Progetto di ricerca

Studio in vitro sugli effetti del pioglitazone nella modulazione dell’infiammazione e nella protezione dell’endotelio vascolare in corso di tempesta citochinica.

BACKGROUND. L’infezione da Covid-19 e da altre gravi infezioni virali, quali la Dengue, si caratterizza per gravi manifestazioni cliniche legate principalmente ad una iper-attivazione della risposta immunitaria con eccessiva produzione di citochine pro- infiammatorie (tempesta di citochine) e conseguente endotelite con perdita del controllo della permeabilità endoteliale (1). Nell’attesa che vengano resi disponibili vaccini efficaci, appare sempre più diffuso l’uso in clinica di farmaci off-label, ovvero l'impiego nella pratica clinica di farmaci somministrati al di fuori delle condizioni autorizzate dagli enti predisposti, per patologia.

Considerato il ruolo centrale della risposta immunitaria nella patogenesi della malattia, una possibile strategia terapeutica potrebbe essere rappresentata dall’utilizzo del pioglitazone , principio attivo che appartiene alla classe dei tiazolidindioni. Il pioglitazone presenta una attività insulino-sensibilizzante e viene utilizzato nella terapia del diabete mellito di tipo 2. Accanto alle proprietà ipoglicemizzanti, il pioglitazione presenta l’interessante proprietà di essere un agonista del PPAR-γ, fattore di trascrizione appartenente alla famiglia dei recettori PPAR, che risulta anche coinvolto nella modulazione della risposta immunitaria (2). A livello cellulare, PPAR-γ è espresso in molteplici tipi cellulari, quali le cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce vascolari, ove modula vie di segnalazione coinvolte nello sviluppo delle malattie cardiovascolari (3). Uno dei meccanismi meno esplorati dell'azione anti-infiammatoria di PPAR-γ è la sua capacità di limitare l'attività dell’epossido idrolasi in forma solubile (sEH), potente enzima citosolico pro-infiammatorio, che regola localmente la disponibilità dei derivati dell’acido arachidonico come gli acidi epossieicosatrienoico (EETs), conosciuti per le loro importanti azioni anti-infiammatorie (4).

Alla luce di queste considerazioni, l’uso del pioglitazone potrebbe rappresentare un approccio innovativo per ridurre la tempesta citochinica e prevenire i danni endoteliali in caso di tempesta citochinica.

SCOPO DELLO STUDIO: Questa proposta di ricerca intende esplorare in vitro gli effetti del pioglitazone sulla espressione di PPAR-γ e dell’attività di sHE in una linea consolidata di cellule endoteliali derivate dalla vena ombelicale umana (HUVECs) come potenziale strategia per modulare le vie di segnalazione della risposta infiammatoria e prevenire il danno endoteliale. Si ipotizza che l’azione sinergica dell’iper-espressione di PPAR-γ e dell’inibizione di sHE possa essere efficace nel proteggere le cellule endoteliali umane vascolari dal danno infiammatorio.

DISEGNO SPERIMENTALE, METODI UTILIZZATI, PIANO ATTIVITA’: Nel corso del primo anno della ricerca si cercherà di ricreare in vitro il microambiente iper-infiammatorio e di verificarne gli effetti morfologici e molecolari sulle HUVEC.

Il danno infiammatorio verrà indotto attraverso la presenza nel medium di coltura del Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α); considerato il ruolo chiave che il fattore trascrizionale NF-kB ha nella risposta infiammatoria, NF-kB sarà utilizzato come evidenza del processo infiammatorio indotto in vitro e utilizzato come gene di riferimento per confrontare i dati sperimentali ottenuti mediante presenza o assenza del pioglitazone.

Come indicatori di processo (outcome) verranno utilizzati il gene target primario dell’azione del pioglitazone, ovvero PPAR-γ, l’attività dell’sEH e la quantità degli EETs rilasciati nel medium di crescita.

Per verificare il contributo dei due presunti meccanismi antinfiammatori del pioglitazone, verranno allestiti in parallelo esperimenti di silenziamento di sEH.

La microscopia elettronica a trasmissione verrà utilizzata per qualificare il danno o la protezione endoteliale, con particolare attenzione alla composizione strutturale delle giunzioni aderenti inter-endoteliali; l’espressione molecolare di ERG, potente regolatore della omeostasi endoteliale verrà utilizzata per quantificare il danno e/o la protezione endoteliale.

I metodi che saranno utilizzati nella proposta di ricerca saranno i seguenti: colture cellulari, RT-PCR e digital-PCR (NF-kB, PPAR- γ, ERG), saggi ELISA (sEH), HPLC e spettrometria di massa (EETs), microscopia elettronica a trasmissione (giunzioni endoteliali), saggi di silenziamento (sEH).

BIBLIOGRAFIA:

1. Tisoncik JR, et al. Doi: 10.1128/MMBR.05015-11

2. Ciavarella C, et al. Doi: 10.3390/molecules25092076.

3. Pini R, et al. Doi: 10.1016/j.avsg.2020.03.001.

4. Pang W, et al. doi: 10.1111/j.1440-1681.2011.05492.x