

Dott.ssa Paola Bogani

Periodo di permanenza presso il Laboratorio del Professor Paolo Colombo
-New York-Presbyterian Hospital Columbia University College of Physicians &
Surgeons- New York.

26 Maggio-18 Agosto 2006

La disfunzione endoteliale gioca un ruolo importante nella patogenesi di malattie metaboliche e cardiovascolari. La misurazione indiretta della ridotta biodisponibilità di ossido nitrico (NO) è il più frequente parametro valutato come indice di disfunzione endoteliale in pazienti con ipercolesterolemia, diabete mellito, ipertensione, e malattie cardiovascolari. Inoltre, l'endotelio vascolare media numerosi processi patologici e fisiologici mediati dall'NO.

L'infiammazione, le funzioni dinamiche dei vasi e l'angiogenesi sono modulati dell'endotelio vascolare attraverso il passaggio tra stati quiescenti e stati attivati.

Solitamente le funzioni non vasomotorie dell'endotelio vascolare non vengono valutate e ciò è principalmente dovuto al fatto che vi sia una scarsa accessibilità all'endotelio vascolare. La limitata biodisponibilità di tessuto endoteliale è la maggior limitazione quando si vuole studiare "in vivo" i meccanismi cellulari che caratterizzano la disfunzione endoteliale in pazienti con malattie metaboliche o cardiovascolari. A questo scopo il gruppo di ricerca del prof. Colombo ha introdotto un nuovo approccio che accoppia una metodica minimamente invasiva, come la biopsia venosa superficiale, alla valutazione dell'espressione del profilo proteico e genico in soggetti sani e pazienti diabetici. Questa tecnica è stata messa a punto allo scopo di collezionare un numero sufficiente, anche se limitato, di cellule endoteliali (range da 200 a 1000). La misurazione dell'espressione proteica viene valutata utilizzando un'analisi di immunofluorescenza quantitativa che richiede solo un piccolo numero di cellule per poter quantificare accuratamente i livelli proteici intracellulari di interesse.

Basandoci sulla ricerca dei meccanismi molecolari della disfunzione endoteliale in pazienti con insufficienza cardiaca cronica e diabete abbiamo inizialmente testato differenti anticorpi che riconoscono phospho eNOS, EGR-1 (*early growth response protein 1*), RAGE (*receptor advanced glycosylation end product-specific*) e MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*). E' stato dimostrato che un alterato profilo trascrizionale di tali geni gioca un ruolo fondamentale nel coordinare gli eventi cellulari che avvengono a livello della lesione vascolare.

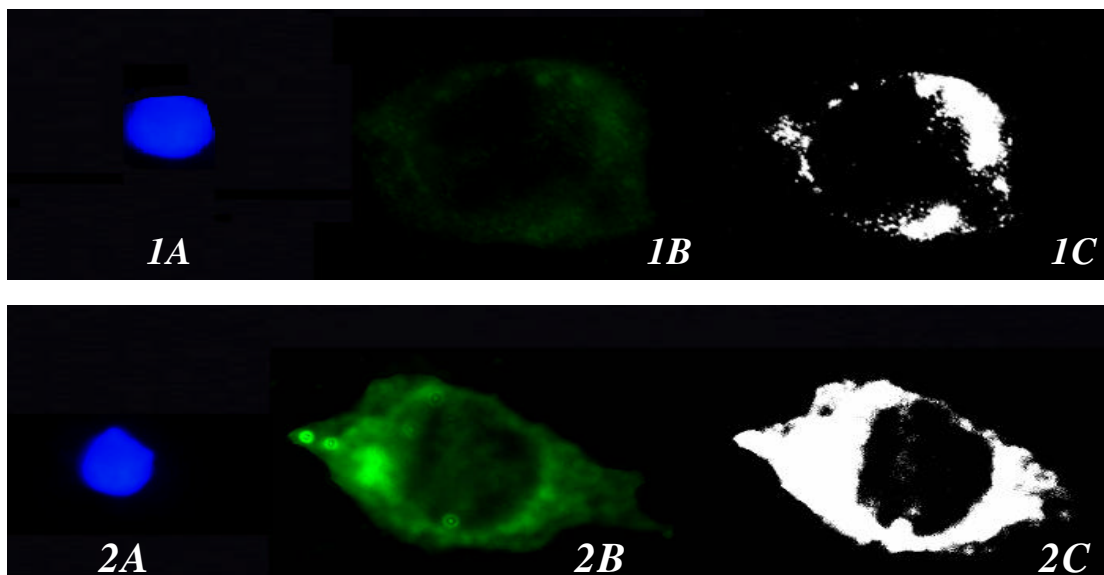
Inizialmente, gli anticorpi sono stati testati su cellule HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) per valutare la corretta concentrazione da utilizzare (Figura 1). Le cellule sono state trattate con LPS o PMA per *upregolare* i processi trascrizionali e traduzionali dei geni di nostro interesse (Tabella 1). Le cellule sono state staccate meccanicamente utilizzando lo stesso strumento utilizzato per le biopsie (*J-shaped wire*) cercando così di riprodurre “*in vitro*” le medesime condizioni a cui le cellule vengono sottoposte attraverso la biopsia.

Tabella 1.

Gene	Controllo media \pm dev.st.	Trattamento media \pm dev.st.	T-Test	Diluizione anticorpo
MCP-1	169,7 \pm 777,6	91084,4 \pm 38567,3	**	1:100
EGR-1	41,1 \pm 131,4	46632,5 \pm 48713,7	**	1:100
RAGE	7,4 \pm 31,4	109,5 \pm 273,4	/	1:300
Phospho eNOS	1317,1 \pm 2122,7	10239,0 \pm 11340	**	1:300

I valori sono riferiti al numero di pixel. Immagini analizzate con il programma Photoshop[®]. Numero di immagini per slides: 25 \pm 10. Analisi statistica: T-Test. **, $P < 0.01$.

Figura 1.



Immunofluorescenza quantitativa. Cellule HUVEC, staining per phospho eNOS. Diluizione utilizzata 1:100. Le immagini si riferiscono al nucleo (blu, 1A e B) e all'espressione del gene di nostro interesse in cellule controllo (figura 1A, B e C) e in cellule trattate con PMA 10 mM per stimolarne l'espressione (figura 2A, B e C). Le

Immagini sono riferite alla medesima cellula. Per l'analisi, le immagini sono state digitalizzate e processate ed è stato utilizzato il programma Photoshop®.

In presenza di disfunzione endoteliale, studi dimostrano come in modelli animali di infarto miocardico e ischemia le cellule endoteliali progenitrici siano coinvolte nei processi di riparazione del danno vascolare mostrando un loro potenziale effetto terapeutico sia incorporandosi nell'area del danno vascolare, provvedendo cellule endoteliali per la crescita dei nuovi vasi sia stimolando la secrezione di fattori di crescita che attivano le cellule vicine. Inoltre Hill *et al.* hanno dimostrato che la presenza di EPC circolanti è inversamente proporzionale al numero di fattori di rischio cardiovascolare.

Abbiamo peraltro paragonato differenti metodi descritti in letteratura per la crescita “*in vitro*” delle EPC dal sangue di volontari. La giovane età, la razza caucasica e l'utilizzo della fibronectina come substrato utilizzato per la coltura hanno dato i migliori risultati in termini di isolamento dalle cellule polimorfonucleate e crescita delle EPC. L'ottimizzazione della metodiche per la separazione e coltivazione delle EPC può porre la basi per l'utilizzo delle stesse per fini terapeutici.

Referenze:

- Colombo PC, Ashton AW, Celaj S, Talreja A, Banchs JE, Dubois NB, Marinaccio M, Malla S, Lachmann J, Ware JA, Le Jemtel TH: Biopsy coupled to quantitative immunofluorescence: a new method to study the human vascular endothelium. *J Appl Physiol* 2002;92:1331-1338.
- Colombo PC, Banchs JE, Celaj S, Talreja A, Lachmann J, Malla S, DuBois NB, Ashton AW, Latif F, Jorde UP, Ware JA, LeJemtel TH: Endothelial cell activation in patients with decompensated heart failure. *Circulation* 2005;111:58-62.
- Feng L, Matsumoto C, Schwartz A, Schmidt AM, Stern DM, Pile-Spellman J: Chronic vascular inflammation in patients with type 2 diabetes: endothelial biopsy and RT-PCR analysis. *Diabetes Care* 2005;28:379-384.
- Fernandez LA, Sanz-Rodriguez F, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Hebbel RP, Nguyen J, Bernabeu C, Botella LM Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions. *Cardiovasc Res.* 68:235-248; 2005.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T:
Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk.
N Engl J Med 2003;348:593-600.