

LUANA PAULESU<sup>1</sup>, ROBERTA ROMAGNOLI<sup>2</sup>, FRANCESCA IETTA<sup>3</sup>

## Profilo infiammatorio in ratti alimentati con grani biofortificati

<sup>1, 2, 3</sup> Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Siena

### RISPOSTA INFIAMMATORIA AL DANNO CARDIACO DI TIPO ISCHEMICO

La malattia cardiovascolare è una delle maggiori cause di morte nel mondo (Mozzaffarian et al., 2016). Inoltre, l'incidenza di tale malattia si riscontra in età sempre più giovane compresa tra 30 e i 50 anni (Juonala et al., 2006). Risulta dunque di estrema importanza conoscere i meccanismi biologici alla base di questa malattia e individuarne possibili nuove strategie di terapia e prevenzione.

È generalmente riconosciuto che l'organismo reagisce a un eventuale alterazione o danno come, ad esempio, il danno cardiaco di tipo ischemico, innescando una risposta tesa a riportare la situazione alla normalità. Se la risposta è tale da compensare il danno ricevuto, si restaura lo stato di salute. Se invece il meccanismo compensatorio è inefficiente o inadeguato, la compensazione fallisce e la malattia prende il sopravvento. Nel caso di un danno miocardico di tipo ischemico, il successo della compensazione consiste nella riparazione e rigenerazione cardiaca e la risposta compensatoria è di tipo infiammatorio (Aoyagi e Mtsui, 2011) (vedi fig. 1).

In seguito al danno, il cuore reagisce producendo fattori solubili che si distribuiscono nell'ambiente liquido, tra una cellula e un'altra, nel tessuto cardiaco, o raggiungono altri organi, tramite la circolazione sanguigna (Gnecchi et al., 2008). Questi fattori solubili sono ritenuti i primi e i maggiori responsabili del processo di riparazione e rigenerazione del cuore (Gnecchi et al., 2005; 2006; Kinnaird et al., 2004). Essi infatti agiscono sui cardiomiociti determinandone la proliferazione. Esplicano inoltre un'azione fondamentale nella rigenerazione cardiaca, provvedendo ad attivare le cellule staminali residenti nel tessuto cardiaco stesso o a reclutarne altre da altri organi come il

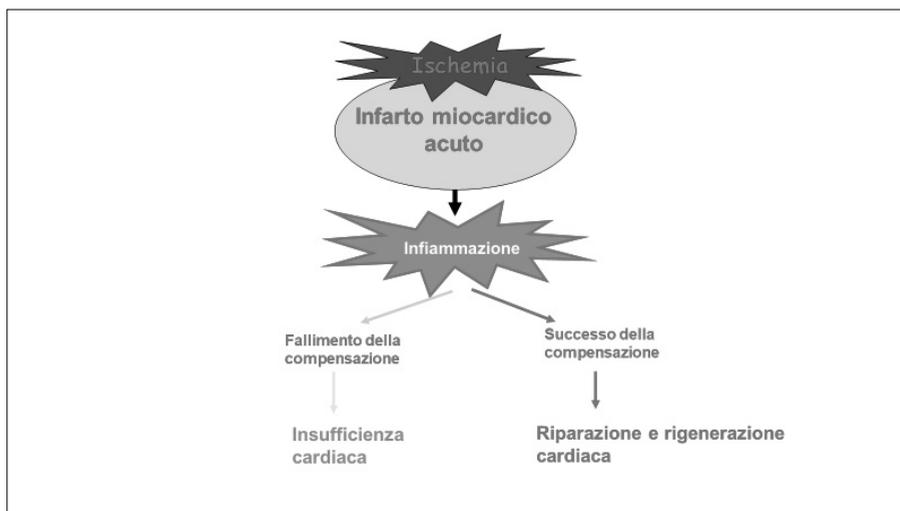


Fig. 1 *Una reazione infiammatoria iniziale costituisce la risposta protettiva al danno miocardico di tipo ischemico*

midollo osseo. Una volta nel cuore, queste cellule si differenziano verso cardiomiociti o cellule della linea vascolare (Migliang et al., 2011; Duran et al., 2013; Toma et al., 2002).

Questi fattori sono quindi da considerarsi molecole estremamente attive in quanto capaci di innescare processi importanti come la mobilitazione delle cellule, la loro attivazione e differenziazione verso diversi tipi cellulari. Sappiamo infatti che laddove sono prodotte, queste molecole provocano una reazione infiammatoria. In seguito al danno, il tessuto cardiaco si infila infatti di leucociti i quali interagiscono con le cellule cardiache attivandole. Sebbene i macrofagi siano la maggiore fonte di fattori pro-infiammatori, anche le cellule cardiache possono generare questo stesso tipo di molecole (Rock e Kono, 2008).

Una risposta iniziale di tipo infiammatorio è dunque essenziale per il riparo e la rigenerazione del tessuto (Medzhitov, 2008).

È tuttavia importante notare che tale stato infiammatorio, seppur essenziale per innescare la reazione, dovrà successivamente essere controllato. Se infatti, la reazione infiammatoria persiste e prende il sopravvento sui processi ricostruttivi, si libereranno fattori ossidanti come i ROS, fattori apoptotici e proteasi che porteranno a necrosi, apoptosi e morte delle cellule normali (Rock e Kono, 2008). Di conseguenza, una prolungata reazione infiammatoria è considerata parte della patogenesi di una varietà di malattie cardiache come

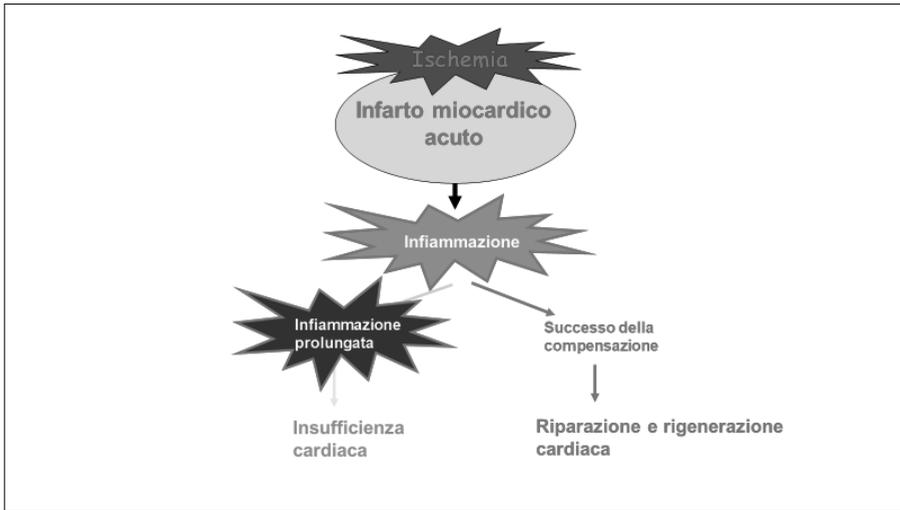


Fig. 2 Una prolungata risposta infiammatoria, dopo un danno cardiaco di tipo ischemico, può causare il fallimento della risposta compensatoria, portando a malattie cardiache croniche

l'insufficienza cardiaca cronica e un alterato rimodellamento ventricolare sinistro (Hohensinner et al., 2011) (vedi fig. 2).

#### PRINCIPALI MEDIATORI DELLA RISPOSTA INFIAMMATORIA

La reazione infiammatoria che avviene nel tessuto cardiaco, in seguito al danno ischemico, è mediata da numerosi fattori secreti sia dalle cellule del tessuto cardiaco, fibroblasti e cardiomiociti, che dai leucociti presenti nel tessuto stesso, inizialmente i neutrofili e successivamente i monociti e i macrofagi (Rock e Kono, 2008). L'interazione molecolare tra questi diversi tipi di cellule, miocardiche e immunitarie, risulta uno dei maggiori determinanti della risposta compensatoria all'ischemia cardiaca, risultante nel processo riparativo del danno (Jones, 2005).

I fattori molecolari che caratterizzano il processo infiammatorio in un tessuto fanno generalmente parte di un ampio complesso di molecole con attività differenti e che esercitano le loro azioni con meccanismi diversi. Queste molecole possono agire in maniera paracrina sulle cellule adiacenti o, in maniera autocrina, sulle cellule produttrici stesse, attivando o inibendo la loro attività. Le molte molecole prodotte fungono quindi da regolatori dell'attività del tessuto e delle cellule in esso contenute. Per quanto riguarda il cuore, in uno stato post-infartuale, gli effetti maggiormente conosciuti riguardano

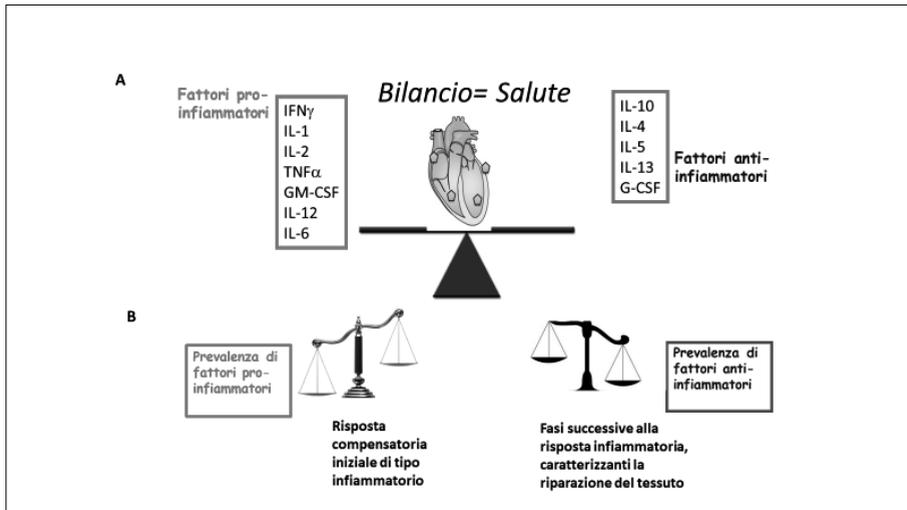


Fig. 3 Rapporto tra fattori pro- e anti-infiammatori nelle diverse condizioni caratterizzanti lo stato di salute (A) e nelle diverse fasi della risposta compensatoria al danno cardiaco di tipo ischemico (B)

il metabolismo cellulare, la contrattilità cardiaca e la neovascolarizzazione (Gnecchi et al., 2008).

Le molecole solubili attive, prodotte in un tessuto, posseggono proprietà che si possono definire di tipo pro- o anti-infiammatorio e sono generalmente denominate di tipo Th1 (le pro-infiammatorie) o di tipo Th2 (le anti-infiammatorie) (Moss et al., 2004). La definizione Th1 e Th2 deriva dal fatto che molti di questi tipi di molecole sono prodotte dai linfociti T helper tipo 1, come ad esempio l'Interleuchina 1 (IL-1), l'IL-2 e il Fattore di necrosi tumorale alfa (TNF $\alpha$ ), mentre altri sono prodotti dai linfociti T helper 2, come ad esempio l'IL-4, l'IL-5 e l'IL-10. Ci sono però altri fattori che non rientrano in queste due categorie, Th1 e Th2, in quanto prodotti da altri tipi cellulari ma sono ugualmente riconosciuti possedere attività pro- o anti-infiammatorie come ad esempio i fattori stimolanti le colonie (CSF), tra questi, il fattore derivante dai granulociti e i macrofagi (GM-CSF) riconosciuto come avente attività pro-infiammatoria e il G-CSF (derivato dai granulociti) riconosciuto come fattore anti-infiammatorio (Hamilton, 2020; Boneberg e Hartung, 2002). Questi due specifiche molecole sono di estrema rilevanza dopo un danno ischemico, in quanto potenzialmente abili al reclutamento delle cellule staminali dal midollo osseo.

Molecole con attività pro- e anti-infiammatoria sono generalmente presenti in un tessuto sebbene il rapporto tra loro possa cambiare sulla base delle

condizioni dell'organismo e del microambiente. È probabile che questi fattori siano rilasciati in una maniera spazio- e tempo-dipendente formando un pool di molecole con caratteristiche prevalentemente di tipo pro- o anti-infiammatorio. Nello stato di salute, questi due tipi di molecole appaiono bilanciarsi in maniera equilibrata, senza alcuna prevalenza delle une sulle altre. In uno stato infiammatorio, come quello post-infartuale, le molecole con attività pro-infiammatoria prevalgono su quelle anti-infiammatorie spostando il peso della bilancia a proprio favore. Al contrario, in una situazione in cui la reazione infiammatoria deve attenuarsi o regredire come nel caso delle fasi successive alla risposta infiammatoria iniziale, durante le quali, hanno luogo i processi di riparazione tissutale, il peso della bilancia si sposta a favore delle molecole anti-infiammatorie. I diversi tipi di rapporti tra le molecole pro- e quelle anti-infiammatorie, nelle diverse condizioni dell'organismo e nelle fasi sequenziali di risposta al danno cardiaco ischemico, sono rappresentati in figura 3.

#### STUDIO SPERIMENTALE SUGLI EFFETTI DI UN GRANO ANTICO TOSCANO (PROGETTO F.A.T.E.PRE.SCO)

Sulla base dell'importanza dello stato infiammatorio nella riparazione e rigenerazione cardiaca successiva al danno tissutale ischemico, abbiamo condotto uno studio sugli effetti potenzialmente benefici di un'alimentazione a base di grano antico toscano (Gentilrosso) biofortificato (Bio) o non Biofortificato (Non-Bio) con ferro e zinco (Progetto F.A.T.E.Pre.Sco, finanziato dalla Regione Toscana e coordinato dall'Istituto di Scienze della Vita della Scuola Superiore Sant'Anna di Pisa).

Il profilo infiammatorio è stato valutato mediante analisi di molecole pro- e anti-infiammatorie, su campioni di siero di ratto raccolti dopo alcune settimane dal danno ischemico.

I dati ottenuti hanno mostrato che l'alimentazione con grano GentilRosso produce un cambiamento nel rapporto tra fattori pro- e anti-infiammatori e che il bilanciamento tra questi due tipi di fattori sia favorito dalla biofortificazione del grano. Gli studi appaiono inoltre indicare differenze sessuali, maschi e femmine, nella produzione di molecole di tipo pro- e anti-infiammatorio.

I dati ottenuti, seppur preliminari, ci incoraggiano ad approfondire le conoscenze sul ruolo degli elementi contenuti nel grano da noi esaminato e sugli effetti potenzialmente benefici della biofortificazione. Ulteriori analisi saranno inoltre utili a definire i fattori tissutali coinvolti nei processi di riparazione e rigenerazione del miocardio.

## CONCLUSIONI

La riparazione e rigenerazione cardiaca dopo un danno cardiaco di tipo ischemico coinvolge la produzione e l'azione di fattori solubili con attività pro- e anti-infiammatoria. Un corretto bilanciamento tra questi due tipi di fattori è fondamentale per definire le varie fasi della risposta infiammatoria al danno. Uno studio in corso nell'ambito del progetto F.A.T.E.Pre.Sco, ha messo in luce l'importanza di un'alimentazione con un grano antico toscano biofortificato con ferro e zinco. I cambiamenti apportati da questo tipo di alimentazione potrebbero contribuire a un corretto assestamento dello stato infiammatorio, essenziale per permettere i processi riparativi e rigenerativi del tessuto cardiaco stesso.

## RIASSUNTO

*Obiettivi:* analisi biochimica di campioni tissutali ed ematici di animali alimentati con pane fatto da farina di grano antico toscano (Gentilrosso) biofortificato (Bio) o non Biofortificato con ferro e zinco (Non-Bio).

*Hypothesis:* l'alimentazione con un grano biofortificato possa contribuire ad un assestamento del sistema infiammatorio utile a prevenire l'insufficienza del cuore dopo infarto miocardico acuto.

*Piano sperimentale:* il profilo infiammatorio è stato valutato mediante analisi di molecole pro- e anti-infiammatorie, con un dosaggio Multiplex ELISA, su campioni di siero raccolti dopo 6 settimane dal danno ischemico (numero di animali: n=15 Non Bio; n=17 Bio). Biopsie di tessuto cardiaco degli stessi animali sono stati esaminati per l'espressione di pathways intracellulari mediante analisi Western blot.

*Risultati:* una prima analisi effettuata sul totale dei campioni di siero da animali alimentati con grano Bio o Non-Bio, non rivelava sostanziali differenze tra i due gruppi, per quanto riguarda il quadro dei fattori pro- e anti-infiammatori. La stratificazione degli animali secondo il sesso (maschio, femmina) ha tuttavia rilevato differenze significative per quanto riguarda l'effetto dell'alimentazione con grano Bio rispetto a quello con grano Non-Bio. In particolare, nel maschio, si è evidenziata una diminuzione di alcuni dei fattori pro-infiammatori (IL-1a, IL-1b e IL-2) mentre nessuna variazione era osservata per i fattori anti-infiammatori (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13). Nel caso delle femmine, l'alimentazione con pane da grani Bio causava un generale aumento di fattori pro-infiammatori, che risultava significativo per l'IL-1, accompagnato anche da un aumento di fattori anti-infiammatori, significativo per l'IL-13 e l'IL-5. L'analisi proteica nel tessuto cardiaco mostrava un aumento di marcatori di proliferazione nel cuore di ratti alimentati con pane Bio senza differenze di rilievo tra i due sessi.

*Conclusioni:* il cambiamento del quadro pro- e anti-infiammatorio, causato dall'alimentazione con pane ottenuto da grani biofortificati in animali sottoposti a danno cardiaco, potrebbe contribuire al restauro del corretto equilibrio dello stato infiammatorio essenziale per la riparazione del tessuto miocardico. La rigenerazione del tessuto è anche sostenuta dall'aumento di fattori specifici della proliferazione.

## ABSTRACT

*Inflammatory profile in rats fed with biofortified wheat. Objectives:* biochemical analysis of tissue and blood samples from animals fed with bread made with a Tuscan ancient grain (Gentilrosso) biofortified (Bio) or not biofortified (Non-Bio) with iron- and zinc.

*Hypothesis:* feeding with a biofortified wheat can contribute to setting up the inflammatory system for preventing heart failure after acute myocardial infarction.

*Experimental plan:* the inflammatory profile was evaluated by analysis of pro- and anti-inflammatory molecules, using a Multiplex ELISA assay, in serum samples collected after 6 weeks from ischemic damage (number of animals: n = 15 Non-Bio; n = 17 Bio). Heart tissue biopsies from the same animals were examined for the expression of intracellular pathways by Western blot analysis.

*Results:* a first analysis carried out on the total number of serum samples from animals fed with Bio or Non-Bio wheat, did not reveal any substantial difference between the two groups, as regards the pro- and the anti-inflammatory factors. The stratification of animals according to sex (male, female) however revealed significant differences with regard to the effect of feeding with Bio wheat compared to that of Non-Bio wheat. In particular, in males, there was a decrease in some of the pro-inflammatory factors (IL-1a, IL-1b and IL-2) while no variation was observed for some of the anti-inflammatory ones (IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13). In females, feeding with bread from Bio wheat caused a general increase in pro-inflammatory factors, which was statically significant for IL-1. These animals also showed a statistically significant increase of anti-inflammatory factors, IL-13 and IL-5. Protein analysis in cardiac tissue showed an increase in proliferation markers in the heart of rats fed with Bio bread without differences between the two sexes.

*Conclusions:* the change of the pro- and anti-inflammatory framework, caused by feeding with bread obtained from biofortified grains, in animals after acute myocardial infarction, could contribute to the restoration of the correct balance of the inflammatory state, essential for the repair of myocardial tissue. Tissue regeneration is also supported by the increase in specific proliferation factors.

## BIBLIOGRAFIA

- AOYAGI T., MATSUI T. (2011): *The Cardiomyocyte as a Source of Cytokines in Cardiac Injury*, «J Cell Sci Ther.», 1, 2012 (S5).
- BONEBERG E.M., HARTUNG T. (2002): *Molecular aspects of anti-inflammatory action of G-CSF*, «Inflamm Res.», 51 (3), pp. 119-128.
- DURAN J.M., MAKAREWICH C.A., SHARP T.E., STAROSTA T., ZHU F., HOFFMAN N.E., CHIBA Y., MADESH M., BERRETTA R.M., KUBO H., HOUSER S.R. (2013): *Bone-derived stem cells repair the heart after myocardial infarction through transdifferentiation and paracrine signaling mechanisms*, «Circ Res.», 16, 113 (5), pp. 39-552.
- GNECCHI M., HE H., LIANG O.D., MELO L.G., MORELLO F., MU H., NOISEUX N., ZHANG L., PRATT R.E., ING WALL J.S., DZAU V.J. (2005): *Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells*, «Nat Med.», 11 (4), pp. 367-368.
- GNECCHI M., HE H., NOISEUX N., LIANG O.D., ZHANG L., MORELLO F., MU H., MELO

- L.G., PRATT R.E., ING WALL J.S., DZAU V.J. (2006): *Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement*, «FASEB J.», 20 (6), pp. 661-669.
- GNECCHI M., ZHANG Z., NI A., DZAU V.J. (2008): *Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy*, «Circ Res.», 21, 103 (11), pp. 1204-1219.
- HAMILTON J.A. (2020): *GM-CSF in inflammation*, «J Exp Med.», 6, 217 (1).
- HOHENSINNER P.J., NIESSNER A., HUBER K., WEYAND C.M., WOITA J. (2011): *Inflammation and cardiac outcome*, «Curr. Opin. Infect Dis.», 24 (3), pp. 259-264.
- JONES S.A. (2005): *Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6*, «J Immunol.», 15, 175 (6), pp. 3463-3468.
- JUONALA M., VIKARI J.S., RASANEN L., HELENIUS H., PIETIKAINEN M., RAITAKARI O.T. (2006): *Young adults with family history of coronary heart disease have increased arterial vulnerability to metabolic risk factors: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study*, «Arterioscler Thromb Vasc Biol.», 26 (6), pp. 1376-1382.
- KINNAIRD T., STABILE E., BURNETT M.S., SHOU M., LEE C.W., BARR S., FUCHS S., EPSTEIN S.E. (2004): *Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms*, «Circulation», 30, 109 (12), pp. 1543-1549.
- MEDZHITOV R. (2008): *Origin and physiological roles of inflammation*, «Nature», 24, 454 (7203), pp. 428-435.
- MINGLIANG R., BO Z., ZHENG GUO W. (2011): *Stem cells for cardiac repair: status, mechanisms, and new strategies*, «Stem Cells Int.», 310928.
- MOSS R.B., MOLL T., EL-KALAY M., KOHNE C., SOO HOO W., ENCINAS J., CARLO D.J. (2004): *Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: therapeutic implications*, «Expert Opin Biol Ther.», 4 (12), pp. 1887-1896.
- ROCK K.L., KONO H. (2008): *The inflammatory response to cell death*, «Annu Rev Pathol.», 3, pp. 99-126.
- MOZAFFARIAN D., BENJAMIN E.J., GO A.S., ARNETT D.K., BLAHA M.J., CUSHMAN M., DAS S.R., DE FERRANTI S., DESPRES J.P., FULLERTON H.J., HOWARD V.J., HUFFMAN M.D., ISASI C.R., JIMENEZ M.C., JUDD S.E., KISSELA B.M., LICHTAMN J.H., ISABETH L-D., LIU S., MACKAY R.H., MAGID D.J., MCGUIRE D.K., MOHLER E.R. 3RD, MOY C.S., MUNTNER P., MUSSOLINO M.E., NASIR K., NEUMAR R.W., NICHOL G., PALANIAPPAN L., PANDEY D.K., REEVES M.J., RODRIGUEZ C.J., ROSAMOND W., SORLIE P.D., STEIN J., TOWFIGHI A., TURAN T.N., VIRANI S.S., WOO D., YEH R.W., TURNER M.B. (2016): *Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association*, «Circulation», 26, 133 (4): e38-360.
- TOMA C., PITTENGER M.F., CAHILL K.S., BYRNE B.J., KESSLER P.D. (2002): *Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart*, «Circulation», 1, 105 (1), pp. 93-98.