

**Proponiamo che CF sia in grado di preservare l'attività dei mitocondri e una respirazione ottimale attraverso un meccanismo doppio, la generazione di MnSOD e l'inibizione di HIF-1 $\alpha$ , prevenendo così le disfunzioni endoteliali.**

- 1. CF può essere candidato nel supporto di trattamenti di malattie caratterizzate da complicazioni cardiovascolari.**
- 2. Cellfood incide sulla generazione di specie reattive all'ossigeno ed inibisce l'attivazione di HIF-1  $\alpha$  provocata da ipossia attraverso l'espressione regolata di MnSOD**
- 3. Cellfood sostiene la produzione di ATP**
- 4. Cellfood migliora il metabolismo respiratorio delle cellule endoteliali preservando l'attività ottimale dei mitocondri.**

### **CELLFOODTM MIGLIORA IL METABOLISMO RESPIRATORIO DELLE CELLULE ENDOTELIALI E INIBISCE LA GENERAZIONE DI ROS IN CONDIZIONI DI IPOSSIA**

1 Unità Mieloma, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Italia; 2 Dipartimento di Morfologia Umana e Scienze Biomediche - Città Studi, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia; 3 Laboratorio clinico di biologia cardiovascolare, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Italia

I mitocondri dell'endotelio, il principale sito di produzione di ATP, modulano le dinamiche intracellulari di specie reattive all'ossigeno (ROS), le quali, a loro volta, controllano la funzione endoteliale. Un adeguato apporto di ossigeno (O<sub>2</sub>) è richiesto dalle cellule endoteliali (EC). Ipossia ed iperossia possono favorire l'iper-produzione di ROS, inducendo stress ossidativo, danneggiamento dei mitocondri e disfunzioni endoteliali. Abbiamo studiato la capacità e i meccanismi del composto antiossidante CellfoodTM (CF), in un modello di cellule endoteliali coltivate in vitro, di modulare la disponibilità di ossigeno e il metabolismo respiratorio dei mitocondri e di regolare la generazione di ROS in condizioni di ipossia. Abbiamo utilizzato cellule prelevate da vena ombelicale umana (HUVEC) e cellule ECV-304. Il consumo di ossigeno da parte delle cellule è stato misurato con l'impiego di un elettrodo di Clark. I risultati hanno messo in evidenza che l'aggiunta di CF induceva, dopo pochi minuti, l'incremento del consumo d'ossigeno, associato ad un aumento della capacità ossidativa dei mitocondri e ad un'ottima vitalità cellulare. Simili comportamenti sono stati osservati dopo 8 giorni di coltura in presenza di Cellfood. L'incremento del consumo di ossigeno era associato ad un aumento di ATP e al mantenimento delle concentrazioni di LDH. CF è stato in grado di inibire significativamente la produzione di ROS in condizioni di ipossia mediante un'alta espressione di Mn superossido-dismutasi, un antiossidante responsabile della preservazione della funzione dei mitocondri. La risposta ipossica è mediata dal regolatore centrale dell'ipossia HIF-1  $\alpha$ , la cui attivazione era attenuata da CF, in concomitanza con l'overespressione di MnSOD. I risultati da noi ottenuti suggeriscono un ruolo di CF nel miglioramento del metabolismo respiratorio e nell'attivazione di meccanismi antiossidanti nelle EC, preservando così la funzione endoteliale.

#### **INTRODUZIONE**

L'endotelio partecipa a diverse funzioni fisiologiche e patologie umane e le cellule endoteliali (EC) svolgono un ruolo importante nella mediazione della natura focale degli stadi della patologia (1). In particolare, le EC sono capaci di regolare l'omeostasi della funzione vascolare. Sembra pertanto essere cruciale preservare le corrette funzioni, forma e vitalità delle EC. Le EC sono particolarmente sensibili all'O<sub>2</sub> e sono dotate di meccanismi che regolano il metabolismo in base ai diversi apporti di O<sub>2</sub> (2). In particolare, il meccanismo di sensibilità all'O<sub>2</sub> nelle EC crea una risposta attraverso la sovraregolazione del fattore 1  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) indotto da ipossia (3). I mitocondri svolgono un ruolo centrale nell'omeostasi dell'energia

cellulare e funzionano come principale fonte energetica. Si ritiene che l'endotelio sia un organo che non necessita di molta energia, trovandosi l'endotelio vascolare in stato quiescente. Nonostante, le EC dispongono di un'estesa rete mitocondriale. Questo suggerisce che la funzione dei mitocondri possa essere importante nel mantenimento del metabolismo fisiologico dell'O<sub>2</sub> e dello stato bioenergetico delle EC (4). Inoltre, i mitocondri dell'EC possono contribuire alla patofisiologia endoteliale in relazione con lo sviluppo e l'avanzamento di patologie cardiovascolari (5, 6). Uno dei principali iniziatori di lesioni endoteliali è lo stress ossidativo derivante dalla rottura dell'equilibrio tra un'aumentata generazione di specie reattive all'ossigeno (ROS) e l'insufficiente attività antiossidante intracellulare. Lo stress ossidativo dovuto ad un'eccessiva formazione di ROS e la capacità difettosa di disintossicare gli ossidanti intracellulari sono alla base di diverse patologie cardiovascolari, benché non sia ancora pienamente compresa la relazione di causa-effetto tra il danno ossidativo e le disfunzioni cardiovascolari (7).

Nelle EC, la catena respiratoria mitocondriale rappresenta una sorgente secondaria e un bersaglio importate delle specie reattive all'ossigeno, che inducono in ultimo danni mitocondriali irreversibili (8). Benché sia il metabolismo mitocondriale che la glicolisi siano essenziali nella produzione di energia da ATP nelle EC (9, 10), le disfunzioni endoteliali sembrano associarsi principalmente con mitocondri compromessi (11). Strategie per l'apporto mirato di antiossidanti ai mitocondri sono in fase di sviluppo. Cellfood<sup>TM</sup> (CF) è un integratore alimentare composto da D2SO<sub>4</sub> e diversi minerali, amminoacidi ed enzimi che conferiscono proprietà antiossidanti al composto. Benché la sua formula complessa ostacoli la possibilità d'individuare gli elementi maggiormente responsabili degli effetti clinici positivi, l'intera formula sembra efficace. Nel presente studio, abbiamo indagato l'effetto e i meccanismi d'azione di CF su EC spontaneamente immortalizzate (ECV 304) e su EC prelevate da vena ombelicale umana (HUVEC), sulla funzione mitocondriale, il metabolismo respiratorio in vitro, la generazione di ROS, l'induzione di MnSOD e il percorso di HIF-1 $\alpha$ .

## DISCUSSIONE

L'endotelio partecipa a molte funzioni fisiologiche e patologie umane e le disfunzioni endoteliche rappresentano un fattore di rischio per lo sviluppo di eventi clinici, come malattie vascolari e infarti (22). Di conseguenza, l'intero sistema cardiovascolare dipende in maniera critica da un endotelio vascolare strutturalmente e funzionalmente intatto. Pertanto, la conservazione di una corretta omeostasi delle EC è un requisito ovvio (23) e la necessità di antiossidanti e composti che regolino l'attivazione dell'endotelio è di rilevanza biologica significativa per gli aspetti clinici associati con il danno e le disfunzioni endoteliche. In questo contesto, è stato di recente descritto il ruolo cruciale del propionate contenuto negli acidi grassi a catena corta (SCFA) presenti nelle fibre cellulari nell'inibire l'endotelio indotto da TNF nell'espressione di mRNA e della proteina ICAM-1 e VCAM-1, attraverso l'inibizione di NF- $\kappa$ B p65, un altro regolatore centrale dell'attivazione delle EC (24).

Uno dei principali attivatori di lesioni endoteliali è lo stress ossidativo, causato da uno stato di squilibrio tra la maggiore generazione di specie reattive all'ossigeno (ROS), responsabili dell'apoptosi delle cellule endoteliali vascolari (25) e insufficienti antiossidanti intracellulari (26), inclusi enzimi come MnSOD.

A questo proposito, gli effetti protettivi vascolari del resveratrolo contro le lesioni ossidative sono stati delucidati grazie probabilmente all'induzione di enzimi antiossidanti nelle HUVEC e EA.hy 926 (27).

Nel presente studio, abbiamo indagato gli effetti e i meccanismi d'azione di CF, un integratore alimentare, sul metabolismo ossidativo di EC in vitro. Abbiamo dimostrato quanto segue: 1) la somministrazione singola di CF alle EC determina un significativo aumento nel consumo di O<sub>2</sub> rispetto alle cellule NT attraverso l'aumento dell'attività dei mitocondri, senza incidere sulla vitalità delle EC. 2) La somministrazione ripetuta per alcuni giorni (fino a 8) di CF alle HUVEC ha consentito in maniera ottimale il consumo di O<sub>2</sub>, l'attività dei mitocondri e la produzione di ATP a valle, senza accumulo di LDH indesiderati. Nel complesso, questi risultati indicano un passaggio metabolico dal percorso glicolitico a quello mitocondriale. Nel complesso, il nostro studio dimostra chiaramente l'efficacia di CF nel preservare l'attività mitocondriale delle EC. È stata studiata la relazione tra il consumo di O<sub>2</sub> e la generazione di specie reattive all'ossigeno (ROS). Chiaramente, dosi elevate e/o l'inadeguata rimozione di ROS, specialmente dell'anione superossido, hanno indotto "stress ossidativo", imputato nella patogenesi di molte malattie cardiovascolari, inclusa l'ipercolesterolemia, l'arteriosclerosi, l'ipertensione, il diabete e l'infarto (28). Uno dei principali sistemi di difesa antiossidanti contro l'O<sub>2</sub> è il superossido dismutasi (SOD). SOD2 è un manganese mitocondriale (Mn) contenente un enzima (MnSOD) ed è localizzato nella matrice mitocondriale; abbiamo pertanto selezionato questa isoforma per chiarire l'implicazione dei mitocondri. Il ruolo essenziale di SOD2 nel preservare la funzione dei mitocondri è stata di recente dimostrata da ratti MnSOD-deficienti con infarto, affetti da funzione endoteliale marcatamente compromessa (29). In questa sede abbiamo mostrato che l'espressione di ROS, indotta dall'esposizione ad ipossia, è significativamente regredita con CF attraverso un aumento importante di MnSOD, la cui espressione nel tempo è fluttuante (Suppl. Fig.1), come è stato ben dimostrato anche di recente (30). Questo risultato indica che CF sostiene la resistenza delle EC contro la tossicità delle ROS, preservando così la loro vitalità e attività funzionale anche a condizioni di stress ossidativo provocato da ipossia. La risposta ipossica delle EC è strettamente regolata dal regolatore centrale di ipossia HIF-1 $\alpha$ ??, la cui attivazione induce la trascrizione di potenti citochine pro-angiogeniche e funzioni a valle neo-acquisite (3). In questo studio mostriamo che CF inibisce il trasloco di HIF-1 $\alpha$  nel nucleo e l'espressione di Glut-1 sovraregolato, suggerendo che CF s'interfaccia con il percorso ipossico e possa essere considerato un nuovo regolatore della risposta ipossica endoteliale. Sosteniamo che l'inibizione di HIF-1 $\alpha$  è mediato dall'attivazione di MnSOD, essendo la loro espressione sulle stesse HUVEC inversamente correlata. Inoltre, il collegamento tra la generazione di ROS, la perdita di MnSOD e l'attivazione di HIF-1 $\alpha$  è stata di recente ben documentata nelle EC polmonari ipertensive (31).

**Proponiamo che CF sia in grado di preservare l'attività dei mitocondri e una respirazione ottimale attraverso un meccanismo doppio, la generazione di MnSOD e l'inibizione di HIF-1 $\alpha$ , prevenendo così le disfunzioni endoteliali.**

CF può essere candidato nel supporto di trattamenti di malattie caratterizzate da complicazioni cardiovascolari.

Cellfood incide sulla generazione di specie reattive all'ossigeno ed inibisce l'attivazione di HIF-1 $\alpha$  provocata da ipossia attraverso l'espressione regolata di MnSOD

Cellfood sostiene la produzione di ATP

Cellfood migliora il metabolismo respiratorio delle cellule endoteliali preservando l'attività ottimale dei mitocondri.