

Titolo: Il potenziale elettrico di membrana e il pH intracellulare come fattori che influenzano la concentrazione intracellulare di ascorbato e il loro ruolo nel trattamento del cancro - The Membrane Electrical Potential and Intracellular pH as Factors Influencing Intracellular Ascorbate Concentration and Their Role in Cancer Treatment.

Codice: ASC012

Autore: Gąbka et al.

Data: 2021

Rivista: Cells 10(11), 2964

Argomento: acido ascorbico

Accesso libero: si

DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10112964>

URL: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/11/2964>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2025/01/17/asc012-gabka-et-al-2021/>

Parole chiave: vitamina C; potenziale elettrico di membrana; trattamento del cancro; ferroptosi; efficacia dell'ascorbato

Tumore: n/a

Traduzione: L'articolo è stato tradotto in tutte le sue parti, con semplificazioni nella sezione "Risultati"

Punti di interesse:

L'ascorbato è un elemento importante per una varietà di processi cellulari, tra cui il controllo dei livelli di specie reattive dell'ossigeno che sono un fattore chiave nella carcinogenesi e nella terapia antitumorale. L'afflusso di ascorbato attivo al citoplasma delle cellule è facilitato da due trasportatori dedicati, SVCT1 e SVCT2. Studi recenti hanno dimostrato che l'ascorbato può anche attraversare la membrana plasmatica tramite diffusione passiva. La diffusione passiva di un acido debole attraverso le membrane dipende dal potenziale elettrostatico e dai gradienti di pH. Il livello di ascorbato intracellulare è quindi mantenuto dall'equilibrio di due flussi: il trasporto attivo geneticamente controllato e il trasporto passivo, che dissipa il gradiente di concentrazione dell'ascorbato generato dal trasporto attivo attraverso la membrana plasmatica. Il trasporto passivo è influenzato dalle proprietà elettriche delle membrane cellulari che differiscono tra cellule sane e cellule tumorali. L'ascorbato è generalmente considerato non tossico, tuttavia, quando aggiunto alle colture tissutali in concentrazioni di pochi mM provoca la morte delle cellule cancerose. Questi esperimenti indicano che le cellule cancerose sono sensibili alle elevate concentrazioni di ascorbato. Sulla base di questo l'ascorbato è stato proposto per il trattamento di vari tumori con protocolli clinici in cui una grande quantità di ascorbato viene somministrata per via endovenosa, con la ipotesi che la concentrazione di una sostanza attiva nel sangue è determinante della concentrazione nei tessuti di interesse. Questa ipotesi potrebbe però non essere valida per l'ascorbato a causa dell'esistenza di trasportatori di membrana specifici e del controllo fisiologico della sua concentrazione nel siero e nelle cellule. Di conseguenza, lo sforzo di elevare la concentrazione sierica di ascorbato potrebbe non essere necessario per ottenere l'effetto terapeutico. Recenti studi hanno mostrato che uno dei meccanismi alla base della tossicità per le cellule tumorali di un alto livello di ascorbato è determinato dall'aumento del ferro labile nel citoplasma, che a sua volta causa un massiccio aumento di specie reattive dell'ossigeno che comporta la successiva morte cellulare per ferroptosi. Il rilascio di ioni ferrosi indotto dall'ascorbato non può essere facilmente controllato dalla cellula. Se il flusso passivo in uscita dell'ascorbato (dipendente dalle proprietà elettriche di membrana) viene per qualche motivo limitato, i suoi livelli intracellulari possono aumentare fino a livelli tossici. L'importante conseguenza del flusso passivo dell'ascorbato attraverso il doppio strato lipidico è che il potenziale elettrico della membrana plasmatica e il pH

locale influenzano la concentrazione intracellulare di ascorbato. E questo apre alla possibilità di utilizzare le differenze di potenziale elettrico della membrana plasmatica e/o del pH locale tra cellule sane e tumorali come strumento di selettività terapeutica. Nelle cellule tumorali, a causa di proprietà elettriche della membrana plasmatica particolari e del pH locale, l'ascorbato può aumentare a livelli tali da innescare la ferroptosi.

In questo studio viene presentata un'analisi matematica quantitativa volta a determinare la dipendenza della concentrazione intracellulare (all'interno della cellula) di ascorbato, allo stato stazionario, dalla sua concentrazione nel siero, nonché il tempo necessario per raggiungere il livello di stato stazionario, per le cellule sane e tumorali.

Considerazioni generali alla base del modello presentato

Le terapie basate sull'ascorbato si basano sul presupposto che l'ascorbato influenzi uno specifico processo molecolare nelle cellule cancerose in un modo dipendente dalla concentrazione extracellulare, in linea con il pensiero farmacologico classico. Tuttavia, l'applicazione dell'ascorbato come agente farmacologico è diversa, per la sua dualità funzionale e per i processi di regolazione attivi e passivi della concentrazione di ascorbato nel citoplasma. A seconda della sua concentrazione intracellulare, la sua funzione può variare: dalla funzione di cofattore e antiossidante, al causare la morte cellulare per ferroptosi. L'innescamento avviene ad una specifica concentrazione di ascorbato all'interno della cellula. Questa dualità funzionale può essere utilizzata nel trattamento del cancro solo se esiste un meccanismo di selettività per l'acquisizione di ascorbato da parte delle cellule. Nel modello matematico studiato, si è ipotizzato che questa selettività risieda nella membrana plasmatica e nelle sue proprietà elettriche. Quindi la concentrazione intracellulare di ascorbato allo stato stazionario sarà influenzata da proprietà cellulari, quali pH citoplasmatico, pH extracellulare, potenziale elettrico della membrana, numero di trasportatori SVCT2 presenti nella membrana plasmatica e attività metabolica cellulare. Per questi parametri esistono differenze sostanziali tra cellule sane e cellule tumorali. Per l'analisi presentata in questo lavoro sono stati confrontati due modelli di cellule immaginarie, che differiscono per quanto riguarda queste caratteristiche. Visto che è generalmente accettato che il livello terapeutico efficace possa essere raggiunto solo tramite infusione endovenosa di una grande quantità di ascorbato, uno degli obiettivi della simulazione era determinare se le concentrazioni terapeutiche possono essere raggiunte tramite integrazione orale prolungata con preparazioni tradizionali o liposomiali.

Risultati principali del modello matematico

- 1) La concentrazione di ascorbato intracellulare allo stato stazionario calcolata nell'intera gamma di parametri utilizzati è significativamente più alta nelle cellule cancerose rispetto alle cellule sane, indicando un alto livello di selettività del trattamento.
- 2) L'effetto del potenziale elettrico di membrana colpisce le cellule cancerose in misura molto maggiore, indipendentemente dal valore della concentrazione di ascorbato extracellulare.
- 3) La concentrazione intracellulare di ascorbato allo stato stazionario dipende dal pH intracellulare. Ciò è dovuto al livello di protonazione dell'ascorbato all'interno della cellula che influenza drasticamente la sua perdita passiva. La concentrazione intracellulare di ascorbato allo stato stazionario è molto sensibile alle differenze di pH tra fluidi extracellulari e intracellulari.
- 4) Il numero di trasportatori SVCT influenza la concentrazione intracellulare di ascorbato allo stato stazionario. Questo numero è controllato epigeneticamente, può influenzare l'effetto del trattamento, specialmente quando il trattamento è prolungato nel tempo. Anche le varianti genetiche dei trasportatori possono influenzare l'esito del trattamento.
- 5) La risposta epigenetica delle cellule tumorali è molto più forte (aumento maggiore dei trasportatori SVCT) delle cellule sane rispetto alla loro capacità di modulare la loro concentrazione intracellulare di ascorbato.

3) Le simulazioni indicano che non ci sia alcuna differenza tra le vie di somministrazione orale e endovenosa poiché c'è poca differenza tra le concentrazioni intracellulari di ascorbato allo stato stazionario quando la sua concentrazione nel siero è pari a 0,2, 0,5 e 1 mM.

4) Il tempo necessario per raggiungere le concentrazioni intracellulari di ascorbato allo stato stazionario è un parametro critico. Sono presentati tre andamenti temporali per 0,2, 0,5 e 1 mM di concentrazioni extracellulari di ascorbato per mostrare che nel caso del trattamento con ascorbato, la concentrazione sierica non è così importante, ma è invece critico il tempo di esposizione. I risultati ottenuti mostrano che l'effetto terapeutico può essere ottenuto quando la concentrazione sierica di ascorbato è facilitata dall'integrazione utilizzando tutte le vie di somministrazione disponibili, purché il tempo di esposizione sia sufficientemente lungo (giorni, non ore).

Discussione

Nella farmacologia classica, il composto attivo è di origine esogena ed è progettato per raggiungere e influenzare specifici bersagli molecolari. In genere, l'internalizzazione di tale composto da parte di una cellula non è facilitata dalle proteine di membrana, ma piuttosto si diffonde attraverso il doppio strato lipidico. L'efficacia della diffusione passiva dipende principalmente dalla concentrazione del composto attivo nel siero. Questo perché la diffusione passiva necessita di un gradiente di concentrazione attraverso la membrana plasmatica cellulare. Questo processo molto aspecifico è una fonte di tossicità sistemica e la selettività verso le cellule bersaglio si basa sull'affinità preferenziale verso un'entità molecolare attentamente selezionata.

Per quanto riguarda le terapie con ascorbato, il modello presentato nel documento mostra che la concentrazione di ascorbato nel siero non è un buon parametro per progettare una terapia efficace. Questo perché la diffusione passiva non è un meccanismo responsabile dell'ingresso dell'ascorbato nel citoplasma cellulare, come nel caso di tutti i farmaci esogeni. L'anione dell'ascorbato viene attivamente accumulato all'interno della cellula da trasportatori dedicati della membrana plasmatica. Quando i trasportatori sono saturi, a circa 0,1 mM di concentrazione sierica di ascorbato, un ulteriore aumento della sua concentrazione non è produttivo. Considerando la recente scoperta della diffusione passiva dell'ascorbato attraverso i doppi strati lipidici e supponendo che la ferroptosi sia il meccanismo principale dell'attività terapeutica dell'ascorbato, è stato proposto un modello che mostra che la concentrazione sierica dell'ascorbato non è di importanza critica, ma piuttosto la durata del trattamento. La somministrazione di ascorbato per via orale per un tempo sufficientemente lungo dovrebbe dare risultati terapeutici migliori rispetto a un'infusione endovenosa relativamente breve (poche ore) delle sue grandi quantità.

Conclusioni finali

La concentrazione di ascorbato all'interno di una cellula è il risultato di tre processi, degradazione metabolica, trasporto attivo facilitato da trasportatori dedicati (SVCT1 e SVCT2) e diffusione passiva attraverso il doppio strato lipidico della membrana plasmatica. La dipendenza del trasporto passivo dalla protonazione dell'ascorbato e dalla differenza di potenziale della membrana plasmatica possono essere utilizzate per il targeting selettivo dell'ascorbato sulle cellule cancerose. In particolare, la maggior parte delle cellule che costituiscono il corpo umano sono altamente differenziate. Tali cellule sono caratterizzate, tra le altre cose, da un'elevata negatività all'interno del potenziale elettrico della membrana plasmatica (che raggiunge -100 mV). Le cellule tumorali sono diverse, poiché il loro potenziale elettrico della membrana plasmatica è solitamente basso e non supera -10 mV. Questa differenza può essere utilizzata per aumentare la concentrazione di ascorbato nel citoplasma delle cellule tumorali senza influenzare le cellule sane. Questo effetto può giustificare l'applicazione dell'ascorbato come trattamento di supporto nella terapia del cancro caratterizzata da tossicità sistemica nulla o bassa. Le simulazioni presentate nel documento mostrano che tale trattamento per essere efficace richiede il mantenimento di una concentrazione di

ascorbato sufficiente, anche se non necessariamente eccessivamente elevata, nel plasma e nei fluidi interstiziali. Tuttavia, a causa della capacità limitata del trasporto attivo, l'esposizione all'ascorbato dovrebbe essere estesa nel tempo per giorni piuttosto che per ore.

Traduzione articolo

Riassunto

L'ascorbato è un elemento importante per una varietà di processi cellulari, tra cui il controllo dei livelli di specie reattive dell'ossigeno. Poiché le specie reattive dell'ossigeno sono implicate come fattore chiave nella tumorigenesi e nella terapia antitumorale, l'iniezione di una grande quantità di ascorbato è considerata benefica nella terapia del cancro. Studi recenti hanno dimostrato che l'ascorbato può attraversare la membrana plasmatica tramite diffusione passiva. In contrasto dell'assorbimento tramite trasporto attivo, che è facilitato dalle proteine di trasporto (SVCT1 e SVCT2). La diffusione passiva di un acido debole attraverso le membrane dipende dal potenziale elettrostatico e dai gradienti di pH. Ciò è stato utilizzato per costruire un nuovo modello teorico in grado di fornire una concentrazione di ascorbato allo stato stazionario nello spazio intracellulare e di valutare il tempo necessario per raggiungerla. La conclusione principale dell'analisi è che la concentrazione intracellulare di ascorbato allo stato stazionario dipende debolmente dalla sua concentrazione sierica, ma richiede giorni di esposizione per saturarsi. Sulla base di questi risultati, si può ipotizzare che la somministrazione orale prolungata di ascorbato sia probabilmente più efficace di una breve infusione endovenosa di elevate quantità di ascorbato.

1. Introduzione

L'ascorbato è un composto indispensabile per il mantenimento dell'omeostasi corporea. È necessario per una varietà di processi metabolici che vanno dal mantenimento della matrice extracellulare alla garanzia del flusso efficace di informazioni tra il genoma cellulare e il proteoma [1,2]. La sua carenza porta a patologie che vanno da lievi sintomi alla morte, a seconda della grandezza e della durata della carenza [3]. La distribuzione dell'ascorbato nel corpo umano è direttamente correlata all'attività metabolica di tessuti e cellule, vale a dire, maggiore è l'attività metabolica locale, più ascorbato è richiesto [4]. L'omeostasi dell'ascorbato nei fluidi extracellulari e la sua complessa distribuzione all'interno delle cellule sono mantenute dalla combinazione di trasporti passivi e attivi. L'afflusso di ascorbato attivo al citoplasma è facilitato da due trasportatori dedicati, SVCT1 e SVCT2 [5]. L'importanza della concentrazione intracellulare di ascorbato, che è prevalentemente controllata dai trasportatori SVCT2, è stata dimostrata utilizzando topi knock-out. Mentre i topi senza SVCT1 sono riusciti a sopravvivere, quelli senza SVCT2 muoiono alla nascita [4]. Ciò dimostra che la distribuzione dell'ascorbato tra le cellule è fondamentale per la sopravvivenza dell'organismo. Come descritto altrove, il livello di ascorbato intracellulare è mantenuto dall'equilibrio di due flussi, entrambi alimentati dal trasporto attivo geneticamente controllato [6], dove il trasporto passivo dissipa il gradiente di concentrazione dell'ascorbato generato dal trasporto attivo attraverso la membrana plasmatica. Essendo un elemento critico dell'omeostasi corporea, il livello di ascorbato nei fluidi extracellulari è strettamente controllato e l'eccesso viene rapidamente escreto [7]. L'ascorbato è generalmente considerato non tossico, tuttavia, quando aggiunto alle colture tissutali in concentrazioni di pochi mM provoca la morte delle cellule cancerose. Questi esperimenti indicano che le cellule cancerose sono sensibili alle elevate concentrazioni di ascorbato [6]. Sulla base di tali dati, è stato proposto il trattamento di vari tumori in cui una grande quantità di ascorbato viene somministrata per via endovenosa [8,9,10]. Il protocollo terapeutico è tradotto direttamente dalla farmacologia classica, dove la concentrazione di

una sostanza attiva nel sangue è sufficiente per valutare la sua concentrazione nei tessuti di interesse. Questa ipotesi critica potrebbe non essere valida per l'ascorbato a causa dell'esistenza di trasportatori di membrana specifici e del controllo fisiologico della sua concentrazione nel siero [8]. Di conseguenza, lo sforzo di elevare la concentrazione sierica di ascorbato potrebbe non essere necessario per ottenere l'effetto terapeutico, specialmente quando l'emivita della concentrazione elevata nel siero è inferiore a un'ora [9]. Gli attuali protocolli della procedura sono il risultato di un approccio di tentativi ed errori che mira a raggiungere concentrazioni sieriche quando l'ascorbato è tossico per le cellule tumorali, ovvero pochi mM [10]. L'infusione prolungata nel tempo di grandi quantità di ascorbato è scomoda e il suo esito è incerto, dovuto principalmente alla pura comprensione dei meccanismi molecolari responsabili della selettività del trattamento verso le cellule tumorali. È stato postulato che un alto livello di ascorbato porta a una maggiore quantità di ferro labile nel citoplasma, causando un massiccio aumento di specie reattive dell'ossigeno e la successiva morte cellulare (ferroptosi) [11,12]. Effetti simili accompagnano la chemioterapia e sono necessari per il danno alle cellule cancerose [13]. Pertanto, la capacità di generare specie reattive dell'ossigeno posiziona l'ascorbato come un composto potenzialmente utile nella terapia del cancro. Nel documento viene presentato il nuovo modello di assunzione di ascorbato da parte delle cellule, che tiene conto della diffusione passiva. L'importante conseguenza della capacità dell'ascorbato di penetrare il doppio strato lipidico è che il potenziale elettrico della membrana plasmatica e il pH locale dovrebbero essere inclusi nella valutazione della concentrazione intracellulare di ascorbato allo stato stazionario [14]. Ciò apre la possibilità di utilizzare la differenza di potenziale elettrico della membrana plasmatica e/o il pH locale come strumento di selettività.

Per semplicità, è stato selezionato il singolo meccanismo dipendente dall'ascorbato che causa la morte cellulare. In particolare, la concentrazione sufficientemente elevata di ascorbato all'interno di una cellula può ridurre gli ioni ferrici in ioni ferrosi labili altamente tossici, che probabilmente porteranno alla morte cellulare per distruzione aspecifica di componenti cellulari vitali (ferroptosi [15,16]). Il rilascio di ioni ferrosi indotto dall'ascorbato dalle sue riserve proteiche intracellulari non può essere facilmente controllato dalla cellula, contrariamente ai farmaci esogeni [17]. Questa importante differenza tra farmaci esogeni e ascorbato nel mantenimento di una concentrazione intracellulare elevata è dovuta al fatto che, mentre non ci sono trasportatori specifici per un farmaco esogeno, l'ascorbato viene attivamente accumulato all'interno delle cellule da proteine di membrana dedicate (SVCT1 e SVCT 2) [18]. Al contrario, il farmaco esogeno può essere rimosso attivamente dal citoplasma dai trasportatori ABC, portando alla resistenza al farmaco [19,20]. Poiché tutti i trasportatori di membrana noti sono progettati per condensare l'ascorbato nel citoplasma, quindi, la cellula non ha difese molecolari efficaci contro l'elevato livello di ascorbato nel citoplasma. Gli unici modi per ridurre la concentrazione di ascorbato all'interno della cellula sono il suo flusso passivo attraverso la membrana plasmatica o la sua ossidazione a DHA, che successivamente si diffonde fuori dalla cellula attraverso i canali GLUT o viene rapidamente ridotto di nuovo ad ascorbato dai processi metabolici all'interno della cellula. Pertanto, l'ossidazione dell'ascorbato non influenzerà significativamente la sua concentrazione citoplasmatica [6]. Il livello eccessivo di ascorbato nel citosol può innescare la ferroptosi, portando alla morte cellulare [21]. Il livello intracellulare di ascorbato in una cellula specifica dipende, oltre al consumo metabolico, da una serie di trasportatori di ascorbato e gradienti elettrici e di pH attraverso la sua membrana plasmatica [8]. A causa delle differenze nel potenziale elettrico della membrana plasmatica e nel pH locale, l'ascorbato aumenterà nelle cellule tumorali, portando potenzialmente alla loro ferroptosi, mentre le cellule sane saranno poco colpite [8,22]. Nel documento, presentiamo un'analisi quantitativa volta a determinare la dipendenza della concentrazione intracellulare di ascorbato allo stato stazionario dalla sua concentrazione nel siero, nonché il tempo necessario per raggiungere il livello di stato stazionario per le cellule sane e maligne. Il modello, contrariamente agli approcci precedenti, è il primo tentativo di valutare quantitativamente il trattamento di supporto dei pazienti oncologici

utilizzando l'ascorbato [19]. Il modello si basa su due nuove scoperte, ovvero che l'ascorbato diffonde passivamente attraverso il doppio strato lipidico e che la ferroptosi innescata dall'ascorbato è il meccanismo che colpisce le cellule bersaglio. La scoperta principale dell'analisi è che, a causa del trasporto attivo, la concentrazione sierica di ascorbato non è una buona indicazione dell'efficacia del trattamento. Dovrebbe essere invece misurata la concentrazione intracellulare di ascorbato. Ciò rende il modello teorico, dopo la convalida, uno strumento interessante per pianificare la terapia basata sull'ascorbato.

2. Materiali e metodi

Tutti i calcoli sono stati eseguiti utilizzando script Python dedicati (v3.8.10) con libreria numerica NumPy v1.17.4 [20]. Le equazioni del modello sono state implementate come funzioni separate, in cui tutti i parametri sono stati espressi in unità SI. Tutti i calcoli sono stati eseguiti su array NumPy 1D utilizzando un formato numerico float 64. I dati sono stati tracciati in una proiezione 3D e 2D su array da 50 o 200 punti utilizzando la libreria grafica Python Matplotlib v3.3.4. [23].

3. Risultati

L'obiettivo principale dell'analisi presentata è progettare un trattamento efficace del cancro basato sull'ascorbato utilizzando la modellazione matematica. Il trattamento del cancro basato sull'ascorbato si basa sulla differenza tra cellule sane e tumorali rispetto alla loro sensibilità all'ascorbato. Tutte le precedenti terapie basate sull'ascorbato si basavano sul presupposto che l'ascorbato influenzi uno specifico processo molecolare nelle cellule cancerose in un modo dipendente dalla concentrazione extracellulare, in linea con il pensiero farmacologico classico [9,19]. Tuttavia, l'applicazione dell'ascorbato come agente farmacologico è diversa. A seconda della sua concentrazione intracellulare, la sua funzione può variare: dalla funzione di cofattore e antiossidante, al causare la morte cellulare innescando la produzione eccessiva di specie reattive dell'ossigeno (ROS) causando l'aumento del pool di ferro nel citoplasma [19,30,31]. L'innescò della trasformazione avviene a una specifica concentrazione di ascorbato all'interno della cellula [16,37]. Questa dualità funzionale può essere utilizzata nel trattamento del cancro solo se esiste un meccanismo di selettività per l'acquisizione di ascorbato da parte delle cellule. Nel modello, si è ipotizzato che la selettività cellulare nel trattamento del cancro basato sull'ascorbato sia raggiunta grazie alle differenze nell'assorbimento di ascorbato da parte di cellule sane e tumorali. La membrana plasmatica e le sue proprietà elettriche sono stati usati come parametri di selettività. Le concentrazioni intracellulari di ascorbato possono variare da 0,05 a 10 mM [4], anche in condizioni normali. La concentrazione intracellulare temporale di ascorbato è il risultato dell'equilibrio tra trasporto attivo, metabolismo e perdita, quest'ultima facilitata dalla diffusione passiva attraverso il doppio strato lipidico [8]. La concentrazione intracellulare di ascorbato allo stato stazionario dipende quindi da proprietà cellulari, quali pH citoplasmatico, potenziale elettrico della membrana, numero di trasportatori SVCT2 presenti nella membrana plasmatica e attività metabolica. La Tabella 1 presenta le differenze tra cellule sane e cancerose, che possono influenzare la concentrazione intracellulare di ascorbato e possono servire come fonte di selettività terapeutica [8,38].

L'analisi presentata in questo lavoro è stata eseguita per cellule immaginarie sane e cancerose immerse in un fluido extracellulare unificato. Sono stati confrontati i due tipi di cellule immaginarie selezionate, che differiscono per quanto riguarda i potenziali elettrici della loro membrana plasmatica e il pH intracellulare. Le cellule sono state selezionate in modo da poter utilizzare la membrana plasmatica elettrica (le sue proprietà) come parametro di selettività (tabella 1). Il modello può essere facilmente adattato a uno specifico tipo di cellula cancerosa modificando i parametri rilevanti. Sono state fatte diverse ipotesi poste alla base del modello matematico. Queste ipotesi riguardano: attività e numero dei trasportatori attivi, il trasporto passivo dello ione ascorbato

regolato dal potenziale elettrico di membrana, dai gradienti di concentrazione delle sue forme neutre e ionizzate e dal pH locale, l'attività metabolica per il consumo di ascorbato [4,40], la durata del trattamento.

È generalmente accettato che il livello terapeutico efficace possa essere raggiunto solo tramite infusione endovenosa di una grande quantità di ascorbato [9]. Uno degli obiettivi della simulazione è determinare se le concentrazioni terapeutiche possono essere raggiunte tramite integrazione orale prolungata con preparazioni tradizionali ($<0,250$ mM [7]) o liposomiali ($<0,5$ mM [6]). Tutte le misure quantitative derivate durante i calcoli descrivono una situazione semplificata.

Risultati risultati dell'analisi

- 1) In primo luogo, è stato valutato l'effetto della concentrazione di ascorbato extracellulare e del potenziale elettrico di membrana sulla concentrazione di ascorbato intracellulare allo stato stazionario, sia per le cellule sane che per quelle cancerose (Figura 2). La concentrazione di ascorbato intracellulare allo stato stazionario calcolata nell'intera gamma di parametri utilizzati è significativamente più alta nelle cellule cancerose rispetto alle cellule sane, indicando un alto livello di selettività del trattamento. L'effetto del potenziale elettrico di membrana colpisce le cellule cancerose in misura molto maggiore, indipendentemente dal valore della concentrazione di ascorbato extracellulare. Inoltre, sembra che non ci sia alcuna differenza tra le vie di somministrazione orale e endovenosa poiché c'è poca differenza tra le concentrazioni intracellulari di ascorbato allo stato stazionario quando la sua concentrazione nel siero è pari a 0,2, 0,5 e 1 mM (Figura 2).
- 2) La concentrazione intracellulare di ascorbato allo stato stazionario dipende dal pH intracellulare. Ciò è dovuto al livello di protonazione dell'ascorbato all'interno della cellula che influenza drasticamente la sua perdita passiva [25]. (Figura 3). L'analisi numerica mostra che la concentrazione intracellulare di ascorbato allo stato stazionario è molto sensibile alle differenze di pH tra fluidi extracellulari e intracellulari. La dipendenza è ulteriormente rafforzata dalla differenza di potenziale elettrico della membrana plasmatica, confermando la suscettibilità delle cellule cancerose alle elevate concentrazioni di ascorbato (Figura 3). La concentrazione intracellulare di ascorbato allo stato stazionario dipende solo debolmente dalla sua concentrazione extracellulare e che il pH intracellulare e la differenza di potenziale elettrico della membrana possono servire come parametri di selettività nel trattamento basato sull'ascorbato.
- 3) L'altro fattore che influenza la concentrazione intracellulare di ascorbato allo stato stazionario è il numero di trasportatori SVCT. Il numero di trasportatori SVCT è controllato epigeneticamente e può influenzare l'effetto del trattamento, specialmente quando il trattamento è prolungato nel tempo [45]. Inoltre, le varianti genetiche dei trasportatori possono influenzare l'esito del trattamento [46,47].
- 4) La Figura 5 mostra che la risposta epigenetica delle cellule tumorali è molto più forte (aumento maggiore dei trasportatori SVTC) delle cellule sane rispetto alla loro capacità di modulare la loro concentrazione intracellulare di ascorbato.
- 5) Un ulteriore parametro critico è il tempo necessario per raggiungere le concentrazioni intracellulari di ascorbato allo stato stazionario. La figura 6 mostra l'andamento temporale della concentrazione intracellulare di ascorbato per cellule sane e cancerose per tre concentrazioni extracellulari di ascorbato. La concentrazione intracellulare di ascorbato nelle cellule sane non supera il valore soglia presunto del modello di ferroptosi (20 mM). Nelle cellule cancerose dopo 10 ore di esposizione, la concentrazione intracellulare di ascorbato si avvicina al punto di svolta in cui viene innescata la ferroptosi. Sono presentati tre andamenti temporali per 0,2, 0,5 e 1 mM (valori di concentrazioni extracellulari) per mostrare che nel caso del trattamento con ascorbato, la concentrazione sierica non è così importante, ma è invece critico il tempo di esposizione.

6) Il numero di trasportatori SVCT2 influenza la concentrazione intracellulare di ascorbato allo stato stazionario nelle cellule sane e tumorali (Figura 7). Le dipendenze delle concentrazioni intracellulari di ascorbato dal tempo sono state tracciate per due casi in cui il numero di trasportatori SVCT2 differisce di un fattore di quattro. In entrambi i casi, la concentrazione di ascorbato aumenta insieme al numero di trasportatori SVCT2. Tuttavia, per le cellule cancerose, l'aumento è molto più significativo. Di nuovo, l'effetto della concentrazione di ascorbato extracellulare sia sul livello che sull'andamento temporale della concentrazione intracellulare è insignificante, dimostrando che la sua persistenza nel tempo è un fattore critico, non la concentrazione di ascorbato nel siero. I risultati ottenuti mostrano che l'effetto terapeutico può essere ottenuto quando la concentrazione sierica di ascorbato è facilitata dall'integrazione utilizzando tutte le vie di somministrazione disponibili, purché il tempo di esposizione sia sufficientemente lungo (giorni).

4. Discussione

Nella farmacologia classica, il composto attivo è di origine esogena ed è progettato per raggiungere e influenzare specifici bersagli molecolari [8]. In genere, l'internalizzazione di tale composto da parte di una cellula non è facilitata dalle proteine di membrana, ma piuttosto si diffonde attraverso il doppio strato lipidico [14]. L'efficacia della diffusione passiva dipende principalmente dalla concentrazione del composto attivo nel siero. Questo perché la diffusione passiva necessita di un gradiente di concentrazione attraverso la membrana plasmatica cellulare. Questo processo molto aspecifico è una fonte di tossicità sistemica e la selettività verso le cellule bersaglio si basa sull'affinità preferenziale verso un'entità molecolare attentamente selezionata. Tuttavia, la concentrazione sierica del farmaco può essere elevata solo al livello in cui diventa tossica [8]. Pertanto, la tossicità aspecifica è una proprietà intrinseca di tutti i composti esogeni a basso peso molecolare destinati all'uso come sostanze farmacologicamente attive. C'è un altro problema con l'approccio farmacologico classico, la diffusione passiva della sostanza può essere contrastata dalle cellule con trasporto di deflusso attivo (trasportatori ABC [48,49]) che porta allo sviluppo della resistenza al farmaco utilizzato nel trattamento.

L'ascorbato è un composto coinvolto in numerosi processi metabolici, quindi può essere considerato un elemento necessario dell'omeostasi intracellulare fungendo da donatore o accettore di elettroni in vari compartimenti cellulari [4,40]. La funzione critica dell'ascorbato nell'omeostasi cellulare richiede il suo controllo stretto e guidato dalla funzione, sia a livello cellulare che fisiologico. La variazione spaziale dell'ascorbato all'interno del corpo è assicurata dalla differenza nell'espressione di trasportatori di ascorbato dedicati e dal trasporto passivo recentemente scoperto [8,25]. La capacità di regolare la concentrazione locale di ascorbato all'interno del corpo, combinata con efficaci meccanismi di eliminazione, predispongono l'ascorbato all'uso come agente terapeutico. Numerosi esperimenti che utilizzano colture cellulari mostrano che l'ascorbato a concentrazioni superiori a pochi mM provoca la morte delle cellule cancerose ([9] e citazioni ivi contenute). Questa osservazione fornisce un'indicazione per il trattamento del cancro basato sull'infusione endovenosa prolungata di grandi quantità di ascorbato [50,51]. L'esposizione prolungata è giustificata dal fatto che qualsiasi eccesso sistemico di ascorbato viene effettivamente eliminato dalla circolazione entro un'ora [7]. Il trattamento a base di ascorbato si basa sull'attività dell'ascorbato dipendente dalla concentrazione; a basse concentrazioni, è un antiossidante efficace e un cofattore enzimatico necessario, mentre a concentrazioni più elevate provoca un drammatico aumento dei radicali liberi dovuto alla riduzione dello ione ferrico a uno ione ferroso altamente attivo [17]. Le funzioni metaboliche dell'ascorbato come donatore o accettore di elettroni rendono l'ascorbato un buon candidato per applicazioni farmacologiche, dove la sua concentrazione intracellulare può essere utilizzata come bersaglio terapeutico. Nonostante la limitata comprensione del ruolo dell'ascorbato come agente omeostatico, sono stati fatti tentativi per progettare una procedura terapeutica. Sono state provate infusioni endovenose ampiamente utilizzate, anche se in modo molto poco affidabile

[8,52].

Poiché il meccanismo molecolare che porta all'uccisione selettiva delle cellule tumorali da parte dell'ascorbato non è stato determinato in modo univoco, i parametri critici dell'infusione endovenosa non possono essere stabiliti con esattezza [19]. Questo è forse il motivo per cui i risultati di vari studi sono stati inconcludenti [10,19,36,51].

Il modello presentato nel documento mostra che la concentrazione di ascorbato nel siero non è un buon parametro per progettare una terapia efficace. Questo perché la diffusione passiva non è un meccanismo responsabile dell'ingresso dell'ascorbato nel citoplasma cellulare, come nel caso di tutti i farmaci esogeni [14]. Invece, il monoanione dell'ascorbato viene attivamente accumulato all'interno della cellula da trasportatori dedicati della membrana plasmatica. Quando i trasportatori sono saturi, a circa 0,1 mM di concentrazione sierica di ascorbato [38], un ulteriore aumento della sua concentrazione non è produttivo, al contrario, quando viene raggiunto il livello tossico, può verificarsi la tossicità sistemica. Considerando la recente scoperta della diffusione passiva dell'ascorbato attraverso i doppi strati lipidici e supponendo che la ferroptosi sia il meccanismo principale dell'attività terapeutica dell'ascorbato, è stato proposto un nuovo modello. Il modello mostra che la concentrazione sierica dell'ascorbato non è di importanza critica, ma piuttosto la durata del trattamento. È stato determinato che la durata del trattamento dovrebbe essere nell'intervallo di giorni piuttosto che di ore. Il modello prevede che la somministrazione di ascorbato per via orale per un tempo sufficientemente lungo dovrebbe dare risultati terapeutici migliori rispetto a un'infusione endovenosa relativamente breve (poche ore) delle sue grandi quantità. La convalida sperimentale della previsione del modello offrirà un trattamento di supporto molto conveniente e potenzialmente efficace per una varietà di tumori.

È stato dimostrato che la concentrazione farmacologica di ascorbato in vivo non può essere raggiunta tramite somministrazione orale della sua forma classica e che tale somministrazione non produce un livello sufficiente di perossido di idrogeno nel fluido extracellulare in vivo [53]. Tuttavia, né la somministrazione settimanale EV per due ore di una dose farmacologica di ascorbato a pazienti con cancro alla prostata ha indotto la regressione del tumore [54]. Il modello proposto mostra la rilevanza dell'ascorbato come agente terapeutico, la cui efficacia dipenderà dalla sua concentrazione plasmatica, dalla capacità di assorbimento da parte delle cellule tumorali e dalla modulazione dell'attività antitumorale, ovvero dallo stress ossidativo indotto e dalla capacità di modulare lo stato epigenetico del DNA. La somministrazione EV è invasiva, estenuante per il paziente ed è stata somministrata, quasi esclusivamente, a pazienti oncologici con tumori avanzati. Tuttavia, è possibile che i limiti della somministrazione EV (tempo di trattamento insufficiente) e somministrazione orale della sua forma classica possano essere, almeno parzialmente, superati dalla somministrazione orale della sua forma liposomiale [6]. L'effetto dell'ascorbato sulle cellule cancerose in un tumore solido non è così semplice come nel caso della malignità isolata (modello presentato). L'ambiente tumorale sarà sicuramente diverso dal fluido extracellulare rispetto all'importanza per la concentrazione di sodio del trasportatore SVCT, il pH locale ridotto e l'ipossia. Cambieranno la dipendenza della concentrazione intracellulare di ascorbato dalla sua disponibilità locale. L'effetto non cambierà solo le condizioni di stato stazionario, ma anche la dinamica del raggiungimento di livelli terapeutici da parte della concentrazione intracellulare di ascorbato nelle cellule cancerose.

5. Conclusioni

La concentrazione di ascorbato all'interno di una cellula è il risultato di tre processi, degradazione metabolica, trasporto attivo facilitato da trasportatori dedicati (SVCT1 e SVCT2) e diffusione passiva attraverso il doppio strato lipidico della membrana plasmatica. La dipendenza del trasporto passivo dalla protonazione dell'ascorbato e dalla differenza di potenziale della membrana plasmatica può essere utilizzata per il targeting selettivo dell'ascorbato sulle cellule cancerose. In

particolare, la maggior parte delle cellule che costituiscono il corpo umano sono altamente differenziate. Tali cellule sono caratterizzate, tra le altre cose, da un'elevata negatività all'interno del potenziale elettrico della membrana plasmatica (che raggiunge -100 mV). Le cellule tumorali sono diverse, poiché il loro potenziale elettrico della membrana plasmatica è solitamente basso e non supera -10 mV. Questa differenza può essere utilizzata per aumentare la concentrazione di ascorbato nel citoplasma delle cellule tumorali senza influenzare le cellule sane. Questo effetto può giustificare l'applicazione dell'ascorbato come trattamento di supporto nella terapia del cancro caratterizzata da tossicità sistemica nulla o bassa. Le simulazioni presentate nel documento mostrano che tale trattamento per essere efficace richiede il mantenimento di una concentrazione di ascorbato sufficiente, anche se non necessariamente eccessivamente elevata, nel plasma e nei fluidi interstiziali. Tuttavia, a causa della capacità limitata del trasporto attivo, l'esposizione all'ascorbato dovrebbe essere estesa nel tempo per giorni piuttosto che per ore.