

Riassunto

Le cellule endoteliali compongono il rivestimento interno di tutti i vasi, sanguigni e linfatici. Agendo come barriera semi-permeabile e selettiva tra il torrente circolatorio ed i tessuti sottesi, l'endotelio gioca un ruolo fondamentale nella fisiologia e pato-fisiologia di molti processi. Paradossalmente, l'endotelio, che è quiescente, è sempre vigile e attivo metabolicamente, per mantenere l'omeostasi. Quando questa si spezza, come accade in corso di processi infiammatori, in particolare cardiovascolari, o in sedi tumorali, l'endotelio "attivato" viene meno alla sua funzione barriera. Nel tumore, esageratamente ricco di molecole attivatorie (citochine), l'endotelio inizia un processo di formazione di nuovi vasi (angiogenesi) che forniscono nutrienti ed O₂ al tumore stesso e che ne permettono la disseminazione e metastatizzazione. Per questa ragione, le terapie anti-angiogeniche rappresentano la nuova frontiera per debellare il tumore.

Le cellule endoteliali primarie ottenute per digestione enzimatica dalla vena del cordone ombelicale (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) sono un modello universalmente accettato per studiare la biologia e la fisiopatologia dell'endotelio e le sue interazioni con altri tipi cellulari e con componenti della matrice.

L'endotelio vascolare controlla l'omeostasi dei tessuti ad esso sottesi e viceversa fattori epigenetici e microambientali influenzano l'omeostasi dell'endotelio, attivandolo. La rottura di tale equilibrio (attivazione o disfunzione endoteliale),partecipa o addirittura innesca e propaga molte patologie, che vanno dall'infiammazione, alle malattie autoimmuni ed al tumore. Si pensa pertanto che la possibilità di inibire l'attivazione endoteliale possa rappresentare una importante strategia terapeutica.

Data la sua peculiare localizzazione, all'interfacie tra sangue e tessuti, l'endotelio è continuamente esposto alle fluttuazioni di ossigeno, di cui è un fine sensore. In particolare l'ipossia, caratteristica comune ai tumori solidi, ingaggia una risposta dell'endotelio che esita tra nell'induzione dello "switch angiogenico" e nella generazione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS).

Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'efficacia di Cellfood TM (Formula Everett Storey) nell'inibire la produzione di ROS indotti dall'ipossia e di comprenderne i meccanismi di azione.

Abbiamo utilizzato cellule umane endoteliali primarie ottenute da vena ombelicale (HUVEC) e una linea di cellule endoteliali spontaneamente immortalizzata (ECV).

Cellfood, impiegato in vitro, non è tossico e migliora il consumo di O₂ preservando l'attività mitocondriale. Quest'ultima si accompagna ad una sostenuta produzione di ATP ma non di acido lattico.

Come è atteso, HUVEC ed ECV coltivate in severo ambiente ipossico (1%O₂) producono ROS. Tale produzione è significativamente inibita in presenza di Cellfood, che aumenta in parallelo l'espressione di enzimi mitocondriali anti-ossidanti (MnSOD). Infine, Cellfood interferisce con il metabolismo ipossico della cellula endoteliale attraverso l'inibizione del mediatore della risposta ipossica, Hypoxic Inducible factor (HIF)-1alpha.

Noi pensiamo che Cellfood sia in grado di determinare uno shift metabolico dalla glicolisi verso la respirazione. Inoltre, oltre alle attività genericamente anti-ossidanti, pensiamo che Cellfood possieda attività inibenti la risposta ipossica e le attività down-stream ad essa correlate.

1. L'endotelio riveste tutti i vasi, linfatici e no e proprio la sua localizzazione all'interfacie fra torrente circolatorio e tessuti sottesi ne spiega alcune sue peculiarità. Infatti, come un Giano bifronte, l'endotelio è esposto alle variazioni di 2 microambienti come un dispositivo input-output l'endotelio accumula, rielabora ed integra in una risposta non lineare una serie di informazioni che traduce cambiando morfologia, l'espressione di molecole e/o la loro distribuzione.
2. paradossalmente, l'endotelio, che è quiescente, è realmente sempre attivo, sempre vigile, non attivato ad è estremamente plastico e dinamico per mantenere la propria omeostasi, non diventare attivato o addirittura disfunzionale e quindi non partecipare ad una pletora di patologie che vanno dall'infiammazione alle patologie autoimmuni al tumore
3. ho detto che l'endotelio integra le informazioni in maniera non lineare. Infatti, la risposta endoteliale non è mai tutto/niente ma si esprime potenzialmente in uno spettro di risposte che pertanto non sono mai né prevedibili né stereotipate.
4. ancora, data la su localizzazione l'endotelio incontra molti microambienti che ne determinano l'eterogeneità morfologica/strutturale e funzionale: sappiamo che la barriera emato encefalica è impermeabile, mentre i capillari renali sono fenestrati ed i vasi tumore associati hanno caratteristiche uniche. Ed influenza anche la risposta ai farmaci.
5. Per il nostro studio abbiamo utilizzato HUVEC primarie, perché messe in coltura possono mimare il microambiente/fisiopatologia originale, con l'aggiunta di terreni condizionati e di altri tipi cellulari e perché la loro morfologia in vitro ben ricapitola quella descritta in vivo,

PERTANTO; LA POSSIBILITA' DI INIBIRE l'attivazione endoteliale E/O RICONDURRE L'ENDOTELIO VASCOLARE ALLA QUIESCENZA, PUÒ rappresentare UNA INTERESSANTE STRATEGIA TERAPEUTICA

6. L'ambiente ipossico è tratto comune a molte patologie e la risposta cellulare all'ipossia è molto ben conservata e mediata dall'hypoxic inducible factor HIF . Nell'endotelio, la traslocazione di HIF induce la trascrizione di geni che conducono all'angiogenesi alla generazione di ROS che a loro volta attivano l'endotelio, rompendo la continuità di barriera
7. La cellula endoteliale è un fine sensore delle fluttuazioni di O₂ e noi abbiamo dimostrato che coltivando le cellule in ambiente ipossico, o in presenza di mimetici dell'ipossia, viene ingaggiata una risposta che risulta in angiogenesi ed aumentata espressione del recettore del glucosio facendoci concludere che l'attivazione di HIF contribuisce allo switch angiogenico e come conclusione generale che HIF media una risposta cellulare adattativa che permette alla cellula di sopravvivere anche in carenza di O₂
8. HUVEC ed ECV coltivate in vitro per 24 ore con concentrazioni crescenti di CELLFOOD non vanno incontro a morte, come risulta da analisi citofluorimetrica con annessina e PI. A supporto di ciò, le cellule crescono in aderenza, voglio sottolineare che quando perdono aderenza al substrato le cellule endoteliali vanno incontro a morte, i nuclei non sono picnotici e le cellule crescono fino al raggiungimento della confluenza
9. Abbiamo misurato la capacità respiratorio utilizzando l'elettrodo di clark modificato da Alessandro Fulgenzi, per adattarlo a cellule che crescono in aderenza. Dopo pochi minuti di respirazione, veniva aggiunti CELLFOOD e veniva monitorato il consumo di O₂, espresso come percentuale di ossigeno consumato. L'aggiunta di CELLFOOD migliora la capacità respiratoria e va in parallelo con l'attività mitocondriale, apprezzata al microscopio confocale, che viene conservata nel tempo.

10. Veniva anche misurata la capacità respiratoria di cellule coltivate in vitro per 8 giorni in presenza/assenza di CELLFOOD aggiunto in dose progressive, come suggerito dalla casa ed indicato dal diagramma. Ai tempi indicati, veniva misurato il consumo di ossigeno per 15min, che migliorava nel tempo. Ancora, i mitocondri sono perfettamente funzionali.
11. Come dimostrato dalla dia successiva, in cui la produzione di ATP viene conservata, in alcuni punti addirittura migliorata rispetto al controllo. Non si assiste alla produzione di acido lattico, prodotto della glicolisi, facendo pensare allo shift metabolico verso la respirazione mitocondriale
12. In ambiente ipossico come agisce CELLFOOD ? Come atteso, in ipossia c'è produzione di ROS, misurate come incremento rispetto al controllo; tale incremento è abrogato dall'aggiunta di CELLFOOD . Il dato quantitativo è confermato dall'analisi citofluorimetrica. Per comprendere il meccanismo abbiamo preso in considerazione l'attività di MNSOD mitocondriale . L'analisi al confocale è qualitativa e ci permette di dire che l'attività enzimatica antiossidante è bene espressa in tutte le cellule, suggerendo l'efficienza di un meccanismo anti-ossidante.
13. L'ipossia è mediata da HIF la cui espressione e traslocazione al nucleo è evidente in ipossia in tutte le cellule. In maniera davvero sorprendente, e viene inibita dall'aggiunta di CELLFOOD . In parallelo anche l'espressione di Glut-1 come risposta adattativa viene inibita.

E. FERRERO¹, A. FULGENZI², D. BELLONI³, C. FOGLIENI³, M.E. FERRERO²

J. Physiol Pharmacol. 2011 Jun;62(3):287-93.

**CELLFOOD™ IMPROVES RESPIRATORY METABOLISM OF ENDOTHELIAL CELLS
AND INHIBITS HYPOXIA-INDUCED ROS GENERATION**

¹Myeloma Unit, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy; ²Dipartimento di Morfologia Umana e Scienze Biomediche - Città Studi, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy; ³Clinical Cardiovascular Biology Laboratory, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy