

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE  
NATURALI E AMBIENTE

Dipartimento di BIOMEDICINA COMPARATA E ALIMENTAZIONE

Corso di laurea in Scienze e tecnologie animali

DETERMINAZIONE DELL'OSSIDAZIONE DELLE  
PROTEINE NEL SIERO DI LATTE COME MARCATORI DI  
STRESS OSSIDATIVO

Relatore

Prof. Gianfranco Gabai

Laureanda

Diletta Schievano

Matricola n. 617414

ANNO ACCADEMICO 2012-201



## **INDICE**

### **1. PREFERAZIONE E SCOPO**

### **2. INTRODUZIONE**

#### **2.1. INFIAMMAZIONE**

2.1.1. Processo infiammatorio

2.1.2. Processo infiammatorio nella ghiandola mammaria: mastite

2.1.3. Ruolo dei Neutrofili

#### **2.2. STRESS OSSIDATIVO**

2.2.1. Radicali liberi (ROS)

2.2.2. Antiossidanti

2.2.3. Ossidazione delle proteine

#### **2.3. INDICATORI DI OSSIDAZIONE PROTEICA COME MARCATORI DI STRESS OSSIDATIVO**

2.3.1.1. AOPP

2.3.1.2. Ditirosine

2.3.1.3. Carbonili

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1. CAMPIONI DI LATTE**

#### **3.2. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**

3.2.1. Frazionamento delle proteine del latte mediante  
ultracentrifugazione

3.2.1.1. Ossidazione del siero mediante HOCl

3.2.2. Preparazione AOPP-bLG

#### **3.3. PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DI HOCl**

3.4. DOSAGGIO DELLE AOPP

3.5. DOSAGGIO DELLE DITIROSSINE

3.6. DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA TOTALE

3.7. SDS-PAGE

3.7.1. Preparazione dei campioni

3.7.2. Separazione elettroforetica

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. CURVE DOSE-RISPOSTA

4.1.1. Ossidazione del siero di latte con HOCl

4.1.2. Ossidazione della  $\beta$ -lattoglobulina

4.1.3. Test di recupero della  $\beta$ -lattoglobulina nel siero di latte

4.2. RELAZIONE TRA LA CONTA DELLE CELLULE SOMATICHE (SCC) E I  
MARCATORI DELL'OSSIDAZIONE

## 5.CONCLUSIONE

## 6.BIBLIOGRAFIA

## Riassunto

Lo scopo del presente studio è stato quello di caratterizzare indicatori delle proteine nel siero di latte della specie bovina, sviluppando la metodica del dosaggio delle AOPP e delle ditirosine. Per validare le metodiche è stato necessario riprodurre "in vitro" ciò che potrebbe accadere alle proteine del latte in caso di infiammazione alla ghiandola mammaria e studiare la relazione tra l'entità dello stimolo e il grado della risposta. Sono stati quindi presi dei campioni di latte proveniente da vacche clinicamente sane, ultracentrifugati, per ottenere il siero ed esposti a concentrazioni crescenti di HOCl per valutare se sia possibile misurare l'aumento della formazione dei prodotti delle proteine ossidate. Successivamente è stata effettuata una prova di recupero aggiungendo quantità note di  $\beta$ -lattoglobulina ossidata con HOCl ai campioni di latte e si è misurato l'aumento degli indicatori oggetto dello studio. Infine sono state studiate le relazioni tra la conta cellule somatiche e AOPP e ditirosine in animali sani ( $SCC \leq 200.000/ml$ ) e con processi infiammatori in atto ( $SCC > 200.000/ml$ ), avvalorando l'ipotesi che AOPP e ditrosine siano degli indicatori specifici dell'ossidazione proteica da parte di ossidanti clorurati di origine neutrofilica.

## Abstract:

The aim of this study was to characterize markers of oxidation of proteins in whey of cattle and to develop and validate the assay for AOPP and dityrosine measurement. To validate the methods it was necessary to reproduce "in vitro" what might happen to milk proteins in case of inflammation of the mammary gland, and to study the relationship between the size of the stimulus and the degree of the response. Milk samples were taken from clinically healthy cows, ultracentrifuged to obtain the whey and exposed to increasing concentrations of HOCl to assess an increase in the formation of the products of oxidized proteins. Subsequently the recovery test was performed by adding known amount of oxidized  $\beta$ -lactoglobulin to milk samples and measure the increase in AOPP and dityrosines. Finally we have studied the relationship between indicators of the inflammatory process (somatic cell count) and AOPP and dityrosine in healthy animals ( $CCS \leq 200.000/ml$ ) and in animals with an inflammatory processes in place ( $CCS \geq 200.000/ml$ ), supporting the hypothesis that AOPP and dityrosine are specific indicators of protein oxidation by chlorinated oxidants of neutrophilic origin.

## 1. PREFERAZIONE E SCOPO



Negli ultimi anni la ricerca ha dimostrato grande interesse verso lo stress ossidativo e i prodotti dell'ossidazione da esso prodotti, poiché correlati con numerose malattie (Fujii et al, 2005). Alla luce di questo, lo stress ossidativo ha suscitato attenzioni particolari nell'ambito della medicina e dell'allevamento delle bovine da latte.

Lo stress ossidativo è uno squilibrio tra produzione di specie reattive all'ossigeno (ROS) e capacità di neutralizzazione di meccanismi antiossidanti (Sies,1991). Nei mammiferi l'accumulo di ROS è responsabile di danni tissutali e lo stress ossidativo è associato a numerose patologie (Sordillo e Aitiken, 2009).

Per la vacca da latte il periodo di transizione costituisce un momento molto critico sotto l'aspetto dello stress ossidativo e almeno tre possibili cause di stress ossidativo sono state identificate. La prima è legata al cambiamento metabolico cellulare e alla mobilitazione di riserve corporee tipiche del periodo di transizione, che si riflettono in aumento di radicali liberi (Barnabucci et al, 2005; Castillo et al, 2005).

La seconda è riconducibile ai radicali liberi prodotti dall'azione del sistema immunitario post partum, quando la contaminazione batterica uterina può indurre un forte coinvolgimento di neutrofili, la cui azione ossigeno-dipendente aumenta i ROS, responsabili di infiammazione e danni tissutali locali (Loisielle et al, 2009; Bondurant, 1999).

Infine la ghiandola mammaria può essere causa di stress ossidativo durante il processo di involuzione e sostituzione delle cellule epiteliali mammarie che iniziano con l'asciutta (Holst et al, 1987; Wilde et al, 1997; Silanikove et al, 2005).

La fase di asciutta rappresenta un momento essenziale per la sostituzione delle cellule mammarie epiteliali senescenti e, quindi, per la massimazione della produzione di latte nella successiva lattazione (Capuco et Al, 1997). Durante il periodo di periparto nelle bovine è molto diffusa la condizione di stress ossidativo, con elevata produzione di ROS in risposta all'alta produzione di latte. La stessa ghiandola mammaria può diventare una fonte di ROS con un conseguente marcato danneggiamento e invecchiamento dei tessuti mammari. Risultati preliminari indicano che l'omissione dell'asciutta può avere degli effetti sullo stress ossidativo della bovina ( Mantovani et al, 2010).

Si è riscontrato che le concentrazioni nel sangue di antiossidanti e prodotti dello stress ossidativo possono non rappresentare la situazione di stress ossidativo di altri organi; per questo motivo potrebbe essere utile misurare gli indicatori di stress ossidativo nella ghiandola mammaria. I livelli dei prodotti dello stress ossidativo e la concentrazione di antiossidanti nel colostro e nel latte possono rispecchiare meglio lo stress ossidativo della ghiandola mammaria, fornendo importanti informazioni circa le proprietà protettive del latte per il neonato e per la ghiandola stessa (Lindmark-Masson & Akesson, 2000).

L'aspetto innovativo di questo studio sarà quindi l'applicazione della misura dei prodotti di ossidazione delle proteine come marcatore di stress ossidativo nei campioni di latte.

Poiché tali marcatori sono poco costosi e semplici da realizzare, e non sono mai stati applicati nel bovino, appare interessante investigare la possibilità della loro applicazione per monitorare lo stato di stress ossidativo della ghiandola mammaria. Se si proverà che la loro sensibilità sarà sufficiente per misurare i prodotti dell'ossidazione proteica nel latte, avremo a disposizione degli interessanti strumenti per misurare il livello mammario di stress ossidativo.

Il fatto su cui si basa l'ipotesi è che tra due successive mungiture la maggior parte del latte risiede nei dotti e negli alveoli per un periodo sufficientemente lungo da permettere alle proteine del latte di essere esposte ai ROS provenienti dalle cellule mammarie circostanti. Nella ghiandola mammaria in involuzione esistono dei sistemi che generano ROS, come la Xantine ossidasi e la lattoperossidasi, i quali fanno parte del sistema immunitario aspecifico residente nella ghiandola (Silankove et al,2005).

Una relazione tra il danno ossidativo ai mitocondri delle cellule mammarie e la perdita di funzionalità delle cellule mammarie è stata osservata nel caso di lattazioni prolungate (Hadsell et al, 2006).

La necessità di monitorare più parametri risiede nel fatto che diversi radicali possono produrre diverse alterazioni sulla struttura delle proteine (Kerkaert et al, 2011) e, quindi, si propone un panel di marcatori che possa meglio caratterizzare lo stato di stress ossidativo. Poiché le siero proteine sembrano più suscettibili all'ossidazione delle caseine (Kerkaert et al,2011; Zhu et al,2010), è previsto un approccio preliminare "in

vitro” per studiare la formazione di prodotti di ossidazione proteica in proteine standard e in campioni di latte intero sgrassato.

Per individuare la presenza di stress ossidativo sono stati presi in considerazione quindi dei marcatori biologici, i prodotti dell'ossidazione delle proteine come “advanced oxidation protein products”(AOPP), ditirosine e carbonili, poiché appunto i livelli dei prodotti dello stress ossidativo e degli antiossidanti nel colostro e nel latte possono meglio esprimere lo stato ossidativo della ghiandola mammaria.

Lo scopo della presente tesi è di esplorare la possibilità di misurare alcuni indicatori dell'ossidazione delle proteine (AOPP e ditirosine) nel siero di latte. Nella tesi verranno fornite le prime indicazioni sulla messa a punto del procedimento analitico e alcune informazioni preliminari tra questi indicatori ed i fenomeni infiammatori a carico della ghiandola mammaria.

## 2. INTRODUZIONE



## **2.1. INFIAMMAZIONE**

### **2.1.1. Processo infiammatorio**

L'infiammazione è una risposta dell' organismo ai danni legati ad insulti chimici, fisici o a microrganismi e loro tossine. Essa mira ad inattivare o distruggere il patogeno coinvolto, rimuovere le sostanze irritanti e porre le basi per la riparazione tissutale (Guzik et al, 2003). Il processo infiammatorio può essere differenziato in acuto o cronico. La forma acuta ha un esordio rapido, una durata breve ed è contraddistinta dall'essudazione e dalla migrazione leucocitaria. L'infiammazione cronica ha una maggiore durata ed è associata alla presenza di linfociti e macrofagi, proliferazione dei vasi sanguigni, fibrosi e necrosi tissutale (Kumar et al, 2005)

### **2.1.2. Processo infiammatorio nella ghiandola mammaria: MASTITE**

La mastite rappresenta la malattia infettiva con risvolti economici più rilevanti nell'allevamento della bovina da latte ( Zhao and Lacasse, 2007).

E' causata da diversi agenti patogeni come streptococchi, stafilococchi, coliformi, arcano batteri, microplasma, leptospire o funghi. Se in forma contagiosa, causata da stafilococchi e streptococchi, spesso subclinica, può essere trasmessa durante processi di mungitura. Oppure dovuta ad imbrattamenti della mammella nel tempo che intercorre tra due mungiture (Edmonson and Bramely, 2004).

La cheratina che si trova a livello del dotto papillare rappresenta una barriera fisica e chimica nei confronti degli agenti patogeni (Capuco et al, 1992). Una volta oltrepassato questo primo ostacolo, i microrganismi devono superare meccanismi di difesa cellulare e umorale della ghiandola stessa per poter dare origine ad un processo infettivo (Sordillo and Streicher, 2002). Se l'infezione persiste il danno cellulare del tessuto mammario peggiora: questo comporta la perdita di integrità della barriera emato-mammaria con conseguente miscelazione del liquido extracellulare col latte (Zhao and Lacasse, 2007).

A seguito dell'invasione da parte dei microrganismi, il tessuto rilascia sostanze chemotattiche che richiamano i leucociti polimorfonucleati: questi hanno il compito di distruggere l'agente patogeno tramite meccanismi ossigeno-dipendenti e ossigeno-indipendenti. Tuttavia, l'azione dei leucociti neutrofili può presentare dei risvolti negativi: l'attivazione del "respiratory burst" e il rilascio di enzimi contenuti nei granuli, che possono contribuire a peggiorare il danno tissutale e ad alterare la normale funzionalità della ghiandola mammaria (Paape et al, 2002).

Nelle mastiti clinicamente evidenti si notano gonfiore, dolore e aumento di consistenza della mammella, spesso associati con anoressia e piressia fino al decubito nelle forme più gravi. Inoltre, le secrezioni di latte possono presentare coaguli o addirittura striature di sangue (Edmonson and Bramely, 2004).

Diversamente nelle forme subcliniche l'unico indice che può confermare la presenza di un'inflammatione a carico della ghiandola mammaria è il numero di cellule somatiche del latte: queste comprendono neutrofili, macrofagi e linfociti. Nella maggior parte delle vacche sane questo valore risulta essere inferiore a 50.000 cellule per millilitro di latte (Edmonson and Bramely, 2004).

Nonostante la maggior parte della popolazione leucocitaria normalmente presente nel latte sia rappresentata da linfociti e macrofagi, spetta ai neutrofili il sistema più efficace di difesa della ghiandola mammaria: il numero di questi ultimi tende ad aumentare infatti rapidamente nelle prime fasi di infezione (Hibbit et al, 2004).

#### **2.1.1.1. Funzione dei neutrofili**

I neutrofili hanno lo scopo di eliminare le sostanze estranee e attivano quindi dei meccanismi ossigeno-dipendenti dando origine al fenomeno che prende il nome di "respiratory burst", con un aumento delle richieste di ossigeno da parte delle cellule coinvolte, glicogenolisi, aumento dell'ossidazione del glucosio attraverso la via dell'esoso monofosfato e produzione di ROS (Kumar et al, 2005).

Le specie reattive dell'ossigeno prodotte in misura maggiore sono l'anione superossido ( $O_2^-$ ) e il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), derivanti dall'attività

dell'enzima nicotinamide-adenina-dinucleotide-ossidasi (NADPH ossidasi) (Robinson et al, 2004).

Una buona parte del perossido di idrogeno prodotto dai neutrofili viene convertita ad acido ipocloroso, un potente microbicida, ad opera dell'enzima mieloperossidasi (MPO).

L'acido ipocloroso ha capacità ossidanti dato che nella sua molecola è presente un atomo di cloro con numero di ossidazione +1, è quindi una specie altamente reattiva, che subisce sia l'ossidazione che la reazione di clorurazione. In molte circostanze risulta essere il principale e il più forte ossidante prodotto dai neutrofili. I tioli e i gruppi tioeterei della metionina sono i substrati più reattivi per l'ossidazione. Le principali clorinazioni biologiche sono con gruppi amminici per dare clorammine (amine clorate in cui l'azoto ha numero di ossidazione -3), con residui tirosinici per dare prodotti clorurati ad anello, e con nucleotidi piridinici, lipidi insaturi e colesterolo per dare cloridine (un gruppo idrossi ed un atomo di cloro). Le clorammine conservano una parte delle capacità ossidante dell'HOCl, mentre gli altri prodotti clorurati sono stabili. Alte concentrazioni di HOCl sono citotossiche mentre concentrazioni inferiori sono in grado di attivare percorsi MAPkinasi e causare arresti alla crescita e apoptosi (Winterbourn, 2002).

## **2.2. STRESS OSSIDATIVO**

Il termine "stress ossidativo" indica l'insieme delle alterazioni che si producono nei tessuti, nelle cellule e nelle macromolecole biologiche quando queste vengono esposte

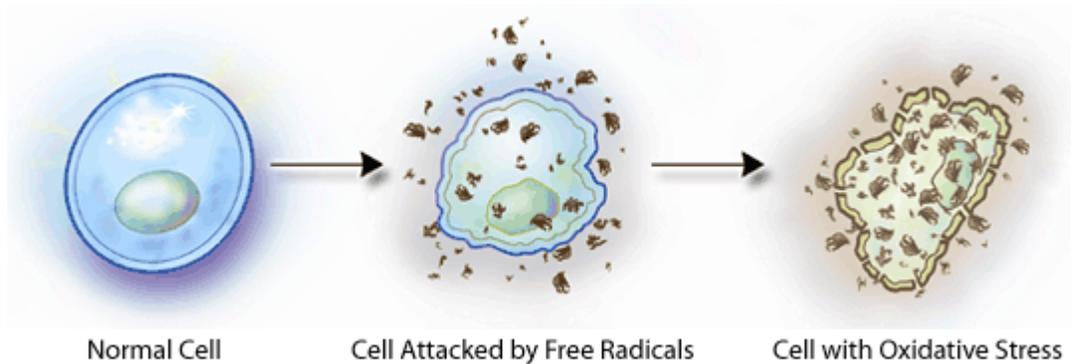
ad un eccesso di agenti ossidanti. Un corretto bilanciamento tra sostanze ossidanti ed antiossidanti (equilibrio ossido riduttivo o redox) è essenziale per le funzioni fisiologiche, in quanto diverse proteine coinvolte nelle catene di trasduzione intracellulare dei segnali sono sensibili ad alterazioni di tale equilibrio (Castillo et al, 2005; Sies 1991, Bernabucci et al, 2002).

Lo stress ossidativo causa quindi un danno cellulare che si manifesta con alterazioni sui fosfolipidi di membrana, sugli acidi nucleici e sulle proteine, causando alterazioni della struttura e perdita di funzione.

### **2.2.1. Radicali liberi (ROS)**

I radicali liberi sono specie chimiche con vita breve che presentano un elettrone spaiato nell'orbitale più esterno. Tale elettrone rende i radicali delle particelle estremamente reattive, in grado di legarsi tra loro o di sottrarre un elettrone ad altre molecole vicine. I più abbondanti radicali liberi nei sistemi biologici sono i radicali dell'ossigeno Reacting Oxygen Species (ROS) e i loro metaboliti (ROMs) (Miller et al., 2003). I ROS sono prodotti durante il metabolismo cellulare; in concentrazioni molto basse sono indispensabili per i processi fisiologici della cellula ed hanno solitamente un significato fisiologico di modulazione; se in concentrazioni maggiori finiscono per produrre disfunzioni a carico delle numerose proteine coinvolte nelle catene di trasduzione

intracellulare dei segnali come le fosforilazioni delle proteine, attivazione dei fattori di trascrizione, differenziamento cellulare, immunità cellulare, difesa contro i microrganismi (Hoidal 2001, Agarwal et al, 2005; Georgieva, 2005) determinando gravi disfunzioni con inevitabile danno cellulare, apoptosi o necrosi.



**Fig. 2.2.1. Effetto dell'azione dei radicali liberi su una cellula.**

## 2.2.2. Antiossidanti

Per evitare l'insorgenza di danni derivanti da un eccesso di ROMs all'interno delle cellule, gli organismi aerobi hanno sviluppato dei particolari sistemi antiossidanti. Questi sono in grado di stabilizzare e rendere innocui i radicali liberi, cedendo loro un elettrone. In questo modo gli stessi antiossidanti divengono radicali ma, essendo molto più stabili, non sono in grado di dare danno cellulare. Una volta ossidato, vari meccanismi riportano l'antiossidante al suo stato ridotto, rendendolo in grado di svolgere nuovamente la sua attività (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007).

Gli antiossidanti sono una famiglia molto eterogenea di molecole: alcune di queste agiscono in modo non enzimatico come le vitamine A, C, E, gli urati, la transferrina e anche l'albumina (Reilly, 1991; Agarwal et al, 2005, Noyan et al, 2006). Tuttavia la detossificazione enzimatica esercitata da molecole come la superossido-dismutasi (SOD), la glutatione-perossidasi, il sistema tireodossina e le aldo-keto reductasi, sembra essere più efficiente (Halliwell and Gutteridge, 1998).

La superossido-dismutasi (SOD), responsabile della conversione dell'anione superossido in perossido di idrogeno, è presente sottoforma di vari isoenzimi. SOD1 contiene rame e zinco come cofattori e si trova a livello del citosol, SOD2 è invece un'isoforma mitocondriale contenente manganese, SOD3 è molto simile a SOD1, poiché utilizza come cofattori rame e zinco, ma è presente a livello extracellulare (Fujii et al, 2005).

### **2.2.3. Ossidazione delle proteine**

Una notevole suscettibilità al danno da ROS è evidenziata dalle proteine. Le alterazioni a cui possono andare incontro a seguito delle interazioni con i radicali dell'ossigeno comprendono l'ossidazione delle catene laterali aminoacidiche, il cross-linking tra proteine, la degradazione dei legami peptidici, la formazione di legami covalenti con prodotti dell'ossidazione lipidica o glucidica e la frammentazione delle proteine stesse (Davies, 1987; Berlett and Stadtman, 1997; Davies et al, 1999).

L'alterazione della struttura primaria delle proteine si riflette quindi anche sulle altre strutture, causando alterazioni della conformazione proteica e alterando così il normale processo proteolitico innescato dalle proteasi.

### **2.3. Indicatori di ossidazione proteica come marcatori di stress ossidativo**

Alcune molecole derivate dall'ossidazione delle proteine per opera dell'HOCl prodotto dai neutrofilo in seguito ad una condizione infiammatoria, come AOPP, ditirosine e carbonili, sono considerate marcatori di stress ossidativo.

#### **2.3.1. AOPP**

Le advanced oxidation protein products (AOPP) sono i prodotti della reazione delle proteine plasmatiche, soprattutto Albumina e suoi aggregati, danneggiati dallo stress ossidativo. Sono il prodotto della reazione delle proteine plasmatiche con gli ossidanti clorurati prodotti dalla mieloperossidasi (Fialova et al., 2006; Noyan et al., 2006). La Mieloperossidasi è responsabile della produzione di AOPP in vari modi, sia tramite l'attività dell'HOCl, sia dall'azione derivante dalla capacità propria dell'enzima. L'azione diretta dell'HOCl sulle proteine plasmatiche è responsabile della produzione di proteine clorinate e clorammine (Witko-Sarsat et al., 1998).

### **2.3.2. Ditirosine**

Le ditirosine sono date da aggregazione proteica in conseguenza a fenomeni di ossidazione. Si trovano in diverse proteine come prodotto di radiazioni UV, radiazioni  $\lambda$ , invecchiamento ed esposizione ai ROS. Assumono pertanto un ruolo come marcatore specifico per il danno ossidativo proteico e la loro selezione proteolitica. Possono così essere usate come marcatore di stress ossidativo. I prodotti di ossidazione delle ditirosine rappresentano un marcatore di danno radicalico diretto sulle proteine/aminoacidi a differenza dei gruppi carbonili che possono generarsi in conseguenza a lipoperossidazione e glico-ossidazione. D'altra parte l'analisi di ossidazione delle tirosine è più complicata perchè solo le tecniche di cromatografia liquida o gas cromatografia associate a spettrometria di massa garantiscono una sufficiente specificità e sensibilità per la rilevazione e quantificazione di queste molecole (Giulivi et al, 2003).

### **2.3.3. Gruppi carbonilici**

I gruppi carbonilici sono un generico prodotto di ossidazione delle proteine ad opera dell' $\text{HOCl}$  e di altri agenti ossidanti. Possono essere generati tramite ossidazione diretta degli aminoacidi prolina, arginina, lisina e treonina da parte di radicali liberi, oppure in

conseguenza a fenomeni di lipoperossidazione (LPO). La formazione di gruppi carbonilici sulle proteine è considerata un marcatore di stress ossidativo (Stadtman et al, 1997).

### 3. MATERIALI E METODI



Lo scopo delle tesi è di valutare la possibilità di misurare nel latte alcuni marcatori dell'ossidazione delle proteine (AOPP, di tirosine) comunemente dosati nel plasma o nel siero. Per validare le metodiche analitiche, è necessario riprodurre "in vitro" ciò che potrebbe accadere alle proteine del latte in corso di infiammazione della ghiandola mammaria e studiare la relazione tra l'entità dello stimolo (DOSE) e il grado della risposta analitica (RISPOSTA). Si costruiranno così delle curve dose-risposta, che permetteranno di studiare gli effetti degli agenti ossidanti sulle proteine del latte e definire la realizzabilità dei metodi analitici. I risultati presentati da questa tesi derivano da almeno 2 ripetizioni di ciascun esperimento.

### 3.1. CAMPIONI DI LATTE

Sono stati utilizzati 2 campioni di latte prelevati da animali clinicamente sani, su cui è stato riprodotto in vitro ciò che potrebbe accadere alle proteine del siero di latte in corso di infiammazione della ghiandola mammaria.(tabella 3.1.1.)

	Data	Data			gg		
Vacca	Campionamento	nascita	Lattazione	Data parto	di	SCC	Produzione
					latt.		
1)252	28/05/2013	02/11/2007	3	16/12/2012	157	57	17
2)282	28/05/2013	10/12/2008	2	15/03/2013	68	26	24

Poi sono stati misurati i marcatori di stress ossidativo (AOPP e di tirosine) in campioni di latte di vacche in cui la conta delle cellule somatiche era minore di 200.000cell/ml e di

vacche in cui la conta delle cellule somatiche era maggiore di 200.000 cell/ml (tabella

3.1.2.)

Vacca	Data nascita	Lattazione	Data parto	gg di latt.	SCC	Produzione
1) 301	14/11/2009	1	16/01/2012	590	18	15
2) 282	10/12/2008	2	15/03/2013	740	26	22
3) 73	11/12/2003	7	15/06/2013	97	42	12,9
4) 310	25/12/2009	1	30/12/2012	264	57	10,1
5) 252	02/11/2007	3	16/12/2012	163	57	17
6) 283	17/12/2008	2	01/02/2013	231	76	12,5
7) 11	26/11/2002	8	04/05/2013	116	115	19
8) 282	10/12/2008	2	15/03/2013	189	345	16,8
9) 312	08/01/2010	1	07/01/2013	256	548	5,8
10) 37	13/12/2003	7	01/02/2013	231	562	14,1
11) 39	25/12/2004	6	16/03/2013	188	568	8,2
12) 240	05/01/2007	3	21/01/2013	242	726	10,5
13) 98	23/09/2003	6	27/10/2012	328	1576	10,1

**GRIGIO: animali con SCC < 200.000 cel/ml**

**GRIGIO SCURO: animali con SCC > 200.000 cel/ml**

## **3.2. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**

### **3.2.1. Frazionamento delle proteine del latte mediante ultracentrifugazione**

L'analisi delle proteine è stata effettuata su campioni di latte suddivisi in 2 provette da 10 ml. Prima sono stati centrifugati a 5.000 g per 15 minuti alla temperatura di 4 °C separando quindi il latte (SKIM-MILK) dalla frazione grassa. Poi sono stati ultracentrifugati a 25.000 g per 30 minuti a 4 °C per eliminare la caseina del latte ottenendo così il siero (WHEY). Tutte le frazioni ottenute sono state conservate a -20°C fino al momento dell'analisi.

#### **3.2.1.1.Ossidazione del siero mediante HOCl**

Affinchè i metodi analitici possono essere considerati efficaci, devono risultare sensibili agli effetti indotti dall'aumento dell'agente ossidante in questo caso HOCl.

Pertanto, i campioni di siero di latte sono stati esposti a concentrazioni crescenti di HOCl ( 0; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50; 100 mM) a pH 7,4 (preparate come descritto nel paragrafo 3.3.) per 10 minuti a temperatura ambiente. L'acido ipocloroso è stato aggiunto in un volume di 150 µl a 1,5 ml di campione. La reazione poi è stata interrotta mediante l'aggiunta di 10 µl di una soluzione di metionina 10 mM.

Infine, sono state dosate le AOPP e le ditirosine, secondo i metodi descritti nei paragrafi 3.4. e 3.5. e calcolata la concentrazione proteica totale come descritto nel paragrafo 3.6.

### **3.2.3 Preparazione della AOPP-BLG**

Poiché la  $\beta$ -lattoglobulina(bLG) (PM=18KDa) è la proteina maggiormente rappresentata nel siero di latte dei ruminanti, è stata scelta per la realizzazione della prova di recupero. Questa consiste nell'aggiungere ad un campione di latte quantità note della sostanza da analizzare (ANALITA) e di verificare se lo strumento analitico utilizzato è in grado di misurare l'aumento atteso dall'analita.

Poiché non è noto il comportamento della bLG all'esposizione dell'acido ipocloroso (HOCl), sono stati valutati gli effetti di differenti concentrazioni di HOCl ( 0; 12,5; 25; 50; 75 mM )(preparate come descritto nel paragrafo 3.3.) in una soluzione di bLG (18mg/ml) in PBS a pH7.4. Quindi sono poi state dosate AOPP e ditirosine.

Dopodiché è stata presa in considerazione la soluzione diluita di bLG con HOCl a concentrazione 50mM, da cui sono state estratte diverse quantità di bLG (0; 2,5; 5, 10mg) e sono state aggiunte a 2ml di latte intero, successivamente ultracentrifugato per ottenere il siero e poi sono state dosate AOPP e ditirosine come descritto nel paragrafo 3.4 e 3.5.

### 3.3. PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DI HOCl

La concentrazione commerciale di acido ipocloroso è stata calcolata mediante lettura allo spettrofotometro utilizzando il coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon_{290}=350\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) a pH 12. La dissociazione dell'acido ipocloroso dipende dal pH: a pH 10 tutto il cloro è nella forma di ione  $\text{OCl}^-$ , viceversa a pH 4,5 tutto il cloro è nella forma di HOCl (Carrel et al, 1966). Pertanto a pH 12 la soluzione ossidante contiene il 100% di ione  $\text{OCl}^-$ .

In questo studio il termine HOCl sarà riferito alla somma di entrambe le specie poiché è stato utilizzato a pH 7.4 per non determinare alterazioni strutturali alle proteine dovute all'elevato pH (Carrell Morris, J., 1966)

### 3.4. DOSAGGIO DELLE AOPP

Le AOPP sono misurate utilizzando il metodo spettrofotometrico di Witko-Sarsat con alcune modifiche (Witko-Sarsat et al, 1996, Witko-Sarsat et al, 1998), su lettore di micropiastre (Packard Instrument, Meriden, CT, USA) utilizzando una curva di calibrazione con chloramina-T (N-cloro-p-toluensulfonamide sale di sodio). La chloramina-T (10 mM), diluita in PBS (20 mM, pH 7.4), è stata utilizzata per allestire la curva di taratura con un intervallo di diluizione da 0 a 100  $\mu\text{mol/litro}$  (Fluka, St. Louis, MO, USA). Dopo l'aggiunta di ioduro di potassio, la soluzione assorbe ad una lunghezza d'onda  $\lambda=340\text{ nm}$ . In una piastra da 96 pozzetti (Perkin-Elmer Life and Analytical

Sciences, Shelton,CT,USA) sono stati caricati 100  $\mu$ l di PBS e 100  $\mu$ l di campione, con 20  $\mu$ l di acido acetico. Parallelamente è stata allestita la curva standard, aggiunti i 200  $\mu$ l/pozzetto della soluzione di chloramine-T standard con 10  $\mu$ l di potassio ioduro e 20  $\mu$ l di acido acetico. Dopo agitazione, l'assorbanza è letta allo spettrofotometro a 340 nm contro il bianco contenente solo PBS, potassio ioduro, acido acetico.

La chloramine-T standard assorbe a 340 nm in modo lineare con un intervallo da 0-100  $\mu$ mol/litro con una sensibilità di 3.125  $\mu$ M e la concentrazione delle AOPP è espressa come micromoli per litro di chloramina-T equivalenti.

### 3.5. DOSAGGIO DELLE DITIROSE

Le ditirosine sono state determinate mediante metodo spettrofotometrico (Heinecke et al, 1993; Witko-Sarsat et al, 1998).

Dopo aver determinato la concentrazione proteica dei campioni mediante BCA (paragrafo 3.6.), i campioni sono stati diluiti 1:10 o 1:20 con PBS 10 mM e letti allo spettrofotometro (V-630 Jasco Europe, Italia) a 315 nm.

La concentrazione delle ditirosine è stata determinata utilizzando la formula di Lambert-Beer tenendo conto del fattore di diluizione: concentrazione (mM) = (OD315 /  $\epsilon$ )\* FM, in cui  $\epsilon = 5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . (Heinecke JW et al 1993; Jay et al, 2005; Witko-Sarsat et al, 1998)

### 3.6.DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA TOTALE

Le proteine totali sono state dosate utilizzando il metodo BCA e seguendo le istruzioni contenute nel kit: Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology 3747 N. Meridian Road, PO Box 117 Rockford, IL 61105 USA). La preparazione della proteina standard (sol.A 2 mg/ml di Albumina bovina) con la quale è stata allestita la curva di taratura, che è indicata in tabella.

Soluzione di calibrazione	PBS (diluente) $\mu$ l	BSA (albumina) $\mu$ l	Concentrazione finale di BSA $\mu$ g/ml
A	0	300	2000
B	125	375	1500
C	325	325	100
D	175	175 di B	750
E	325	325 di C	500
F	325	325 di E	250
G	325	325 di F	125
H	400	100 di G	25
I	400	0	0

Il dosaggio è stato eseguito su una piastra da 96 pozzetti (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) dove sono stati depositati rispettivamente 25  $\mu$ l di standard e di ogni campione(siero,bLG) diluito 50 volte con PBS. Dopo l'aggiunta di 200  $\mu$ l di reagente, preparato mescolando le soluzioni contenute nel Kit nel rapporto di

50:1, la piastra è stata agitata e posta a 37°C per 30 minuti. I campioni sono stati letti sul lettore di micropiastre (Packard Instrument, Meriden, CT, USA) a 570 nm.

La concentrazione proteica è stata calcolata utilizzando l'equazione della retta di taratura.

### 3.7. SDS-PAGE

#### 3.7.1. Preparazione dei campioni

Per testare l'integrità dei campioni di bLG ossidata e di siero di latte addizionato di bLG si è eseguita una corsa elettroforetica su gel di acrilamide.

I campioni, dopo il calcolo della concentrazione proteica mediante Kit BCA (paragrafo 3.6.), sono stati opportunamente diluiti in PBS (5µg/5µl ed addizionati di 2X *Sample Buffer* )(Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) nel rapporto 1:1 (volume:volume).

Successivamente, sono stati agitati e incubati a 100 °C per 2 minuti.

Nel gel sono stati caricati:

- β-lattoglobulina ossidata con HOCl 0; 12,5; 25; 50; 75mM
- siero di latte estratto da latte intero addizionato con 0; 2,5; 5; 10 mg di β-lattoglobulina ossidata con 50 mM di HOCl.

### 3.7.2. Separazione elettroforetica

La separazione delle proteine dai campioni di bLG e di siero di latte è stata eseguita mediante SDS-PAGE 15% secondo Laemmli (1970).

I campioni sono stati caricati (5 µg/lane) con il marker (11-245 kDa; Genespin, Milan, Italy), in gel polimerizzati su Hoefer SE 245-Dual Gel Caster (GE Healthcare, USA): stacking gel al 3% e resolving gel al 15% di 0,75 mm di spessore, secondo la seguente composizione:

<u>STACKING GEL 3%</u>		<u>RESOLVING GEL 15%:</u>	
H2O	0,850 ml	H2O	4,432 ml
TRIS HCl 1M pH 6,8	0,620 ml	TRIS HCl 1,5M pH 8,8	3,125 ml
SDS 10%	0,100 ml	SDS 10%	0,125 ml
Acilamide 40 %	0,375 ml	Acilamide 40 %	4,680 ml
AMPS 10%	0,050 ml	AMPS 10%	0,125 ml
Temed	0,005 ml	Temed	0,013 ml

La separazione elettroforetica è avvenuta mediante Hoefer SE 260 (GE Healthcare, UK) a 4°C per 3 ore a 30 e 60 mA in tampone di corsa di Laemmli (1970).

Per ciascuna prova sono state allestite due corse elettroforetiche. I gel sono stati lavati con acqua per eliminare l'eccesso di SDS e successivamente colorato con EZBlue Gel Staining Reagent (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) per circa 30 minuti, e poi lavato con acqua finché le bande delle proteine non sono chiaramente visibili.

L'immagine del gel è stata acquistata con ImageScanner (Amersham Biosciences, NJ, USA).

## 4.RISULTATI E DISCUSSIONE



In esperimenti precedenti, le AOPP e le ditirosine sono state dosate secondo il metodo standard anche nel latte sgrassato (SKIM MILK) e nel siero di latte (WHEY) ottenuto mediante precipitazione delle caseine con acido acetico 1M (precipitazione isoelettrica), successivamente chiarificato mediante centrifugazione. Questi metodi, tuttavia, hanno presentato alcuni problemi tecnici: a) poiché la misurazione delle AOPP prevede in ogni caso l'aggiunta di acido, tale procedura comportava la flocculazione delle proteine con la conseguente impossibilità di procedere alla misura spettrofotometrica; b) nel frazionamento delle proteine mediante precipitazione isoelettrica, poiché i campioni contengono quantità differenti di caseina e di proteine del siero, è pressoché impossibile realizzare un metodo standard; infatti, c'è sempre la possibilità che nei campioni non sia fatta precipitare tutta la caseina, ricadendo così nel problema visto per il latte sgrassato.

E' stato quindi deciso di procedere alla validazione della metodica che prevede di ottenere il siero di latte mediante ultracentrifugazione del latte precedentemente sgrassato.

## **4.1 CURVE DOSE-RISPOSTA**

Lo scopo della tesi è stato quello di valutare la possibilità di misurare nel latte alcuni marcatori dell'ossidazione delle proteine. Per validare le metodiche analitiche è stato necessario riprodurre "in vitro" ciò che potrebbe accadere alle proteine del latte in caso d'infiammazione alla ghiandola mammaria e studiare la relazione tra l'entità dello stimolo e il grado della risposta analitica costruendo delle curve DOSE-RISPOSTA che serviranno per valutare gli effetti degli agenti ossidanti sulle proteine del latte e definire la realizzabilità dei metodi analitici.

### **4.1.1. Ossidazione del siero di latte con HOCl**

L'obiettivo della riproduzione dell'ossidazione con HOCl "in vitro" del siero ottenuto mediante ultracentrifugazione, è di verificare che a concentrazioni crescenti di HOCl corrisponda un aumento della formazione dei prodotti delle proteine ossidate. L'ossidazione del siero mediante acido ipocloroso è stata eseguita due volte.

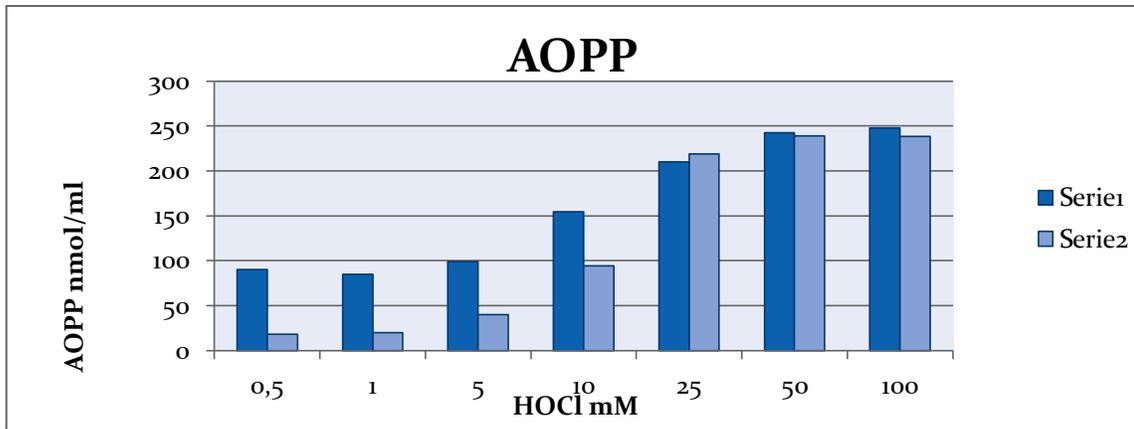


Figura 4.1.1.1. - Effetto di dosi crescenti di HOCl sulla concentrazione di AOPP nel siero di latte.

Nella figura 4.1.1.1. si osserva come le AOPP della “serie 1” aumentino già in corrispondenza di concentrazioni di HOCl comprese tra 1 e 5 mM, quelle della “serie 2” partono da un livello più alto e cominciano a crescere, anche in questo caso, a concentrazione di HOCl 5mM. Entrambe raggiungono un *plateau* a concentrazioni di HOCl comprese tra 50 e 100 mM. Anche nel caso delle ditirosine (figura 4.1.1.2.), si osserva un incremento in corrispondenza di dosi di HOCl comprese tra 1 e 5 mM ed il *plateau* viene raggiunto tra 50 e 100 mM.

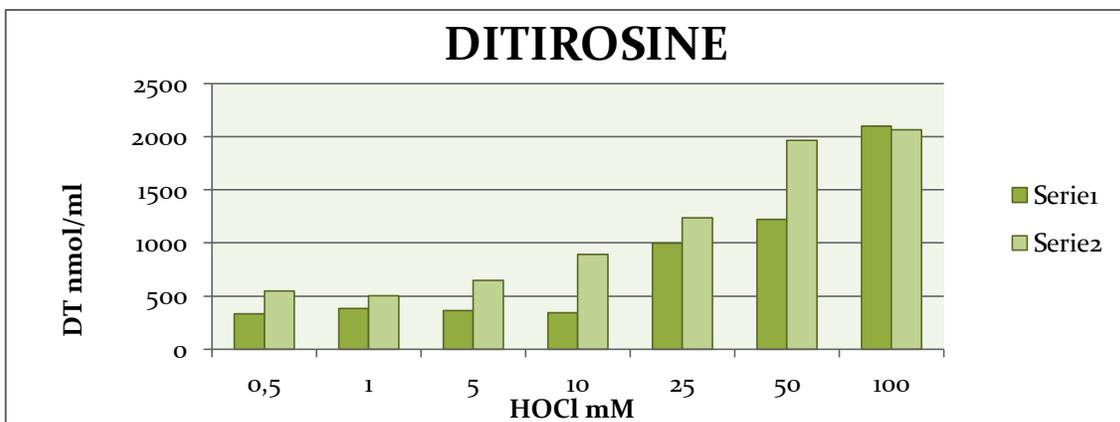


Figura 4.1.1.2. - Effetto di dosi crescenti di HOCl sulla concentrazione di ditirosine nel siero di latte

I due indicatori, quindi, presentano un profilo parallelo delle rispettive curve DOSE-RISPOSTA, che porta ad ipotizzare come questi due indicatori siano generati da insiemi di specie chimiche in parte sovrapponibili (Witko-Sarsat et al, 1999).

È stato osservato che i neutrofili umani attivati (circa 2 milioni di cellule per mL) sono in grado di produrre circa 40  $\mu$ M di HOCl se mantenuti per 30 minuti in coltura (Kettle, 1996). È ipotizzabile che il latte contenuto in una ghiandola mammaria affetta da fenomeni infiammatori sia esposto all'azione del HOCl per il periodo compreso tra due mungiture e che in tale periodo (6-12 ore) la produzione di tale ossidante possa raggiungere concentrazioni nell'intervallo delle millimoli, compatibile con le quantità di HOCl utilizzate nei nostri esperimenti. In tal caso, la misurazione della AOPP risulterebbe una metodica estremamente utile per valutare il danno ossidativo a carico dell'organo.

#### **4.1.2. Ossidazione della $\beta$ -lattoglobulina**

L'ossidazione della bLG mediante acido ipocloroso è stata eseguita due volte in due giornate successive. Nella figura 4.1.2.1. si può osservare il confronto tra i profili delle due curve DOSE-RISPOSTA ottenuti. In entrambi i casi, si osserva un netto aumento delle AOPP in risposta a concentrazioni di HOCl comprese tra 25 e 50 mM. Al contrario, si osserva come nel primo esperimento si raggiunga un *plateau* nella produzione di

AOPP a dosi di HOCl pari a 75 mM, mentre nel secondo esperimento non si osservi il raggiungimento del *plateau*.

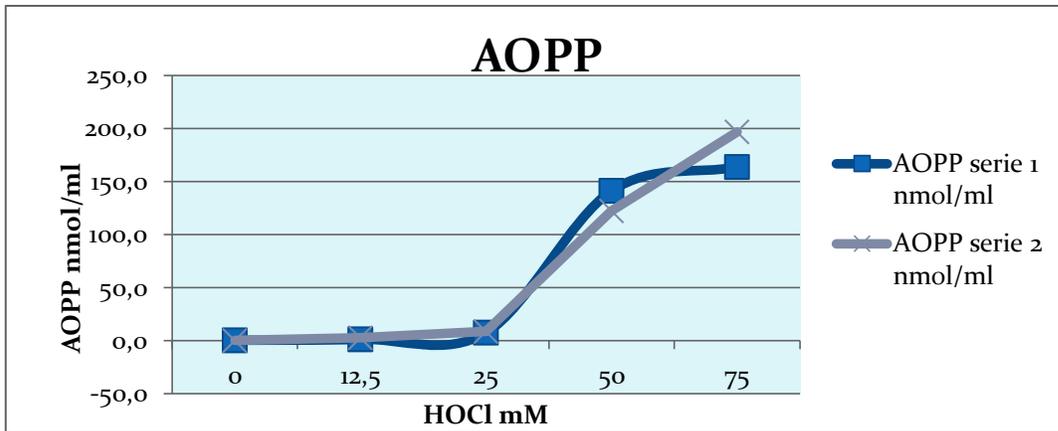


Figura 4.1.2. 1.- Effetto di dosi crescenti di HOCl sulla formazione di AOPP nella  $\beta$ -lattoglobulina nativa.

Si osserva un andamento analogo nei due esperimenti per quanto riguarda la formazione delle ditirosine (figura 4.1.2.2.).

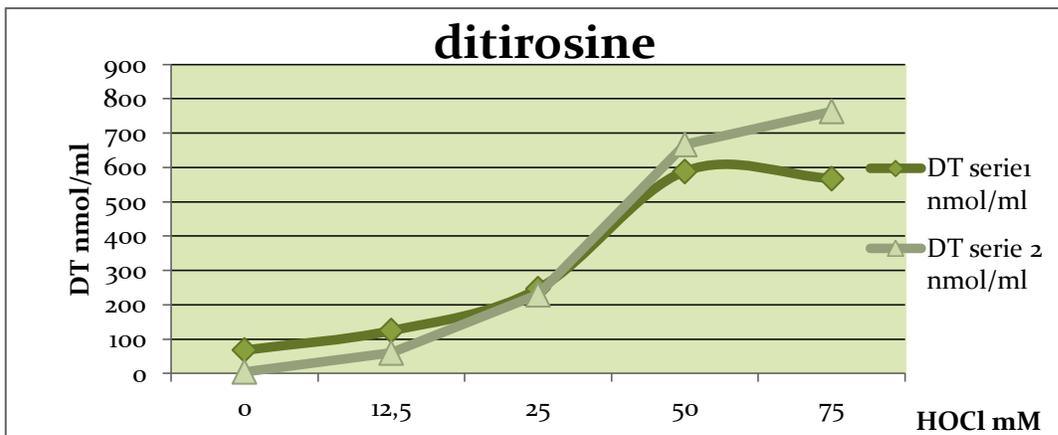


Figura 4.1.2. 2. - Effetto di dosi crescenti di HOCl sulla concentrazione di ditirosine nella  $\beta$ -lattoglobulina nativa.

La misura delle ditirosine, tuttavia, sembrerebbe un indicatore più sensibile, poiché questo marcatore mostra un aumento già a concentrazioni di 12,5 mM di HOCl (figura

4.1.2.2.). Questa osservazione, tuttavia, dovrà essere confermata da uno studio approfondito della sensibilità del metodo analitico.

Apparentemente la bLG è una proteina molto resistente all'azione dell'HOCl, infatti la formazione degli indicatori di stress ossidativo si osserva solamente a concentrazioni elevate di HOCl.

Poiché durante l'ossidazione con l'acido ipocloroso i residui aminoacidici delle proteine sono direttamente modificati dal radicale ipoclorito( $OCl^-$ ), alte dosi di HOCl determinano in primo luogo l'ossidazione dei gruppi  $-SH$  e dei residui di metionina e triptofano con formazione di gruppi carbonilici. In alcuni casi queste modificazioni possono rendere le proteine più suscettibili alla degradazione.

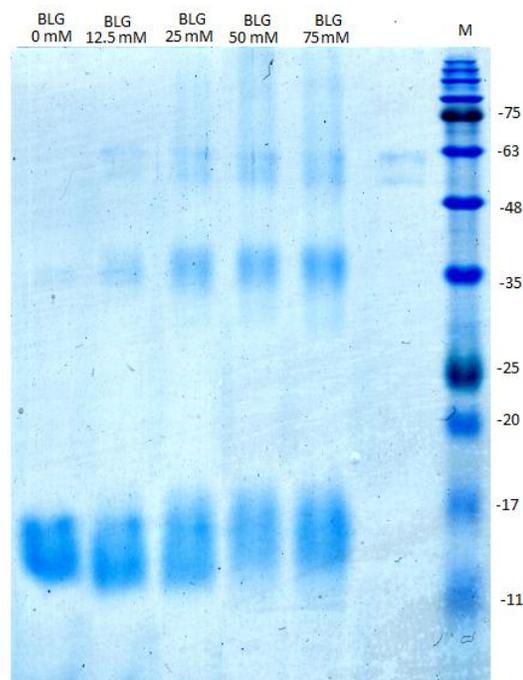


Figura 4.1.2.3. - Elettroforesi di bLG ossidata con HOCl . colorazione con comassie

Come si osserva dalla figura 4.1.2.3. la bLG mostra una progressiva denaturazione del peptide che si evidenzia con uno *smear* a 17 kDa corrispondente alle dosi più elevate di HOCl. L'alterazione strutturale subita dalla struttura primaria della bLG ha indotto la formazione di piccoli peptidi che, clorinati, hanno determinato l'elevata concentrazione di clorammine (figura 4.1.2.3.). Inoltre si può osservare la formazione di aggregati peptidici a 36 e 63 kDa, dovuti alla formazione di ponti disolfuro e/o *cross-linking* della bLG. L'azione diretta dell'HOCl sulle proteine è responsabile sia della produzione di proteine clorinate con la formazione di clorammine (quantificabili con il metodo di dosaggio delle AOPP paragrafo 3.4.) ma anche agendo direttamente sui residui di tirosina contribuendo alla formazione dei dimeri di Tyr (di-Tyr) i cui principali prodotti di addizione all'anello fenolico sono 3,5-Cl-Tyr che danno origine ad aggregazione proteica (Fu et al., 2000).

#### **4.1.3. Test di recupero della AOPP-BLG nel siero di latte**

Il test di recupero consiste nell'aggiungere quantità note di  $\beta$ -lattoglobulina ossidata con HOCl ad un rapporto molare di 1:50 (bLG:HOCl) a campioni di latte intero. I campioni così allestiti sono stati in seguito sottoposti ad ultracentrifugazione per ottenere il siero di latte, nel quale sono state dosate AOPP e ditirosine.

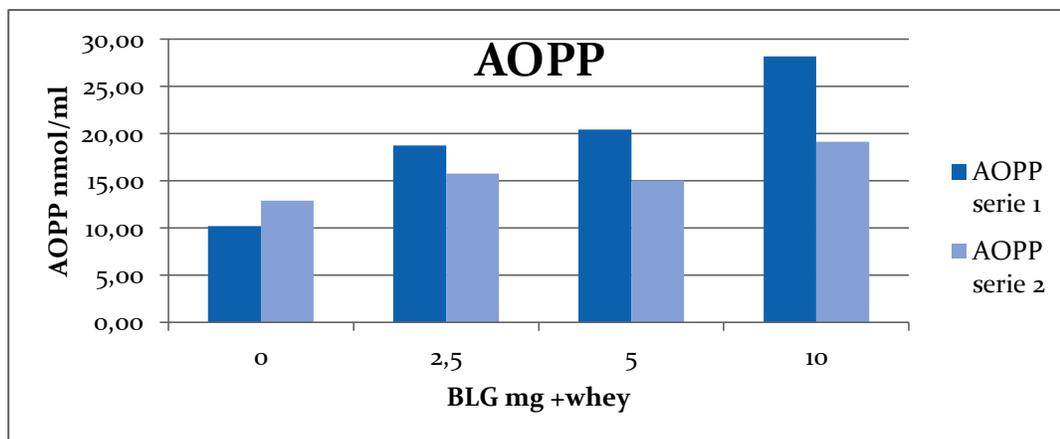


Figura 4.1.3.1. – misurazione delle AOPP in campioni di latte addizionati con concentrazioni crescenti di bLG ossidata.

Nella figura 4.1.3.1. si osserva che ai campioni di siero addizionati con quantità crescenti di bLG ossidata corrispondono in proporzione quantità crescenti di AOPP. Inoltre nel precedente esperimento (ossidazione della bLG) il valore delle AOPP della bLG ossidata con concentrazione di HOCl 50 mM della “serie1” era più alto rispetto a quello della “serie 2” e corrispettivamente in questa prova i valori delle AOPP della “serie 1” ,escluso il punto 0, dove vi è solo PBS e non bLG ossidata, sono tutti più alti. La stessa osservazione si può fare per la figura 4.1.3.2. per le ditirosine, con la differenza che nel precedente esperimento il valore delle ditirosine era più elevato nella “serie 2”.

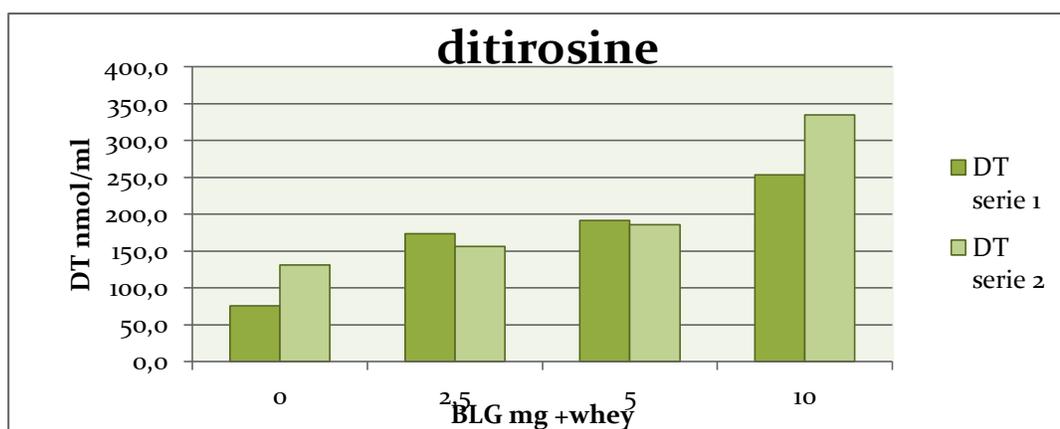


Figura 4.1.3.2. – misurazione delle ditirosine in campioni di latte addizionati con concentrazioni crescenti di bLG ossidata.

Per verificare l'effettivo recupero della proteina ossidata (AOPP-BLG) dal latte intero dopo l'estrazione del siero, si è eseguita una corsa elettroforetica in SDS-PAGE 15%, dove sono stati caricati 5µg/lane di proteina sierica contenente la AOPP-BLG.

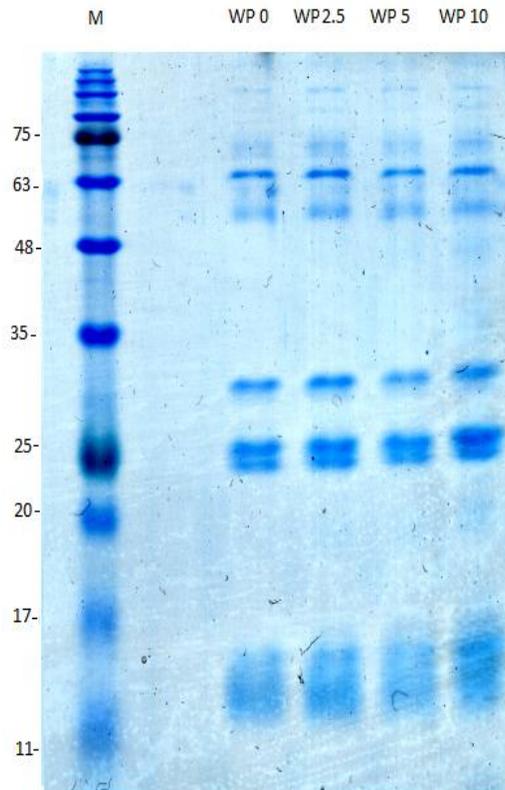


Figura 4.1.3.3. - Elettroforesi del siero di latte (WP) ottenuto dopo l'aggiunta al latte intero di concentrazioni scalari di BLG ossidata con 50mM di HOCl (0, 2.5, 5e 10mg) . Colorazione con comassie

Come si osserva dalla figura 4.1.3.3. in corrispondenza della banda a 17 kDa si può osservare un aumento dello *smear* dovuto all'aggiunta di AOPP-BLG ossidata con 50mM di HOCl,

La banda a 17kDa del campione trattato mostra un aumento percentuale rispetto al valore di controllo (latte senza AOPP-BLG; WP 0) pari a 118, 124 e 151% rispettivamente.

## 4.2. RELAZIONE TRA LA CONTA DELLE CELLULE SOMATICHE (SCC) E I MARCATORI DELL'OSSIDAZIONE

Poiché in corso di infezione della mammella i neutrofili rappresentano la prima barriera immunitaria verso gli agenti patogeni (Hibbit et al, 2004), si potrebbe ipotizzare che in corso d'infezione si assista ad un aumento della produzione di AOPP e ditirosine in relazione all'aumento della conta delle cellule somatiche.

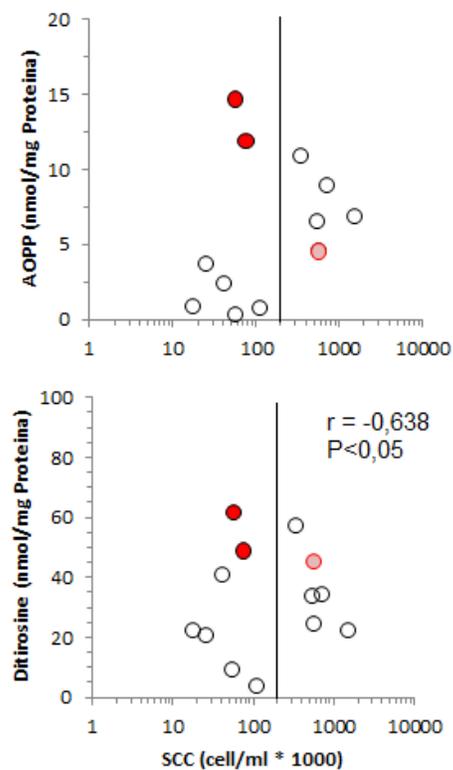


Figura 4.2.1. – Relazione tra la conta delle cellule somatiche (SCC) e i due indicatori di ossidazione delle proteine.

Nella figura 4.2.1. è mostrata la relazione tra SCC e i marcatori di ossidazione proteica. Sono stati raccolti campioni di latte da due gruppi di animali, il primo con valori di SCC inferiore a 200.000 cell/ml e il secondo con valori di SCC superiori a 200.000 cell/ml. Per quanto riguarda le AOPP, normalizzate rispetto alla concentrazione proteica nel siero di latte, è stato possibile individuare sul grafico due nuvole di punti, che suggeriscono che la concentrazione di questo indicatore è in prevalenza inferiore per valori di SCC inferiori a 200.000 cell/ml. In rosso sono stati evidenziati i punti che non rientrano nel criterio di classificazione: due casi in cui le AOPP erano molto elevate a fronte di un valore di SCC inferiore a 200.000 cell/ml e un caso in cui le AOPP erano tendenzialmente basse sebbene il valore di SCC fosse molto elevato.

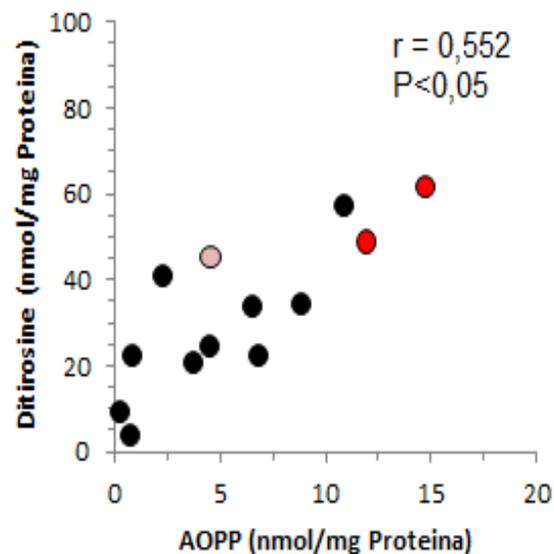


Figura 4.2.2. – Relazione tra le concentrazioni di AOPP e di ditirosine normalizzate per la concentrazione proteica del siero di latte.

Sebbene i due marcatori siano tra loro correlati in modo significativo ( $P < 0,05$ ; figura 4.2.2.), è interessante osservare come la distribuzione delle ditirosine tra i due gruppi di animali con differenti valori di SCC sia risultata maggiormente casuale (figura 4.2.1.). Si è osservata, inoltre, una correlazione negativa tra la concentrazione delle ditirosine normalizzate per la concentrazione proteica e il valore di SCC ( $r = -0,638$ ;  $P < 0,05$ ). Queste osservazioni suggeriscono che l'applicazione di queste metodiche analitiche debba essere sottoposta ad ulteriori studi di validazione. Innanzitutto, è necessario stabilire se le elevate concentrazioni di AOPP osservate nei due soggetti con valori di SCC inferiori a 200.000 cell/ml dipendono da interferenze analitiche (per esempio: la fase di ultracentrifugazione non ha eliminato tutta la caseina). Inoltre, è possibile che le sottopopolazioni cellulari presenti nel latte (cellule epiteliali, granulociti neutrofilo, linfociti, monociti) possano influenzare la formazione di AOPP e ditirosine. In quest'ottica, è possibile che AOPP e ditirosine, essendo costituite da specie chimiche in parte differenti, forniscano informazioni particolari sui processi legati allo stress ossidativo a carico della ghiandola mammaria. Tali informazioni dovrebbero essere completate anche dalla misurazione di altri indicatori, quali ad esempio i carbonili totali e gli addotti dei residui amminoacidici con aldeidi primarie (4-idrossinonenale, HNE, o malondialdeide MDA)

## 5. CONCLUSIONI



I risultati di questa tesi inducono a concludere che:

- È possibile misurare sia le AOPP sia le ditirosine nel siero di latte ottenuto mediante ultracentrifugazione, anche se è necessario fare molta attenzione ad eliminare completamente la caseina. Infatti, eventuali residui di questa proteina possono generare delle interferenze nella misura, soprattutto nel caso delle AOPP.
- Le AOPP e le ditirosine mostrano un elevato grado di correlazione, dovuto al fatto che questi indicatori contengono alcune specie chimiche del tutto sovrapponibili.
- Il lavoro dovrà proseguire con la misurazione di altri indicatori dell'ossidazione delle proteine, *in primis* con la valutazione dei gruppi carbonilici, per ottenere un quadro più completo dei fenomeni ossidativi che avvengono nella ghiandola mammaria.
- La relazione tra la conta delle cellule somatiche nel latte e questi indicatori non è chiara, e sarà necessario approfondire le relazioni tra le diverse sottopopolazioni di cellule somatiche nel latte (neutrofili, monociti, linfociti, cellule epiteliali) e la generazione di AOPP e ditirosine.
- È stato scelto di studiare la possibilità di misurare i prodotti dell'ossidazione proteica causa di stress ossidativo direttamente sul siero di latte poiché : i campioni di latte sono raccolti più facilmente rispetto a campioni di plasma; i

campioni prelevati direttamente dall'organo interessato all'analisi possono meglio indicare il grado di stress ossidativo di quell'organo.

## 6 . BIBLIOGRAFIA



- Agarwal A, Gupta S e Sharma RK (2005).** Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology.* 3:28.
- Berlett BS e Stadtman ER (1997).** Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The journal of biological chemistry.* 272: 20313-20316.
- Bernabucci U., Ronchi B., Lacetera N., Nardone A. (2005).** Influence of body condition score on relationship between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 88:2017-26.
- Bondurant (1999).** Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J Anim Sci,* 77:101-10.
- Capuco AV, Bright SA, Pankey JW, Wood DL e Miller RH, Bitman J (1992).** Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. *Journal of Dairy Science.* 75: 2126-2130.
- Fu S, Wang H, Dean DMR (2000).** Reactions of hypochlorous acid with tyrosine and peptidyl-tyrosyl residues give dichlorinated and aldehydic products in addition to 3-chlorotyrosine. *J. Biol. Chem.* 275: 10851-10858.
- Capuco AV, Akers RM, Smith JJ. (1997).** Mammary growth in holstein cows during the dry period: quantification of nucleic acids and histology. *Journal of Dairy Science,* 80:477-487.

- **Carrell Morris J. (1966)**. The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35°. *Journal of Physical Chemistry*, 70(12), pp.3798.

-**Castillo C, Hernandez J, Bravo A, Lopez-Alonso M. Pereira V e Benedito JL, (2005)**. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *The Veterinary Journal*, 169:286-292.

-**Davies KJ (1987)**. Protein damage and degradation by oxygen radicals. General aspects. *The Journal of Biological Chemistry*. 262: 9895-9901.

-**Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT, (1999)**. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free radical biology & medicine*. 27: 1151-1163.

-**Edmonso PW e Bradley AJ (2004)**. Mastitis. In *bovine medicine disease and husbandry of cattle*. Edited by: Andrews AH, Blowely RW, Boyd H, Eddy RG. Blackwell science, Oxford. 326-336.

-**Fialová L, Malbohan I, Kalousovà M, Soukupová J, Krofta L, Stípek S e Zima T (2006)**. Oxidative stress and inflammation in pregnancy. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 66: 121-127.

-**Fujii J., Iuchi Y .e Okada F. (2005)**. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanism in the female reproductive system. *Reproductive biology and endocrinology*. 3:43.

- Georgieva NV (2005).** Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological system-a review. Bulgarian journal of Veterinary Medicine. 8: 1-11.
- Giulivi C., Traaseth N. J. e Davies K. J. A. (2003).** Amino Acids. 25: 227-232
- Guzik TJ, Korbust R e Adamek-Guzik T, (2003).** Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. Journal of physiology and pharmacology. 54(4):469-487.
- Hadsell DL, Torres D, George J, Capuco AV, Ellis SE, Fiorotto ML. (2006).** Changes in secretory cell turnover, and mitochondrial oxidative damage in the mouse mammary gland during a single prolonged lactation cycle suggest the possibility of accelerated cellular aging. Exp Gerontol 41:271-281.
- Heinecke JW, Li W, Daehnke HL III e Goldstein JA (1993a).** Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. The journal of biological chemistry. 268: 4069-4077.
- Heinecke JW, Li W, Francis GA e Goldstein JA (1993b).** Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. The journal of clinical investigation. 91: 2866-2872.

**-Hibbit KG, Craven N e Batten EH (2004).** Anatomy, physiology and immunology of the udder. In Bovine medicine disease and husbandry of cattle. Edited by: Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG. Blackwell science, Oxford. 311-325.

**-Hoidal JR (2001).** Reactive oxygen species and cell signaling. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 25: 661-663.

**- Holst BD, Hurley WL, Nelson DR. (1987).** Involution of the bovine mammary gland: histological and ultrastructural changes. J Dairy Sci, 70:935-944.

**-Jacob JS, Cistola DP, Hsu FF, Muzaffar S, Mueller DM, Hazen SL e Heinecke JW (1996).** Human phagocytes employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system to synthesize dityrosine trityrosine, pulcherosine, and isodityrosine by a tyrosil radicaldependent pathway. The journal of biological chemistry. 271: 19950-19956.

**-Jay W. Heinecke, Wei Li, Henry L. Daehnke, e Jeffrey A. Goldstein (1993).** Dityrosine, a Specific Marker of Oxidation, Is Synthesized by the Myeloperoxidase-Hydrogen Peroxide System of Human Neutrophils and Macrophages. J. Biol. Chem. 286:4069-4077.

**-Kerkaer et al (2011).** Hypochlorous and peracetic acid induced oxidation of dairy proteins. J Agric Food Chem. 59:907-914.

**-Kettle AJ (1996).** Neutrophils convert tyrosyl residues in albumin to chlorotyrosines. FEBS Letters 379:103-106.

- Kumar V, Abbas AK e Fausto N (2005). Le basi patologiche delle malattie. Elsevier Italia, Milano.
- Lindmark-Månsson H, Akesson B. (2000). Antioxidative factors in milk. *Br J Nutr*, 84:103-110.
- Loiselle MC, Ster C, Talbot BG, Zhao X, Wagner GF, Boisclair YR, Lacasse P. (2009). Impact of postpartum milking frequency on the immune system and the blood metabolite concentration of dairy cows. *J Dairy Sci*, 92:1900-12.
- Lykkesfeldt J, Svendsen O (2007). Oxidants and antioxidants in diseases: oxidative stress in farm animals. *The veterinary journal*. 173: 502-511.
- Mantovani R, Sgorlon S, Marinelli L, Bailoni L, Bittante G, Gabai G. (2010). Oxidative stress indicators and metabolic adaptations in response to the omission of the dry period in dairy cows. *Journal of dairy res*. 77:273-279.
- Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E e Madsen FC (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of dairy science*. 76: 2812-2823.
- Noyan T, Güler A. Sekeroglu MR e Kamaci M (2006). Serum advanced oxidation protein products, myeloperoxidase and ascorbic acid in preeclampsia and eclampsia. *Australian and New Zealand journal of obstetrics and gynaecology*. 46: 486-491.

**-Paape M, Mehrzad J, Zhao X, Detilleux J e Burvenich C (2002).** Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 7: 109-121.

**-Reilly PM, Schiller HJ e Bulkley GB (1991).** Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *The american journal of surgery*. 161: 488-503.

**-Robinson JM, Ohira T e Badwey JA (2004).** Regulation of the NADPH-oxidase complex of phagocytic leukocytes. Recent insights from structural biology, molecular genetics, and microscopy. *Histochemistry and cell biology*. 122: 293-304.

**-Savenkova ML, Mueller DM e Heinecke JW (1994).** Tyrosyl radicals generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein. *The journal of biological chemistry*. 269: 20394-20400.

**-Sies (1991).** Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, 91:31S.

**-Silanikove et al (2005).** Role of xanthine oxidase, lactoperoxidase, and NO in the innate immune system of mammary secretion during active involution in dairy cows: manipulation with casein hydrolyzates. *Free Rad Biol Med*, 38:1139-1151.

**-Sordillo LM e Streicher KL (2002).** Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 7: 135-146

- Sordillo & Aitken (2009).** Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet Immun Immunopath*, 128:104-109.
- Stadtman ER, Berlett BS(1997).** Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol.*; 10:485-94
- Wilde et al (1997).** Programmed cell death in bovine mammary tissue during lactation and involution. *Exp Physiol*, 82:943-953.
- Winterbourn CC. (2002).** Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology*. 181-182:223-227.
- Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T., Jungers P., Druke T.B. e Descamps-Lotscha B. (1999).** Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uraemia. *Nephrol dial transplant*.14:76-78
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T e Descamps-Latscha B (1998).** Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *Immunology*. 161: 2524-2532
- Zhao X e Lacasse P (2008).** Mammary tissue damage during bovine mastitis causes ad control. *Journal of animal science*. 86:57-65.

- Zhu X, Tang X, Zhang J, Tochtrop GP, Anderson VE, Sayre LM. (2010). Mass spectrometric evidence for the existence of distinct modifications of different proteins by 2(E),4(E)-decadienal. *Chem Res Toxicol*, 23:467-473.