

## **Relazione sull'attività scientifica svolta nel quadrimestre 1 giugno-30 settembre 2007 dalla Dott.ssa Ilaria Zanotti**

Il lavoro scientifico svolto nel corso del quadrimestre di assegnazione della borsa di studio post-doc dalla sottoscritta si è rivolto allo studio della modulazione farmacologia del trasporto inverso del colesterolo (RCT) da parte del composto CIM-2 LC.

L'RCT è un processo fisiologico che permette il trasferimento del colesterolo periferico al fegato e ai tessuti steroidogenici, e la sua successiva escrezione nelle feci. La rilevanza del trasporto inverso del colesterolo come meccanismo di protezione dall'aterosclerosi è correlata principalmente alla rimozione dei lipidi in eccesso dalle cellule periferiche e alla loro eliminazione attraverso la via biliare. Il potenziamento di tale processo è attualmente un approccio farmacologico di interesse per la prevenzione e la cura delle patologie aterosclerotiche cardiovascolari.

Per lo studio sperimentale dell'RCT e del suo impatto sull'aterosclerosi nel nostro laboratorio abbiamo messo a punto una metodica che permette di valutare in modo specifico il movimento del colesterolo dai macrofagi e non dal pool totale corporeo.

Il metodo prevede che macrofagi J774 radiomarcanti ed arricchiti di colesterolo vengano iniettati nel peritoneo di topolini. Al termine di un periodo di incubazione di 48 ore viene misurata la distribuzione del [<sup>3</sup>H]-colesterolo nel plasma, nel fegato e nelle feci. Il rilevamento di significative quantità di radioattività in questi siti ci permette di ricostruire il percorso compiuto dal colesterolo nel trasporto inverso del colesterolo: dai macrofagi presenti nella cavità peritoneale (modello sperimentale di cellula extraepatica) esso viene trasportato attraverso il plasma, raggiunge il fegato, qui è convertito in parte ad acidi biliari ed infine viene secreto nelle feci.

CIM-2 LC è una tienotriazolodiazepina sintetizzata in un ampio screening allo scopo di individuare composti con azione sedativa e ansiolitica. In realtà la suddetta molecola si è scoperta priva di effetti centrali, ma dotata di attività a livello epatico: l'incubazione con cellule di epatoma umano ha prodotto un aumento della secrezione di apolipoproteina A-I (apoA-I). Questo effetto è risultato essere presente su diverse linee cellulari epatiche e essere dovuto all'aumento della trascrizione di *apoA-I* mRNA.

Poiché il ruolo di apoA-I nella promozione dell'RCT è stato recentemente dimostrato, l'ipotesi alla base del lavoro era che il trattamento in vivo con CIM-2 LC potesse portare ad un aumento di tale processo in topolini.

Per la valutazione dell'effetto di CIM-2 LC sull'RCT in vivo, il modello animale prescelto è stato quello di topolini transgenici per l'apoA-I umana, modello animale in cui il composto è risultato essere altamente efficace nell'aumentare l'espressione di apoA-I. Il farmaco è stato somministrato

per via orale alla dose di 300mg/kg/die per 4 giorni (n=5). Il gruppo controllo è rappresentato da topi sottoposti alla somministrazione del veicolo (metocell) (n=5).

Nel terzo giorno di trattamento, a ciascun animale è stata iniettata per via intraperitoneale una sospensione di J774 arricchite di colesterolo e radiomarcate con 5 $\mu$ Ci/ml di <sup>3</sup>H-colesterolo.

Nelle 24 ore successive all'iniezione della sospensione cellulare sono state raccolte le feci degli animali, mentre dopo altre 24h i topi sono stati sacrificati, il sangue è stato prelevato dalla vena cava inferiore, il fegato isolato dopo perfusione e le feci raccolte.

Dopo il prelievo del sangue e la separazione del plasma per centrifugazione, un'identica aliquota è stata contata in un  $\beta$ -counter, in modo da valutare la quantità di <sup>3</sup>H-colesterolo che aveva raggiunto questa sede. Come mostrato in **Figura 1** e **Tabella I**, il gruppo di topi che avevano ricevuto CIM-2 LC ha mostrato una significativa riduzione della radioattività plasmatica.

Una volta raggiunto il torrente circolatorio, il colesterolo viene distribuito a diversi organi, tra cui il fegato, avente un ruolo chiave nel metabolismo lipidico. In questo distretto, l'analisi del contenuto di colesterolo proveniente dai macrofagi attraverso l'RCT non ha permesso di evidenziare differenze significative tra i topi controllo e quelli appartenenti al gruppo trattato con CIM-2 LC (**Figura 2** e **Tabella II**).

Questi risultati possono indicare che 48 ore dopo l'iniezione delle cellule radiomarcate nel peritoneo sia stato raggiunto uno stato di equilibrio tra la quantità di colesterolo captata dal fegato e la quantità escreta nella bile.

Un altro parametro significativo per la valutazione dell'efficienza dell'RCT è la quantificazione dell'escrezione fecale, indice di quanto colesterolo sia stato eliminato dall'organismo.

Nel nostro esperimento si è evidenziato un aumento significativo dell'escrezione fecale nel gruppo degli animali che hanno ricevuto il CIM-2 LC, sia a tempi brevi, 0-24h (**Figura 3** e **Tabella III**), che a tempi lunghi, 24-48h (**Figura 4** e **Tabella IV**).

Il dosaggio del colesterolo totale e HDL nel plasma ha rivelato che CIM-2 LC causa un'eclatante effetto ipolipidemizzante (**Figura 5** e **Tabella V**).

In conclusione, i nostri risultati suggeriscono che il trattamento in vivo con CIM-2 LC di topolini transgenici per l'apoA-I causa una promozione dell'RCT, nonostante il forte effetto di riduzione delle HDL plasmatiche. Quest'azione, conducendo ad una riduzione del contenuto in colesterolo nell'organismo, permette di ipotizzare un'attività antiaterosclerotica di questo composto che necessita di approfondimento.

## Tabelle

**Tabella I:  $^3\text{H}$ -colesterolo nel sangue**

<b>Gruppo controllo</b>	<b>cpm</b>
<b>1</b>	61845
<b>2</b>	53812
<b>3</b>	46806
<b>4</b>	67326
<b>5</b>	36654

<b>Gruppo CIM2-LC</b>	
<b>1</b>	28512
<b>2</b>	23788
<b>3</b>	16485
<b>4</b>	22896

**Tabella I:** cpm di  $^3\text{H}$ -colesterolo nel sangue. I risultati sono espressi come cpm nel sangue, stimato come il 5% del peso corporeo.

**Tabella II:  $^3\text{H}$ - colesterolo nel fegato**

<b>Gruppo controllo</b>	<b>cpm totali nel fegato</b>
<b>1</b>	51464
<b>2</b>	39617
<b>3</b>	54565
<b>4</b>	50065
<b>5</b>	47070

<b>Gruppo CIM2-LC</b>	
<b>1</b>	51661
<b>2</b>	55203
<b>3</b>	51636
<b>4</b>	46324

**Tabella II:** cpm di  $^3\text{H}$ - colesterolo nel fegato. Porzioni di fegato di ugual peso sono state omogenizzate ed estratte al fine di isolare i lipidi ed infine contate con liquido di scintillazione. I risultati sono espressi come media dei cpm nell'intero organo +deviazione standard.

**Tabella III: <sup>3</sup>H- colesterolo nelle feci 0-24h**

<b>Gruppo controllo</b>	<b>cpm nelle feci 0-24h</b>
<b>1</b>	4511
<b>2</b>	3601
<b>3</b>	5761
<b>4</b>	2503
<b>5</b>	3125

<b>Gruppo CIM2-LC</b>	
<b>1</b>	11965
<b>2</b>	11577
<b>3</b>	4100
<b>4</b>	16567

**Tabella III:** cpm di <sup>3</sup>H- colesterolo nelle feci 0-24h. Porzioni di feci di ugual peso sono state omogenizzate ed estratte al fine di isolare i lipidi ed infine contate con liquido di scintillazione. I risultati sono espressi come media dei cpm nel totale delle feci escrete a tempi brevi +deviazione standard.

**Tabella IV: <sup>3</sup>H- colesterolo nelle feci 24-48h**

<b>Gruppo controllo</b>	<b>cpm nelle feci 24-48h</b>
<b>1</b>	6054
<b>2</b>	2878
<b>3</b>	4689
<b>4</b>	3513
<b>5</b>	3119

<b>Gruppo CIM2-LC</b>	
<b>1</b>	7811
<b>2</b>	9081
<b>3</b>	10539
<b>4</b>	11994

**Tabella IV:** cpm di <sup>3</sup>H- colesterolo nelle feci 24-48h. Porzioni di feci di ugual peso sono state omogenizzate ed estratte al fine di isolare i lipidi ed infine contate con liquido di scintillazione. I risultati sono espressi come media dei cpm nel totale delle feci escrete a tempi lunghi +deviazione standard.

**Tabella V: livello plasmatico di colesterolo totale e HDL-C**

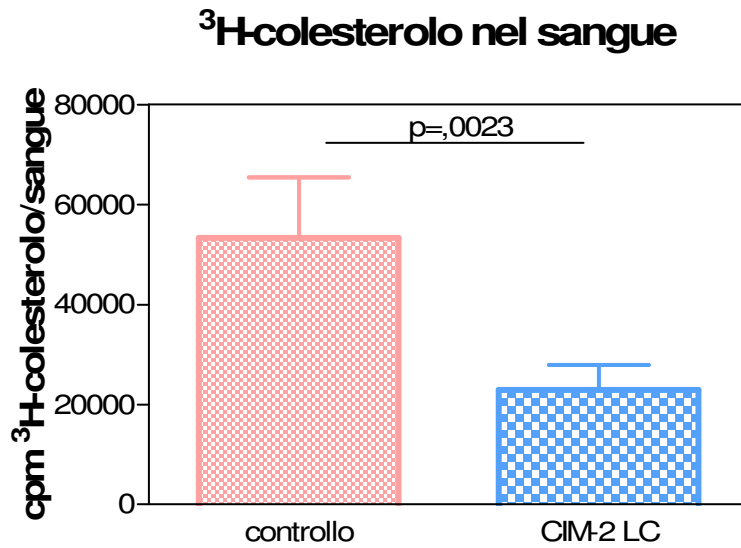
<b>Gruppo controllo</b>	<b>Colesterolo totale (mg/dl)</b>	<b>HDL-C (mg/dl)</b>
<b>1</b>	80,5	59,6
<b>2</b>	100,1	70,8
<b>3</b>	91,7	79,3
<b>4</b>	76,9	64,8

<b>Gruppo CIM2-LC</b>		
<b>1</b>	42,2	35,5
<b>2</b>	38,5	31,5
<b>3</b>	34,1	30,9
<b>4</b>	26,1	24,9

**Tabella V:** colesterolo totale e HDL nel plasma. Il livello plasmatico dei lipidi è stato determinato con una tecnica colorimetrica.

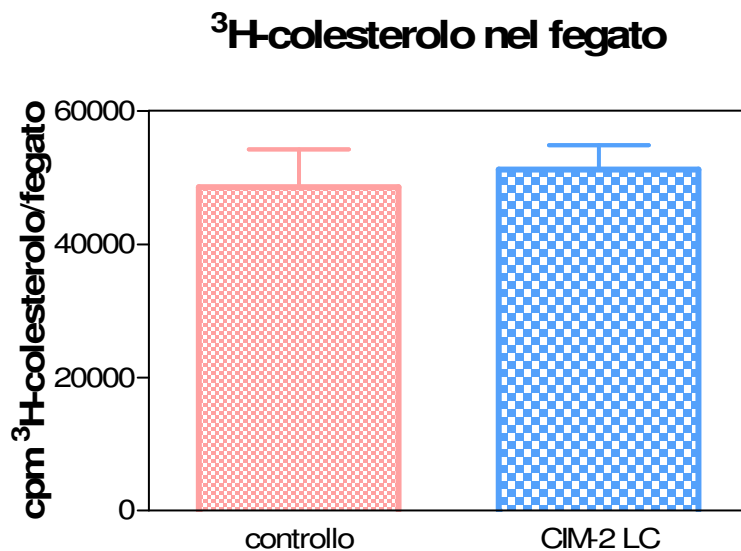
## Figure

Figura 1



**Figura 1:** cpm di <sup>3</sup>H-colesterolo nel sangue. Aliquote di plasma sono state contate con liquido di scintillazione. I risultati sono espressi come media + deviazione standard.

Figura 2



**Figura 2:** cpm di <sup>3</sup>H-colesterolo nel fegato. Porzioni di fegato sono state omogenizzate ed estratte al fine di isolare i lipidi ed infine contate con liquido di scintillazione. I risultati sono espressi come media dei cpm nell'intero organo + deviazione standard.

Figura 3

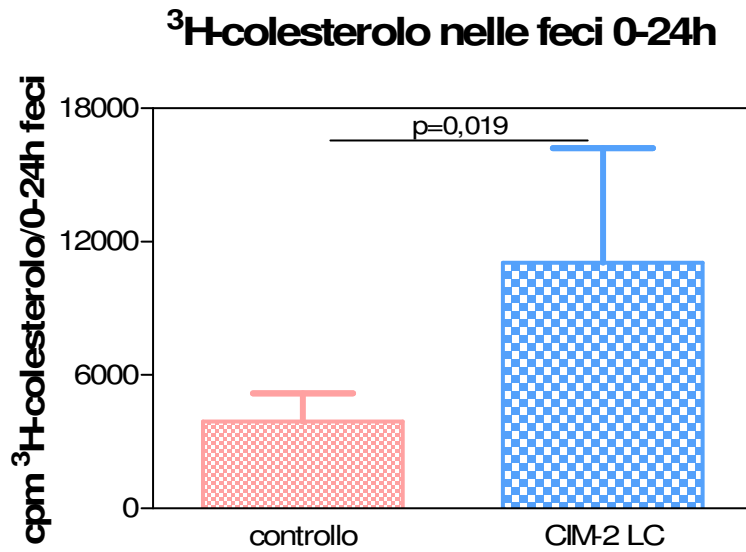


Figura 3: cpm di  $^3\text{H}$ - colesterolo nelle feci nel periodo 0-24h. Porzioni di feci sono state omogenizzate ed estratte al fine di isolare i lipidi ed infine contate con liquido di scintillazione I risultati sono espressi come media dei cpm +deviazione standard.

Figura 4

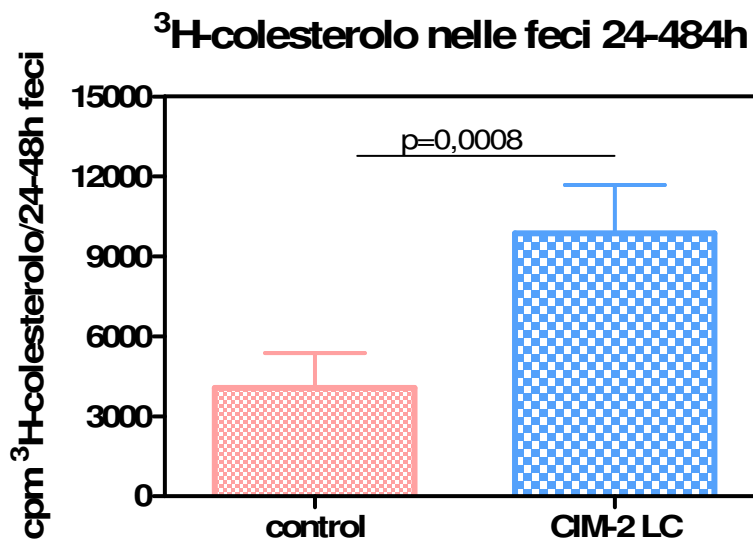
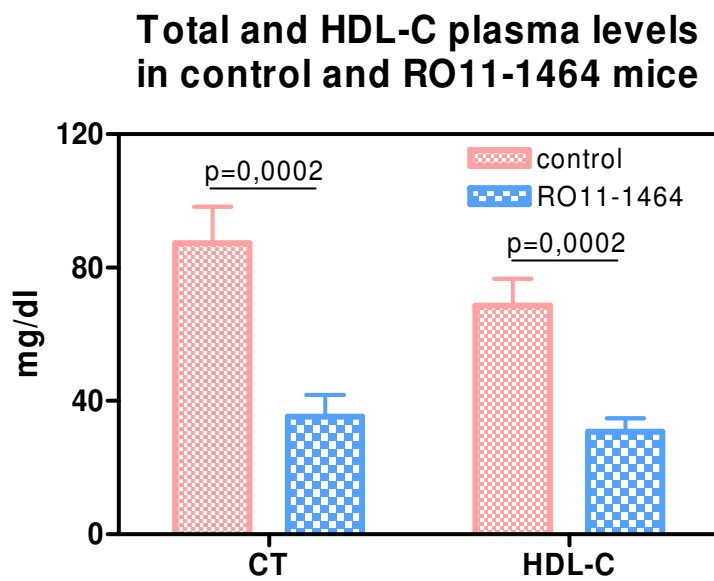


Figura 4: cpm di  $^3\text{H}$ - colesterolo nelle feci nel periodo 24-48h. Porzioni di feci sono state omogenizzate ed estratte al fine di isolare i lipidi ed infine contate con liquido di scintillazione I risultati sono espressi come media dei cpm +deviazione standard.

**Figura 5**



**Figura 5:** colesterolo totale e HDL nel plasma. Il livello plasmatico dei lipidi è stato determinato con una tecnica colorimetrica.

Dott.ssa Ilaria Zanotti  
Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Biologiche e Chimiche Applicate  
Università degli Studi di Parma