.
- Nielsen, L. N., Roager, H. M., Casas, M. E., Frandsen, H. L., Gosewinkel, U., Bester, K., Licht, T. R., Hendriksen, N. B., & Bahl, M. I. (2018). Glyphosate has limited short-term effects on commensal bacterial community composition in the gut environment due to sufficient aromatic amino acid levels. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 233, 364–376.
- Nin, V., Escande, C., Chini, C. C., Giri, S., Camacho-Pereira, J., Matalonga, J., Lou, Z., & Chini, E. N. (2012). Role of deleted in breast cancer 1 (DBC1) protein in SIRT1 deacetylase activation induced by protein kinase A and AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 287(28), 23489–23501.
- Nishitani, Y., Yamamoto, K., Yoshida, M., Azuma, T., Kanazawa, K., Hashimoto, T., et al. (2013). Intestinal Anti-inflammatory Activity of Luteolin: Role of the Aglycone in NF-Kb Inactivation in Macrophages Co-cultured with Intestinal Epithelial Cells. *Biofactors* 39 (5), 522–533.
- Niture, S. K., Khatri, R., & Jaiswal, A. K. (2014). Regulation of Nrf2—an update. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 36-44.
- Noda, S., Tanabe, S., & Suzuki, T. (2012). Differential effects of flavonoids on barrier integrity in human intestinal Caco-2 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(18), 4628–4633.
- Nonoyama, S., Karakida, T., Chiba-Ohkuma, R., Yamamoto, R., Ujiiie, Y., Nagano, T., Yamakoshi, Y., & Gomi, K. (2021). Development and Characterization of Alkaline Phosphatase-Positive Human Umbilical Cord Perivascular Cells. *Cells*, 10(11), 3011.
- Nunes, C., Teixeira, N., Serra, D., Freitas, V., Almeida, L., and Laranjinha, J. (2016). Red Wine Polyphenol Extract Efficiently Protects Intestinal Epithelial Cells from Inflammation via Opposite Modulation of JAK/STAT and Nrf2 Pathways. *Toxicol. Res. (Camb)* 5 (1), 53–65.

- Nunes, S., Danesi, F., Del Rio, D., and Silva, P. (2018). Resveratrol and Inflammatory Bowel Disease: the Evidence So Far. *Nutr. Res. Rev.* 31 (1), 85–97.
- Oakhill, J. S., Steel, R., Chen, Z. P., Scott, J. W., Ling, N., Tam, S., & Kemp, B. E. (2011). AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6036), 1433–1435.
- Oda H, Takeichi M (2011) Evolution: structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. *J Cell Biol* 193:1137–1146
- Oeckinghaus, A., and Ghosh, S. (2009). The NF-kappaB Family of Transcription Factors and its Regulation. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 1 (4), a000034.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J. S., Moore, K. W., ... Kastelein, R. A. (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, 13(5), 715–725.
- Osburn, W. O., Karim, B., Dolan, P. M., Liu, G., Yamamoto, M., Huso, D. L., & Kensler, T. W. (2007). Increased colonic inflammatory injury and formation of aberrant crypt foci in Nrf2-deficient mice upon dextran sulfate treatment. *International Journal of Cancer*, 121(9), 1883-1891.
- Otani, T., & Furuse, M. (2020). Tight Junction Structure and Function Revisited: (Trends in Cell Biology 30, 805-817, 2020). *Trends in cell biology*, 30(12), 1014.
- Pagano, I., Piccinelli, A. L., Celano, R., Campone, L., Gaggero, P., De Falco, E., et al. (2016). Chemical Profile and Cellular Antioxidant Activity of Artichoke By-Products. *Food Funct.* 7 (12), 4841–4850.
- Pallone, F., & Monteleone, G. (2001). Mechanisms of tissue damage in inflammatory bowel disease. *Current opinion in gastroenterology*, 17(4), 307–312.
- Pandino, G., Courts, F. L., Lombardo, S., Mauromicale, G., & Williamson, G. (2010). Caffeoylquinic acids and flavonoids in the immature inflorescence of globe artichoke, wild cardoon, and cultivated cardoon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 1026-1031.
- Pandino, G., Lombardo, S., Antonino, L. M., Ruta, C., & Mauromicale, G. (2017a). In vitro micropropagation and mycorrhizal treatment influences the polyphenols content profile of globe artichoke under field conditions. *Food Research International*, 99, 385–392.
- Pandino G, Lombardo S, Mauromicale G, Williamson G (2011a) Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. *Food Chem* 126:417–422
- Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., & Williamson, G. (2011b). Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) germplasm. *Journal of food composition and analysis*, 24(2), 148-153.
- Pandino, G., Lombardo, S., Moglia, A., Portis, E., Lanteri, S., & Mauromicale, G. (2015). Leaf polyphenol profile and SSR-based fingerprinting of new segregant *Cynara cardunculus* genotypes. *Frontiers in plant science*, 5, 800.
- Pandino, G., Meneghini, M., Tavazza, R., Lombardo, S., & Mauromicale, G. (2017b). Phytochemicals accumulation and antioxidant activity in callus and suspension cultures of *Cynara scolymus* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 128(1), 223-230.
- Paone, P., & Cani, P. D. (2020). Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners?. *Gut*, 69(12), 2232–2243.
- Paradis, T., Bègue, H., Basmacıyan, L., Dalle, F., & Bon, F. (2021). Tight Junctions as a Key for Pathogens Invasion in Intestinal Epithelial Cells. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2506.
- Paraíso, A. F., Sousa, J. N., Andrade, J., Mangabeira, E. S., Lelis, D. F., de Paula, A., Martins, A., Lima, W., Guimarães, A., Melo, G. A., Schwarz, M., & Santos, S. (2019). Oral gallic acid improves metabolic profile by modulating SIRT1 expression in obese mice brown adipose tissue: A molecular and bioinformatic approach. *Life sciences*, 237, 116914.
- Paray, B. A., Albeshr, M. F., Jan, A. T., & Rather, I. A. (2020). Leaky Gut and Autoimmunity: An Intricate Balance in Individuals Health and the Diseased State. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9770.
- Park, H. Y., Kunitake, Y., Hirasaki, N., Tanaka, M., & Matsui, T. (2015). Theaflavins enhance intestinal barrier of Caco-2 Cell monolayers through the expression of AMP-activated protein kinase-mediated Occludin, Claudin-1, and ZO-1. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 79(1), 130–137.
- Pasparakis M. (2012). Role of NF-κB in epithelial biology. *Immunological reviews*, 246(1), 346–358.

- Pelaseyed, T., Bergström, J. H., Gustafsson, J. K., Ermund, A., Birchenough, G. M., Schütte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Nyström, E. E., Wising, C., Johansson, M. E., & Hansson, G. C. (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological reviews*, 260(1), 8–20.
- Peng, L., Li, Z. R., Green, R. S., Holzman, I. R., & Lin, J. (2009). Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *The Journal of nutrition*, 139(9), 1619–1625.
- Pil Hwang, Y., Gyun Kim, H., Choi, J. H., Truong Do, M., Tran, T. P., Chun, H. K., Chung, Y. C., Jeong, T. C., & Jeong, H. G. (2013). 3-Caffeoyl, 4-dihydrocaffeoylquinic acid from *Salicornia herbacea* attenuates high glucose-induced hepatic lipogenesis in human HepG2 cells through activation of the liver kinase B1 and silent information regulator T1/AMPK-dependent pathway. *Molecular nutrition & food research*, 57(3), 471–482.
- Pires, W., Veneroso, C. E., Wanner, S. P., Pacheco, D. A. S., Vaz, G. C., Amorim, F. T., Tonoli, C., Soares, D. D., & Coimbra, C. C. (2017). Association Between Exercise-Induced Hyperthermia and Intestinal Permeability: A Systematic Review. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 47(7), 1389–1403.
- Plevy, S. E., Landers, C. J., Prehn, J., Carramanzana, N. M., Deem, R. L., Shealy, D., & Targan, S. R. (1997). A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 159(12), 6276–6282.
- Pongkorpsakol P, Buasakdi C, Chantivas T, Chatsudthipong V, Muanprasat C (2019) An agonist of a zinc-sensing receptor GPR39 enhances tight junction assembly in intestinal epithelial cells via an AMPK-dependent mechanism. *Eur J Pharmacol* 842:306–313.
- Pongkorpsakol, P., Satianrapapong, W., Wongkrasant, P., Steinhagen, P. R., Tuangkijkul, N., Pathomthongtaweewchai, N., & Muanprasat, C. (2021). Establishment of Intestinal Epithelial Cell Monolayers and Their Use in Calcium Switch Assay for Assessment of Intestinal Tight Junction Assembly. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2367, 273–290.
- Poritz, L. S., Garver, K. I., Green, C., Fitzpatrick, L., Ruggiero, F., and Koltun, W. A. (2007). Loss of the tight junction protein Zo-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J. Surg. Res.* 140, 12–19. doi: 10.1016/j.jss.2006.07.050
- Poritz, L. S., Harris, L. R. III, Kelly, A. A., and Koltun, W. A. (2011). Increase in the tight junction protein claudin-1 in intestinal inflammation. *Dig. Dis. Sci.* 56, 2802–2809. doi: 10.1007/s10620-011-1688-9
- Preiss D, Sattar N (2008) Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clin Sci* 115:141–150
- Pugh, J. N., Impey, S. G., Doran, D. A., Fleming, S. C., Morton, J. P., & Close, G. L. (2017). Acute high-intensity interval running increases markers of gastrointestinal damage and permeability but not gastrointestinal symptoms. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*, 42(9), 941–947.
- Pulito, C., Mori, F., Sacconi, A., Casadei, L., Ferraiuolo, M., Valerio, M. C., Santoro, R., Goeman, F., Maidecchi, A., Mattoli, L., Manetti, C., Di Agostino, S., Muti, P., Blandino, G., & Strano, S. (2015). *Cynara scolymus* affects malignant pleural mesothelioma by promoting apoptosis and restraining invasion. *Oncotarget*, 6(20), 18134–18150.
- Putta, S., Yarla, N. S., Kumar K, E., Lakkappa, D. B., Kamal, M. A., Scotti, L., ... & Aliev, G. (2018). Preventive and therapeutic potentials of anthocyanins in diabetes and associated complications. *Current medicinal chemistry*, 25(39), 5347-5371.
- Quiros, M., & Nusrat, A. (2014). RhoGTPases, actomyosin signaling and regulation of the epithelial Apical Junctional Complex. *Seminars in cell & developmental biology*, 36, 194–203.
- Ramos, P. A., Ferro, A. M., Oliveira, M. M., Gonçalves, S., Freire, C. S., Silvestre, A. J., & Duarte, M. F. (2019). Biosynthesis and bioactivity of *Cynara cardunculus* L. guaianolides and hydroxycinnamic acids: a genomic, biochemical and health-promoting perspective. *Phytochemistry Reviews*, 18(2), 495-526.
- Rechner, A. R., Pannala, A. S., & Rice-Evans, C. A. (2001). Caffeic acid derivatives in artichoke extract are metabolised to phenolic acids in vivo. *Free radical research*, 35(2), 195-202.
- Ren, H., Shao, Y., Wu, C., Ma, X., Lv, C., & Wang, Q. (2020). Metformin alleviates oxidative stress and enhances autophagy in diabetic kidney disease via AMPK/SIRT1-FoxO1 pathway. *Molecular and cellular endocrinology*, 500, 110628.

- Roberts, C. L., Rushworth, S. L., Richman, E., & Rhodes, J. M. (2013). Hypothesis: Increased consumption of emulsifiers as an explanation for the rising incidence of Crohn's disease. *Journal of Crohn's & colitis*, 7(4), 338–341.
- Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P. A., Schölmerich, J., & Gross, V. (1998). Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*, 115(2), 357–369.
- Rondanelli, M., Monteferrario, F., Perna, S., Faliva, M. A., & Opizzi, A. (2013). Health-promoting properties of artichoke in preventing cardiovascular disease by its lipidic and glycemid-reducing action. *Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace*, 80(1), 17–26.
- Rooks, M. G., & Garrett, W. S. (2016). Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature reviews. Immunology*, 16(6), 341–352.
- Ross, F. A., Jensen, T. E., & Hardie, D. G. (2016). Differential regulation by AMP and ADP of AMPK complexes containing different γ subunit isoforms. *The Biochemical journal*, 473(2), 189–199.
- Rouphael, Y., Colla, G., Graziani, G., Ritieni, A., Cardarelli, M., & De Pascale, S. (2017). Phenolic composition, antioxidant activity and mineral profile in two seed-propagated artichoke cultivars as affected by microbial inoculants and planting time. *Food chemistry*, 234, 10-19.
- Ruan, Z., Liu, S., Zhou, Y., Mi, S., Liu, G., Wu, X., Yao, K., Assaad, H., Deng, Z., Hou, Y., Wu, G., & Yin, Y. (2014). Chlorogenic acid decreases intestinal permeability and increases expression of intestinal tight junction proteins in weaned rats challenged with LPS. *PloS one*, 9(6), e97815.
- Ruff, W. E., Greiling, T. M., & Kriegel, M. A. (2020). Host-microbiota interactions in immune-mediated diseases. *Nature reviews. Microbiology*, 18(9), 521–538.
- Russo, A., La Fauci, L., Acquaviva, R., Campisi, A., Raciti, G., Scifo, C., Renis, M., Galvano, G., Vanella, A., & Galvano, F. (2005). Ochratoxin A-induced DNA damage in human fibroblast: protective effect of cyanidin 3-O-beta-d-glucoside. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(1), 31–37.
- Sabater, C., Corzo, N., Olano, A., & Montilla, A. (2018). Enzymatic extraction of pectin from artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-products using Celluclast[®] 1.5L. *Carbohydrate polymers*, 190, 43–49.
- Sabater, C., Olano, A., Corzo, N., & Montilla, A. (2019). GC–MS characterisation of novel artichoke (*Cynara scolymus*) pectic-oligosaccharides mixtures by the application of machine learning algorithms and competitive fragmentation modelling. *Carbohydrate polymers*, 205, 513-523.
- Safaa HM, Hanaa HA, Abdelrazik HF, Nahla SA, Abdelaaty AS (2013) *Cynara scolymus* for relieving on nonalcoholic steatohepatitis induced in rats. *Int J Pharm Pharm Sci* 1:57–66
- Saha, S., Buttari, B., Panieri, E., Profumo, E., and Saso, L. (2020). An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and its Role in Inflammation. *Molecules* 25(22).
- Sahebkar, A., Pirro, M., Banach, M., Mikhailidis, D. P., Atkin, S. L., & Cicero, A. F. (2018). Lipid-lowering activity of artichoke extracts: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(15), 2549-2556.
- Salekzamani, S., Ebrahimi-Mameghani, M., & Rezazadeh, K. (2019). The antioxidant activity of artichoke (*Cynara scolymus*): A systematic review and meta-analysis of animal studies. *Phytotherapy research*, 33(1), 55-71.
- Salomone, F., Barbagallo, I., Godos, J., Lembo, V., Currenti, W., Cinà, D., Avola, R., D'Orazio, N., Morisco, F., Galvano, F., & Li Volti, G. (2017). Silibinin Restores NAD⁺ Levels and Induces the SIRT1/AMPK Pathway in Non-Alcoholic Fatty Liver. *Nutrients*, 9(10), 1086.
- Salvo Romero, E., Alonso Cotoner, C., Pardo Camacho, C., Casado Bedmar, M., & Vicario, M. (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev Esp Enferm Dig*, 107(11), 686-96.
- Santo Domingo, C., Soria, M., Rojas, A. M., Fissore, E. N., & Gerschenson, L. N. (2015). Protease and hemicellulase assisted extraction of dietary fiber from wastes of *Cynara cardunculus*. *International journal of molecular sciences*, 16(3), 6057-6075.
- Santos, H. O., Bueno, A. A., & Mota, J. F. (2018). The effect of artichoke on lipid profile: A review of possible mechanisms of action. *Pharmacological research*, 137, 170–178.
- Scheibe, R. J., Kuehl, H., Krautwald, S., Meissner, J. D., & Mueller, W. H. (2000). Ecto-alkaline phosphatase activity identified at physiological pH range on intact P19 and HL-60 cells is induced by retinoic acid. *Journal of cellular biochemistry*, 76(3), 420–436.

- Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008). Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative C(T)Method. *Nat. Protoc.* 3 (6), 1101–1108
- Schütz, K., Kammerer, D., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(13), 4090-4096.
- Schütz, K., Muks, E., Carle, R., & Schieber, A. (2006a). Quantitative determination of phenolic compounds in artichoke-based dietary supplements and pharmaceuticals by high-performance liquid chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(23), 8812-8817.
- Schütz, K., Persike, M., Carle, R., & Schieber, A. (2006b). Characterization and quantification of anthocyanins in selected artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars by HPLC–DAD–ESI–MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 384(7), 1511-1517.
- Serra, D., Almeida, L. M., and Dinis, T. C. (2016). Anti-inflammatory protection Afforded by Cyanidin-3-Glucoside and Resveratrol in Human Intestinal Cells via Nrf2 and PPAR- γ : Comparison with 5-aminosalicylic Acid. *Chem. Biol. Interact* 260, 102–109.
- Sheibanie, A. F., Yen, J. H., Khayrullina, T., Emig, F., Zhang, M., Tuma, R., et al. (2007). The Proinflammatory Effect of Prostaglandin E2 in Experimental Inflammatory Bowel Disease Is Mediated through the IL-23-->IL-17 axis. *J. Immunol.* 178 (12), 8138–8147.
- Shen, L., Black, E. D., Witkowski, E. D., Lencer, W. I., Guerriero, V., Schneeberger, E. E., & Turner, J. R. (2006). Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *Journal of cell science*, 119(Pt 10), 2095–2106.
- Shen, L., Weber, C. R., Raleigh, D. R., Yu, D., & Turner, J. R. (2011). Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annual review of physiology*, 73, 283.
- Shimizu, S., Ishihara, N., Umehara, K., Miyase, T., & Ueno, A. (1988). Sesquiterpene glycosides and saponins from *Cynara cardunculus* L. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 36(7), 2466-2474.
- Shimoda, H., Ninomiya, K., Nishida, N., Yoshino, T., Morikawa, T., Matsuda, H., & Yoshikawa, M. (2003). Anti-hyperlipidemic sesquiterpenes and new sesquiterpene glycosides from the leaves of artichoke (*Cynara scolymus* L.): structure requirement and mode of action. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 13(2), 223-228.
- Siebenlist, U., Brown, K., & Claudio, E. (2005). Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. *Nature reviews. Immunology*, 5(6), 435–445.
- Simsek, E. N., & Uysal, T. (2013). In vitro investigation of cytotoxic and apoptotic effects of *Cynara* L. species in colorectal cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(11), 6791-6795.
 - Sobczak, M., Fabisiak, A., Murawska, N., Wesołowska, E., Wierzbicka, P., Wlazłowski, M., et al. (2014). Current Overview of Extrinsic and Intrinsic Factors in Etiology and Progression of Inflammatory Bowel Diseases. *Pharmacol. Rep.* 66 (5), 766–775.
- Song, J. C., Hanson, C. M., Tsai, V., Farokhzad, O. C., Lotz, M., & Matthews, J. B. (2001). Regulation of epithelial transport and barrier function by distinct protein kinase C isoforms. *American journal of physiology. Cell physiology*, 281(2), C649–C661.
- Sonnante G, Pignone D, Hammer K (2007) The domestication of artichoke and cardoon: from Roman times to the genomic age. *Ann Bot* 100:1095–1100
- Speciale, A., Anwar, S., Canali, R., Chirafisi, J., Saija, A., Virgili, F., & Cimino, F. (2013). Cyanidin-3-O-glucoside counters the response to TNF- α of endothelial cells by activating Nrf2 pathway. *Molecular nutrition & food research*, 57(11), 1979–1987.
- Speciale, A., Anwar, S., Ricciardi, E., Chirafisi, J., Saija, A., and Cimino, F. (2011a). Cellular Adaptive Response to Glutathione Depletion Modulates Endothelial Dysfunction Triggered by TNF- α . *Toxicol. Lett.* 207 (3), 291–297.
- Speciale, A., Chirafisi, J., Saija, A., and Cimino, F. (2011b). Nutritional Antioxidants and Adaptive Cell Responses: An Update. *Curr. Mol. Med.* 11 (9), 770–789.
- Speciale, A., Muscarà, C., Molonia, M. S., Toscano, G., Cimino, F., & Saija, A. (2022). *In Vitro* Protective Effects of a Standardized Extract From *Cynara Cardunculus* L. Leaves Against TNF- α -Induced Intestinal Inflammation. *Frontiers in pharmacology*, 13, 809938.
- Steinberg, G. R., & Kemp, B. E. (2009). AMPK in Health and Disease. *Physiological reviews*, 89(3), 1025–1078.

- Suenart P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Van Assche G, Geboes K, Ceuppens JL, Rutgeerts P (2002) Antitumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 97:2000–2004
- Sun, X., Du, M., Navarre, D. A., & Zhu, M. J. (2018a). Purple Potato Extract Promotes Intestinal Epithelial Differentiation and Barrier Function by Activating AMP-Activated Protein Kinase. *Molecular nutrition & food research*, 62(4), 10.1002/mnfr.201700536.
- Sun, X., Fu, X., Du, M., & Zhu, M. J. (2018b). *Ex vivo* gut culture for studying differentiation and migration of small intestinal epithelial cells. *Open biology*, 8(4), 170256.
- Sun, X., Yang, Q., Rogers, C. J., Du, M., & Zhu, M. J. (2017). AMPK improves gut epithelial differentiation and barrier function via regulating Cdx2 expression. *Cell death and differentiation*, 24(5), 819–831.
- Sun, X., & Zhu, M. J. (2017). AMP-activated protein kinase: a therapeutic target in intestinal diseases. *Open biology*, 7(8), 170104.
- Suzuki, A., Palmer, G., Bonjour, J. P., & Caverzasio, J. (1999). Regulation of alkaline phosphatase activity by p38 MAP kinase in response to activation of Gi protein-coupled receptors by epinephrine in osteoblast-like cells. *Endocrinology*, 140(7), 3177–3182.
- Suzuki T. (2013). Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 70(4), 631–659.
- Suzuki, T. (2020). Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Animal Science Journal*, 91(1), e13357.
- Takei, K., Hashimoto-Hachiya, A., Takahara, M., Tsuji, G., Nakahara, T., & Furue, M. (2015). Cynaropicrin attenuates UVB-induced oxidative stress via the AhR–Nrf2–Nqo1 pathway. *Toxicology Letters*, 234(2), 74–80.
- Tang, X., Wei, R., Deng, A., & Lei, T. (2017). Protective effects of ethanolic extracts from artichoke, an edible herbal medicine, against acute alcohol-induced liver injury in mice. *Nutrients*, 9(9), 1000.
- Teixeira, J., Chavarria, D., Borges, F., Wojtczak, L., Wieckowski, M. R., Karkucinska-Wieckowska, A., et al. (2019). Dietary Polyphenols and Mitochondrial Function: Role in Health and Disease. *Curr. Med. Chem.* 26 (19), 3376–3406.
- Thomson, A. B., Gupta, M., and Freeman, H. J. (2012). Use of the Tumor Necrosis Factor-Blockers for Crohn's Disease. *World J. Gastroenterol.* 18 (35), 4823–4854.
- Trifan, A., Stanciu, C., Girleanu, I., Stoica, O. C., Singeap, A. M., Maxim, R., Chiriac, S. A., Ciobica, A., & Boiculescu, L. (2017). Proton pump inhibitors therapy and risk of Clostridium difficile infection: Systematic review and meta-analysis. *World journal of gastroenterology*, 23(35), 6500–6515.
- Trombetta, D., Cimino, F., Cristani, M., Mandalari, G., Saija, A., Ginestra, G., et al. (2010). In Vitro protective Effects of Two Extracts from Bergamot Peels on Human Endothelial Cells Exposed to Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-Alpha). *J. Agric. Food Chem.* 58 (14), 8430–8436.
- Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M., and Margioris, A. N. (2006). Signalling Networks Regulating Cyclooxygenase-2. *Int. J. Biochem. Cel Biol* 38 (10), 1654–1661
- Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature reviews immunology*, 9(11), 799–809.
- Ulluwishewa, D., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., Wells, J. M., & Roy, N. C. (2011). Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *The Journal of nutrition*, 141(5), 769–776.
- Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E., & Spector, T. D. (2018). Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ (Clinical research ed.)*, 361, k2179.
- Van der Sluis, M., De Koning, B. A., De Bruijn, A. C., Velcich, A., Meijerink, J. P., Van Goudoever, J. B., Büller, H. A., Dekker, J., Van Seuning, I., Renes, I. B., & Einerhand, A. W. (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*, 131(1), 117–129.
- Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annual Review of Physiology*, 68, 403–429
- Vancamelbeke, M., & Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 11(9), 821–834.
- Vasiluk, L., Pinto, L. J., & Moore, M. M. (2005). Oral bioavailability of glyphosate: studies using two intestinal cell lines. *Environmental toxicology and chemistry*, 24(1), 153–160.

- Vemuri, R., Shankar, E. M., Chieppa, M., Eri, R., & Kavanagh, K. (2020). Beyond Just Bacteria: Functional Biomes in the Gut Ecosystem Including Virome, Mycobiome, Archaeome and Helminths. *Microorganisms*, 8(4), 483.
- Vetrano S, Rescigno M, Cera MR, Correale C, Rumio C, Doni A, Fantini M, Sturm A, Borroni E, Repici A, Locati M, Malesci A, Dejana E, Danese S (2008) Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 135:173–184
- Volker S, Rudolf H, Rational Phytotherapy (2004) A reference guide for physicians and pharmacists by springer 417:232–240
- Walker, A. F., Middleton, R. W., & Petrowicz, O. (2001). Artichoke leaf extract reduces symptoms of irritable bowel syndrome in a post-marketing surveillance study. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 15(1), 58-61.
- Walsh, S. V., Hopkins, A. M., Chen, J., Narumiya, S., Parkos, C. A., & Nusrat, A. (2001). Rho kinase regulates tight junction function and is necessary for tight junction assembly in polarized intestinal epithelia. *Gastroenterology*, 121(3), 566–579.
- Wang, F., Schwarz, B. T., Graham, W. V., Wang, Y., Su, L., Clayburgh, D. R., Abraham, C., & Turner, J. R. (2006). IFN- γ -induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction. *Gastroenterology*, 131(4), 1153–1163.
- Wang, K., Jin, X., Chen, Y., Song, Z., Jiang, X., Hu, F., Conlon, M. A., & Topping, D. L. (2016). Polyphenol-Rich Propolis Extracts Strengthen Intestinal Barrier Function by Activating AMPK and ERK Signaling. *Nutrients*, 8(5), 272.
- Wang L, Walia B, Evans J, Gewirtz AT, Merlin D, Sitaraman SV. IL-6 induces NF-kappa B activation in the intestinal epithelia. *J Immunol* 2003; 171: 3194–201.
- Wang M, Simon JE, Aviles IF, Zheng HeK QY, Tadmor Y (2003) Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J Agric Food Chem* 51:601–608
- Wang, S., Moustaid-Moussa, N., Chen, L., Mo, H., Shastri, A., Su, R., Bapat, P., Kwun, I., & Shen, C. L. (2014). Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *The Journal of nutritional biochemistry*, 25(1), 1–18.
- Wang, X., & Seed, B. (2003). A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic acids research*, 31(24), e154.
- Watson, C. J., Hoare, C. J., Garrod, D. R., Carlson, G. L., & Warhurst, G. (2005). Interferon- γ selectively increases epithelial permeability to large molecules by activating different populations of paracellular pores. *Journal of cell science*, 118(22), 5221-5230.
- Weber, C. R., & Turner, J. R. (2007). Inflammatory bowel disease: is it really just another break in the wall?. *Gut*, 56(1), 6–8.
- Wennerberg, K., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science*, 118(Pt 5), 843–846.
- Wider, B., Pittler, M. H., Thompson-Coon, J., & Ernst, E. (2009). Artichoke leaf extract for treating hypercholesterolaemia. *The Cochrane database of systematic reviews*, (4), CD003335.
- Wittemer, S. M., M. Ploch, T. Windeck, S. C. Müller, B. Drewelow, H. Derendorf, and M. Veit. "Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of Artichoke leaf extracts in humans." *Phytomedicine* 12, no. 1-2 (2005): 28-38.
- Wongkrasant P, Pongkorsakol P, Ariyadamrongkwan J, Meesomboon R, Satitsri S, Pichyangkura R, Barrett KE, Muanprasat C (2020) A prebiotic fructooligosaccharide promotes tight junction assembly in intestinal epithelial cells via an AMPKdependent pathway. *Biomed Pharmacother* 129:110415.
- Xia, N., Pautz, A., Wollscheid, U., Reifenberg, G., Förstermann, U., & Li, H. (2014). Artichoke, cynarin and cyanidin downregulate the expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary smooth muscle cells. *Molecules*, 19(3), 3654-3668.
- Xu, P., Elamin, E., Elizalde, M., Bours, P. P. H. A., Pierik, M. J., Masclee, A. A. M., & Jonkers, D. M. A. E. (2019). Modulation of Intestinal Epithelial Permeability by Plasma from Patients with Crohn's Disease in a Three-dimensional Cell Culture Model. *Scientific reports*, 9(1), 2030.
- Yang, P. C., He, S. H., & Zheng, P. Y. (2007). Investigation into the signal transduction pathway via which heat stress impairs intestinal epithelial barrier function. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 22(11), 1823–1831.

- Ye, D., and Ma, T. Y. (2008). Cellular and molecular mechanisms that mediate basal and tumour necrosis factor- α -induced regulation of myosin light chain kinase gene activity. *J. Cell Mol. Med.* 12, 1331–1346.
- Yenişehirli, A., & Onur, R. (2006). Specific H⁺/K⁺-ATPase inhibitors decreased contractile responses of isolated rat vas deferens. *Pharmacological research*, 54(6), 397–405.
- Yu, L. C., Wang, J. T., Wei, S. C., & Ni, Y. H. (2012). Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 3(1), 27–43.
- Yuan, J., Che, S., Zhang, L., and Ruan, Z. (2021). Reparative Effects of Ethanol-Induced Intestinal Barrier Injury by Flavonoid Luteolin via MAPK/NF- κ B/MLCK and Nrf2 Signaling Pathways. *J. Agric. Food Chem.* 69 (14), 4101–4110.
- Zahs, A., Bird, M. D., Ramirez, L., Turner, J. R., Choudhry, M. A., & Kovacs, E. J. (2012). Inhibition of long myosin light-chain kinase activation alleviates intestinal damage after binge ethanol exposure and burn injury. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 303(6), G705–G712.
- Zayed, A., Serag, A., & Farag, M. A. (2020). Cynara cardunculus L.: Outgoing and potential trends of phytochemical, industrial, nutritive and medicinal merits. *Journal of Functional Foods*, 69, 103937.
- Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2007) Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 56:61–72
- Zhang, D. D., and Hannink, M. (2003). Distinct Cysteine Residues in Keap1 Are Required for Keap1-dependent Ubiquitination of Nrf2 and for Stabilization of Nrf2 by Chemopreventive Agents and Oxidative Stress. *Mol. Cell Biol* 23 (22), 8137–8151.
- Zhang, L., Li, J., Young, L. H., & Caplan, M. J. (2006). AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), 17272–17277.
- Zhang, Q. J., Wang, Z., Chen, H. Z., Zhou, S., Zheng, W., Liu, G., Wei, Y. S., Cai, H., Liu, D. P., & Liang, C. C. (2008). Endothelium-specific overexpression of class III deacetylase SIRT1 decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovascular research*, 80(2), 191–199.
- Zhang, X., & Gao, N. (2016). RAB and RHO GTPases regulate intestinal crypt cell homeostasis and enterocyte function. *Small GTPases*, 7(2), 59–64.
- Zhang, Y. Z., & Li, Y. Y. (2014). Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World journal of gastroenterology*, 20(1), 91–99.
- Zhang, Z., Wu, X., Cao, S., Cromie, M., Shen, Y., Feng, Y., et al. (2017). Chlorogenic Acid Ameliorates Experimental Colitis by Promoting Growth of Akkermansia in Mice. *Nutrients* 9(7).
- Zheng, B., & Cantley, L. C. (2007). Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(3), 819–822.
- Zhou, Y., Jiang, Z., Lu, H., Xu, Z., Tong, R., Shi, J., et al. (2019). Recent Advances of Natural Polyphenols Activators for Keap1-Nrf2 Signaling Pathway. *Chem. Biodivers* 16 (11), e1900400
- Zhou, Y., Ruan, Z., Zhou, L., Yang, Y., Mi, S., Deng, Z., & Yin, Y. (2016). Chlorogenic acid decreased intestinal permeability and ameliorated intestinal injury in rats via amelioration of mitochondrial respiratory chain dysfunction. *Food science and biotechnology*, 25(1), 253–260.
- Zhu, M. J., Sun, X., & Du, M. (2018). AMPK in regulation of apical junctions and barrier function of intestinal epithelium. *Tissue barriers*, 6(2), 1-13.
- Zhu X, Zhang H, Lo R (2004) Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara Scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *J Agric Food Chem* 52:7272–7278
- Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature reviews Molecular cell biology*, 17(9), 564-580.
- Zuo, L., Li, Y., Wang, H., Wu, R., Zhu, W., Zhang, W., Cao, L., Gu, L., Gong, J., Li, N., & Li, J. (2014). Cigarette smoking is associated with intestinal barrier dysfunction in the small intestine but not in the large intestine of mice. *Journal of Crohn's & colitis*, 8(12), 1710–1722.