



Fondata nel 1562

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMOLECOLARI E BIOTECNOLOGICHE

Curriculum : Biotecnologie molecolari e cellulari

Coordinatore: Prof. Bruno Masala

XXIII° CICLO

**Utilizzo delle Biotecnologie Spaziali per lo studio di alcuni
meccanismi cellulari e molecolari dell'immunosenescenza
mediante esperimenti *in vivo* e *in vitro* in condizioni
di microgravità simulata**

TUTOR

Prof. Proto Pippia

TESI DI DOTTORATO DI

Dott.ssa Angela Saba

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
1.1 Effetti della microgravità sull'organismo umano	10
1.2 Effetti della microgravità sul sistema immunitario	13
1.3 Effetti della microgravità sul sistema scheletrico	16
Generalità sul sistema scheletrico e la deposizione della matrice ossea ...	16
1.3.1 Il sistema scheletrico in condizioni di microgravità	28
1.3.2 Studi in microgravità reale	29
1.3.3 Studi in condizioni di microgravità simulata.....	31
1.4 L'immunosenescenza	33
1.4.1 Principali caratteristiche dell' immunosenescenza	35
1.5 L' Apoptosi	39
1.6 Fagocitosi.....	42
2. SCOPO DELLA TESI.....	44
3. MATERIALI E METODI.....	48
3.1. Random Positioning Machine (RPM)	48
1° PARTE	50
ESPERIMENTI <i>IN VIVO</i> ED <i>IN VITRO</i> IN CONDIZIONI DI MICROGRAVITÀ SIMULATA SUL DIFFERENZIAMENTO DI OSTEOLASTI DI RATTO	50
3.2. Esperimento in vivo	50
3.4 Tecniche di indagine.....	54
3.4.4 Analisi dei campioni	59
2° PARTE	60

STUDIO IN VIVO E IN VITRO DELLA FAGOCITOSI IN CONDIZIONI DI MICROGRAVITÀ SIMULATA E NELL'ANZIANO.....	60
3.5 Reclutamento dei soggetti.....	60
3.6 Separazione dei PBMCs da sangue periferico.....	61
3.7 Isolamento di monociti da PBMCs e valutazione del differenziamento in macrofagi.....	63
3.8 Isolamento di linfociti T da PBMCs e induzione di apoptosi per senescenza cellulare.....	64
3.9 Determinazione della traslocazione della fosfatidilserina mediante marcatura con Annessina V / MitoTracker Red.....	65
3.10 TUNEL assay.....	68
3.11 Valutazione della capacità di interazione e fagocitosi di linfociti apoptotici in presenza o assenza di Trombospondina.....	71
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	73
4.1 Esperimenti in vivo ed in vitro in condizioni di microgravità simulata sul differenziamento di osteoblasti di ratto.	73
4.2. Studio <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> della fagocitosi in condizioni di microgravità simulata e nell'anziano	86
5.BIBLIOGRAFIA	104

PREFAZIONE

L'ambito in cui si inserisce la presente ricerca nasce dell'osservazione che le più comuni alterazioni della microgravità sul sistema immune mostrano forti analogie con analoghi processi cellulari e molecolari osservati durante l'immunosenescenza.

Poichè l'immunosenescenza è un continuum di cambiamenti inevitabilmente correlati alle patologie associate all'età, è difficile discriminare i contributi apportati all'immunosenescenza dalle varie patologie di cui possono esser reduci gli anziani. A tale scopo studiare le stesse variazioni osservate durante l'immunosenescenza in cellule del sistema immune di soggetti giovani (o di animali da laboratorio) sani o sull'animale in toto (ratto o topo) sottoposti a microgravità, potrebbe essere un'ottimo strumento sperimentale per una migliore comprensione di alcuni processi molecolari e cellulari osservati negli anziani.

Nella prima parte del mio dottorato, come preliminare allo studio dell'immunosenescenza, abbiamo voluto testare il clinostato o RPM (Random Positioning Machine), tradizionalmente usato per esperimenti in vitro in condizioni di microgravità simulata, per lo studio sull'animale in toto, sottoponendo ratti a 72h di microgravità simulata per lo studio del riassorbimento osseo

Nella seconda parte del mio dottorato abbiamo rivolto l'attenzione su un analogia particolarmente interessante riscontrata sia tra gli effetti della microgravità sul sistema immune sia tra i parametri ematici negli anziani, e cioè la maggiore suscettibilità all'apoptosi e l'aumento dei livelli sierici delle citochine infiammatorie. Ciò costituisce un paradosso ancora inspiegato in quanto una delle finalità dell'apoptosi è proprio quella di evitare l'istaurarsi di fenomeni infiammatori e produzione di auto-anticorpi, impedendo il rilascio di materiale intracellulare. Un efficiente sistema di fagocitosi inoltre è necessario per evitare che cellule apoptotiche non prontamente eliminate vadano incontro a processi di necrosi secondaria con le stesse conseguenze infiammatorie e autoimmuni. A tale scopo, nella seconda parte del mio dottorato, abbiamo effettuato saggi di fagocitosi su macrofagi derivati da monociti isolati da sangue periferico di donatori sani giovani e anziani e confronti con colture di macrofagi, derivati da soggetti giovani, in condizioni di microgravità simulata.

Parallelamente si è valutata la capacità di interazione e fagocitosi in linfomonociti di ratti sottoposti a microgravità simulata per 5 giorni.

1. INTRODUZIONE

La vita si è svolta sulla terra in un ambiente che è profondamente mutato periodicamente. Ere climatiche, cataclismi naturali, radiazioni cosmiche e attività vulcaniche hanno enormemente influenzato lo sviluppo e l'adattamento degli esseri viventi. Tuttavia un fattore ambientale è rimasto costante attraverso le ere geologiche: la forza gravitazionale.

Se consideriamo che l'evoluzione della vita sulla terra si è sviluppata per milioni di anni alla gravità costante di 1g, è logico aspettarsi che un cambiamento dell'ambiente gravitazionale, con transizioni della gravità da 1g normale fino a quasi 0g, possano provocare effetti importanti sulle cellule sia *in vivo* che *in vitro*, e quindi alterazioni nel comportamento biologico degli organismi viventi.

La microgravità come tale è quindi una nuova frontiera che stimola la curiosità scientifica dei ricercatori e non meraviglia se subito dopo aver messo piede nello spazio l'uomo ha cominciato a costruire laboratori spaziali (Skylab, Spacelab etc.), dapprima sui vettori orbitanti (Biosatelliti automatizzati, Shuttle) e dopo sulle stazioni spaziali orbitanti (MIR, ISS).

Erroneamente molti pensano che gli astronauti “galleggiano” perché sono al di fuori dal campo gravitazionale terrestre. Non è assolutamente così. I voli spaziali avvengono a distanze dalla superficie terrestre dell'ordine di 300-400 km in cui il campo gravitazionale è ancora presente e forte. Il termine “assenza di gravità” o “assenza di peso” è sostituito oggi da quello più corretto di “microgravità” (μg), comunemente applicato ad una condizione di caduta libera entro un campo gravitazionale in cui il peso di un oggetto è significativamente ridotto rispetto al suo peso a riposo sulla terra.

Microgravità “reale” è quella effettivamente presente nello spazio per distinguerla da quella “simulata” ottenibile a terra con diverse, sofisticate

apparecchiature, tra le quali i clinostati, in grado di ricreare quasi perfettamente la mancanza di gravità. I livelli di gravità ottenuti in esperimenti nello spazio vanno da ordini di gravità di 10^{-6} a 10^{-2} g, quelli ottenibili in simulazioni a terra sono dell'ordine di 10^{-2} g a 10^{-4} g.

Durante gli ultimi 30 anni un'enorme varietà di *facilities* è stata messa a punto per la ricerca nello spazio e numerose opportunità di volo sono state offerte alla comunità scientifica.

Gli esperimenti spaziali possono essere realizzati mediante diversi vettori e per tempi variabili: brevissimi nei voli parabolici su particolari aerei che effettuano circa 30 parabole di 20 sec. ciascuna, brevi, dell'ordine di 5-15 min., nei razzi sonda (Texus, Maser e Maxus), più lunghi, fino a 16 giorni, nei laboratori orbitanti degli Shuttle (Skylab, Spacelab) o di più lunga durata come quelli effettuati nei laboratori delle stazioni spaziali orbitanti MIR o la Stazione Spaziale Internazionale o ISS. L'utilizzo dell'uno o dell'altro vettore è legato alla durata dell'esperimento e al tipo di informazioni che si vogliono ottenere.

La scelta dei **Razzi Sonda**, che assicurano solo pochi minuti di microgravità, è appropriata quando ad esempio si vuole studiare l'espressione precoce, che avviene entro pochi minuti dall'attivazione, di quei geni che promuovono la proliferazione cellulare nei linfociti.

Gli esperimenti a bordo degli **Shuttle** e quelli sulla **Stazione Spaziale Internazionale** ci permettono invece di studiare gli effetti della microgravità per tempi più lunghi e su meccanismi biochimici e fisiologici più complessi.

Gli esperimenti a bordo dei **Pallon** **Stratosferici**, che volano all'interno dell'orbita terrestre, a circa 40 Km di altezza, sono volti allo studio degli effetti delle radiazioni cosmiche sul materiale biologico indipendentemente dallo stress gravitazionale, rendendo possibile discriminare in tal modo tra gli effetti provocati dalle due componenti, microgravità e radiazioni, presenti invece contemporaneamente nello spazio .

Condurre esperimenti in condizioni di microgravità permette agli scienziati ed ai ricercatori di eliminare gli effetti della gravità e di studiare dei fenomeni che giocano dei ruoli chiave nella biologia, nella fisica e nella chimica e di sperimentare su prodotti difficili o impossibili da ottenere sulla terra. L'accesso allo spazio permette inoltre di scoprire quali meccanismi cellulari e quali funzioni biologiche siano sensibili all'assenza della forza gravitazionale terrestre. Gli studi e le ricerche effettuate sulla stazione orbitante permetteranno, per esempio, di mettere a punto nuovi trattamenti farmacologici contro i tumori, nuovi vaccini, ma anche nuovi materiali e leghe metalliche dalle caratteristiche innovative e nuovi processi produttivi e tecnologici con potenzialità commerciali .

La storia della Biologia Spaziale ha fatto passi da gigante da quando il 4 Ottobre 1957 dal Cosmodromo di Baikonur, in Kazakistan, partì lo Sputnik I, il primo lancio di un satellite artificiale della storia, il 1° oggetto costruito dall'uomo ad uscire dall'atmosfera terrestre che diede inizio all'epoca dell'esplorazione spaziale. Sempre da Baikonur, il 3 novembre 1957 partì con lo Sputnik 2, la cagnetta Laika, il primo essere vivente terrestre ad entrare in orbita, e sempre da qui, il 12 aprile 1961 Yuri Gagarin, colonnello e astronauta sovietico, decollò, con la navicella Vostok, per il primo volo umano nello spazio, portando a termine la sua missione dopo 108 min. di volo a 27.400 Km/h, dimostrando che l'uomo era in grado di volare nello spazio, diventando a soli 27 anni il primo uomo della storia a compiere l'intero periplo del globo e ad orbitare intorno alla terra. E sempre da Baikonur fu lanciata, due anni dopo, l'ex operaia Valentina Tereskova, che si aggiudicò il titolo di "prima donna nello spazio".

L'alto costo degli esperimenti a bordo di queste facilities spaziali ed il limitato numero di esperimenti realizzabili non consentono ai ricercatori che operano in tale campo di dare continuità nel tempo a questo tipo di studi. Si è

reso necessario, pertanto, individuare sulla terra dei sistemi di simulazione che consentano sia di preparare meglio gli esperimenti da effettuare nello spazio, sia di individuare nuovi meccanismi cellulari o molecolari sensibili alle alterate condizioni gravitazionali.

Sono nati così negli anni i vari sistemi di simulazione come i clinostati, la torre a caduta libera, la free fall machine (FFM), il bed rest (permanenza dell'uomo a letto in posizione orizzontale inclinata verso la testa di 6°), l'immersione in acqua, "hindlimb unloaded (HU)" (ratto o topo sostenuto per la coda in posizione inclinata a testa in giù) e sorgenti varie di radiazioni (di qualità e d'intensità vicine alle radiazioni cosmiche percepite sulla ISS).

I clinostati hanno una storia antichissima: già due secoli fa (1806) sir Thomas Andrew Knight utilizzò uno strumento rotante per provare gli effetti della gravità sulle piante. Si tratta probabilmente della prima iperfuga descritta in letteratura. Seguirono agli inizi del novecento tutta una serie di apparecchiature (definite clinostati), a rotazione orizzontale, utilizzate soprattutto in studi di fisiologia vegetale (1).

Nel 1965 Wolfgang Briegleb (2) inventò il "fast rotating clinostat" (FRC), costituito da piccoli cilindri contenenti il campione biologico (cellule) e rotanti ad una velocità compresa tra 60 e 90 rpm. La rotazione bidimensionale 2D del FRC venne successivamente superata dalla rotazione tridimensionale 3D.

L'ideatore del clinostato tridimensionale fu il Prof. Aristide Scano, scienziato italiano di origine sarda, più noto per i suoi studi di fisiologia umana in campo aeronautico e spaziale (3).

Alcuni decenni dopo, ricercatori giapponesi svilupparono la versione moderna del clinostato 3D originale che consentì a Mesland, nel 1996, di sviluppare in Olanda, presso la FOKKER SPACE, la Random Positioning Machine o RPM (4), presente nei laboratori del Dipartimento di Scienze Fisiologiche, Biochimiche e Cellulari dell'Università di Sassari sin dal 1999.

Una prima validazione della RPM per studi “in vitro” fu ottenuta negli stessi laboratori, utilizzando T linfociti umani attivati con concanavalina A come modello sperimentale (Fig.3) (5).

Nel 2002 vennero eseguiti, sempre nel Dipartimento di Scienze Fisiologiche, Biochimiche e Cellulari, i primi studi “in vivo” sottoponendo a microgravità simulata in RPM per 48-72 ore ratti per studi di fisiofarmacologia (6) (7).

Attualmente è in fase di collaudo un’apparecchiatura supplementare al RPM, il MHOR (o Mouse Habitat On RPM), che consentirà tra breve di sottoporre a microgravità simulata ratti o topi per 15-20 giorni senza dover fermare ogni 6-8 ore la RPM per l’alimentazione e la toilette degli animali stessi, come avviene tuttora.

La microgravità può essere anche un utile strumento nella ricerca applicata in Biologia, Medicina e Biotecnologia per lo sviluppo di nuove tecniche, come ad esempio l’incapsulamento di farmaci anti-tumorali in sfere microscopiche di lattice che permettono di migliorarne la loro efficacia senza dannosi effetti collaterali (perché arrivano in dosi più concentrate direttamente nei tessuti maligni) e per la fabbricazione più economica a 0g di sostanze medicinali attualmente molto costose.

Inoltre per la mancanza di sedimentazione e di convezione termica, nello spazio materiali di diversa densità possono essere fusi, mescolati e risolidificati senza dare striature o impurità. Infatti, la microgravità potrebbe essere un validissimo mezzo col quale, modificando l’ambiente naturale nel quale le cellule si sono finora evolute, gettare nuovi ponti per risolvere gli enigmi ancora insiti nella materia vivente. Ad esempio due importanti sistemi dell’organismo animale come quello nervoso e quello immunitario, la cui complessità è direttamente proporzionale alla loro fondamentale importanza per la nostra

sopravvivenza, sono tuttora oggetto di intensi studi da parte dei biologi spaziali e per i quali la microgravità potrebbe apportare importanti contributi.

Effettivamente l'assenza di gravità potrebbe favorire nuove tappe non conosciute alla gravità terrestre e lo studio di tali tappe potrebbe contribuire a chiarire processi biologici non ancora del tutto compresi.

Per comprendere meglio la sempre maggior rilevanza che sta acquistando la ricerca spaziale e con essa la bio-medicina spaziale basti pensare che è recente la realizzazione del più ambizioso progetto di laboratorio scientifico spaziale, la ISS (International Space Station). E' un gioiello della tecnologia mondiale, frutto degli sforzi congiunti di ben 16 nazioni fra cui Stati Uniti, Canada, Europa, Russia e Giappone. Grande più o meno come un campo di calcio (quattro volte più ampia della stazione orbitante russa MIR), la ISS è costituita da sei laboratori, due moduli abitativi pressurizzati e da nove piattaforme esterne per l'alloggiamento di strumentazione scientifica. Può ospitare fino a 6 astronauti e mantenere sotto osservazione, grazie alle caratteristiche orbitali, l'85% della superficie terrestre, dove vive il 95% della popolazione; viene visitata ogni tre mesi dallo Shuttle o dai vettori russi, che provvedono al trasporto di materiale scientifico e di sussistenza e al ricambio dell'equipaggio.

1.1 Effetti della microgravità sull'organismo umano

Come agli inizi dell'era spaziale, anche oggi l'attenzione dei ricercatori è volta soprattutto a garantire la salute, il benessere e la performance degli astronauti/cosmonauti, in quanto è stato largamente dimostrato che la microgravità produce profondi cambiamenti in un elevato numero di funzioni fisiologiche.

In un ambiente estremo come quello spaziale tutto diventa più complicato. La macchina-uomo non è stata "progettata" per viverci ed operarvi. Numerosi sono stati gli esperimenti di medicina ospitati a bordo degli Shuttle (es. Columbia), effettuati mediante monitoraggio respiratorio e cardiovascolare su membri dell'equipaggio, sottoposti a diversi esercizi fisici di routine, per una serie di ricerche sul cuore umano, polmoni, metabolismo, organi di senso impegnati nel rispondere alla microgravità e per studi sulla formazione e conservazione dell'osso, sulla crescita e riparazione del tessuto connettivo, sulla funzione del sistema immunitario.

Le principali modificazioni adattative a tale condizione riguardano soprattutto:

Il sistema cardiovascolare e respiratorio

In microgravità viene a mancare la pressione idrostatica poiché i fluidi perdono il loro peso. Di conseguenza il sangue non essendo più "risucchiato" verso il basso dalla gravità, si accumula nel torace e nella testa. Questa ridistribuzione dei liquidi dà inizio a una cascata di processi a livello ormonale, renale e meccanico che regolano i livelli di fluidi e di elettroliti. Questo spostamento dei fluidi (fluid shift) verso la parte superiore del corpo, in particolare a carico della testa, ne aumenta la pressione. Ciò spiega il motivo di alcuni sintomi del cosiddetto "mal di spazio" (space motion sickness) come mal di testa e la cosiddetta *facies lunare* o viso gonfio. L'organismo umano registra erroneamente questo shift come un aumento della volemia generale e cerca di compensare allo squilibrio creatosi aumentando il volume di urina prodotta. La velocità di filtrazione renale aumenta del 20%. Le conseguenze più evidenti sono un innalzamento della concentrazione del sangue che induce il midollo osseo a produrre meno globuli rossi, ovvero alla comparsa di una leggera forma di anemia.

Il sistema muscolo scheletrico

Secondo una regola della biologia, tutto ciò che non serve va eliminato. Ed è proprio ciò che fa il corpo umano in orbita, dove non servono muscoli forti: non c'è la gravità da vincere, dunque il tessuto muscolare deve essere di minore entità (atrofia muscolare).

Lo stesso vale per lo scheletro, che non deve sopportare il peso del corpo. Il metabolismo osseo nello spazio cambia sostanzialmente e la perdita di tessuto osseo (osteoporosi) è alquanto sensibile a livello delle vertebre inferiori, del bacino e della parte alta del femore con una percentuale che, secondo studi congiunti russo-americani, arriva all'1% al mese per tutta la durata della missione, con conseguente rischio di fratture. Ne deriva un incremento dei livelli di calcio nell'organismo che favorisce la formazione di calcoli renali e la calcificazione dei tessuti molli.

Il sistema immunitario

Il sistema immunitario, estesamente studiato dal nostro team, subisce notevoli cambiamenti risultando influenzato negativamente dalla microgravità, con conseguente riduzione delle difese immunitarie degli astronauti/cosmonauti soggetti ad una forte depressione della loro risposta immune.

Comunque un dato importante è la notevole tolleranza degli organismi superiori alla microgravità (ad eccezione del tessuto osseo), anche per periodi di tempo prolungati. Le ragioni di questa tolleranza sono probabilmente da ricercarsi nei meccanismi omeostatici di compensazione e di adattamento. Questi sono in grado di stabilire un nuovo equilibrio in risposta alle mutate condizioni ambientali e fanno della microgravità un valido mezzo per la ricerca di base.

1.2 Effetti della microgravità sul sistema immunitario

Il volo spaziale costituisce senza dubbio un evento stressante sia sul piano fisico che sul piano psichico e può incidere fortemente sul sistema immunitario, la risposta neuroendocrina e i livelli ormonali di ACTH, cortisolo, catecolamine ed endorfine con esso strettamente correlati

I diversi esperimenti condotti nello spazio nel corso degli ultimi 20 anni su T linfociti umani coltivati *in vitro* hanno chiaramente dimostrato che le cellule del sistema immunitario sono severamente influenzate dall'ambiente spaziale con alterazioni nella proliferazione, produzione di citochine, movimento, espressione genica, etc. La modificazione principale che si riscontra a 0g è l'effetto inibitorio sulla risposta proliferativa.

T linfociti prelevati a terra da donatore sano, quando sottoposti, durante il volo, ad attivazione mitogenica mediante Concanavalina A, mostrano una reattività molto scarsa ed una drastica riduzione (di oltre 90%) dell'attivazione e della capacità proliferativa, se confrontate con quelle di identici controlli a terra. L'incapacità di una idonea moltiplicazione clonale dei linfociti in seguito ad attivazione con mitogeno si è osservata anche in esperimenti con linfociti di astronauti prima, durante e dopo il volo, come dimostrano i risultati provenienti da laboratori NASA, laboratori russi e dai primi esperimenti di A. Cogoli, confermati in seguito anche dal nostro gruppo (7, 8, 9).

La significativa depressione delle risposte immunitarie durante e dopo il volo non pone l'astronauta di fronte ad un vero e proprio stato patologico e questo fenomeno non ha mai messo in pericolo la salute degli equipaggi nello spazio ma è senz'altro un segnale di allarme e costituisce un problema biomedico di importanza vitale per il proseguo dell'attività umana nello spazio,

soprattutto in vista delle lunghe missioni sulla Stazione Spaziale Internazionale ed, eventualmente, dei futuri viaggi interplanetari.

In esperimenti condotti nello spazio a partire dal 1983 in diverse missioni Shuttle ma soprattutto in diverse missioni razzi sonda è stato dimostrato da Cogoli e dal nostro gruppo che:

- il *binding* della Con A alle glicoproteine di membrana avviene normalmente in microgravità reale;
- i fenomeni successivi del *patching* e del *capping* sono leggermente ritardati;
- le interazioni cellula-cellula e la formazione di aggregati a 0g avvengono ma in misura minore rispetto a 1g (più piccoli e meno frequenti);
- la struttura del citoscheletro è sensibile alle alterazioni gravitazionali e alterazioni del citoscheletro influenzano l'aggregazione dei ligandi della Con A e compromettono la trasduzione del segnale, giocando un ruolo fondamentale nella regolazione di certe funzioni cellulari. La struttura dei filamenti di tubulina e vimentina subisce importanti modificazioni appena dopo 30 sec a 0g con la formazione di clusters di filamenti intermedi.

Ancora i risultati da noi ottenuti con la missione spaziale Shuttle IML-2 (1994) sulla secrezione delle interleuchine nel soprannatante delle colture, dimostrano:

- un aumento della produzione endogena di IL-1 come proteina secreta nel soprannatante,
- una drastica riduzione di IL-2,
- una notevole diminuzione di IL-1R e di IL-2R.

In particolare questi risultati, confermati poi in microgravità simulata (10), supportano l'ipotesi che la microgravità altererebbe la funzione del sistema IL-2/IL-2R e ciò potrebbe essere la causa principale dell'inibizione dell'attività dei linfociti T .

Agli studi sulla secrezione delle interleuchine hanno fatto seguito quelli sull'espressione genica, con l'uso del clinostato tridimensionale, per chiarire meglio a quale livello bio-molecolare avvenga la considerevole perdita di attivazione, dimostrando che (11):

- l'espressione genica dell'IL-1 aumenta a partire dalla 2^a h di attivazione e si mantiene fino alla 12^a h, con un picco di espressione a 4h,
- l'espressione genica dell'IL-2 inizia intorno a 1^ah dall'esposizione al mitogeno, si mantiene fino alla 12^ah e oltre, ma appare inibita in microgravità,
- la subunità β dell'IL-2R non è influenzata dalla microgravità simulata, mentre la subunità α dell'IL-2R appare significativamente inibita a partire dalla 2^ah di attivazione e soprattutto da 6h a 10h.

Quindi la mancanza del segnale intracellulare mediato dalla subunità α potrebbe essere uno dei fattori che influenza la diminuzione dell'attività proliferativa del linfocita. Queste differenze depongono inoltre per un'azione diretta della microgravità sull'espressione genica.

Recentemente, esperimenti condotti, in collaborazione col nostro gruppo, hanno messo in evidenza un' aumentata incidenza di morte cellulare programmata in Linfociti T di donatore sottoposti a microgravità simulata.

In particolare si è osservata (12):

- una presenza di corpi apoptotici 3 volte superiore rispetto al controllo a 1g a partire da 24h e fino a 6 volte dopo 72h di microgravità
- una frammentazione del DNA aumentata di circa 4 volte dopo 24h e fino a 7 volte dopo 72h di microgravità
- un ridotto potenziale di membrana mitocondriale già dopo 4 h di microgravità
- un altamente significativo rilascio del Citocromo C dai mitocondri a partire da 8 h di microgravità

Finora le alterazioni riscontrate a carico del Sistema Immunitario non hanno mai messo in pericolo la salute degli equipaggi nello spazio. Nonostante ciò, il problema dell'efficienza del sistema immunitario si pone e sarà sempre più evidente in vista delle lunghe missioni in laboratori orbitanti, delle lunghe permanenze dei viaggi interplanetari di lunga durata e la sempre meno fantascientifica colonizzazione di Marte.

1.3 Effetti della microgravità sul sistema scheletrico

Generalità sul sistema scheletrico e la deposizione della matrice ossea

Il tessuto osseo è una forma densa e specializzata di tessuto connettivo caratterizzato da una complessa matrice mineralizzata. La matrice, che rappresenta il 90% in peso dell'osso, è costituita per il 70% minerale inorganico. La componente minerale è rappresentata da cristalli di sali di calcio, prevalentemente fosfato di calcio, a cui si aggiungono quantità minori di carbonato di calcio e tracce di altri sali (tra cui fluoruro di calcio e fosfato di magnesio). Il fosfato di calcio è presente sotto forma di cristalli di apatite, la cui cella elementare ha la forma di un prisma esagonale appiattito e formula chimica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6^{2+}$. Le due cariche positive sono di norma neutralizzate dal legame con due ioni ossidrile (OH^-), formando così la idrossiapatite. Si possono ritrovare anche altri anioni, come lo ione carbonato nella carbonatoapatite e lo ione fluoruro nella fluoroapatite). Il cristallo si origina dall'impilamento delle singole celle elementari ed ha la forma di un ago lungo e sottile, spesso circa 2 nm e lungo 20-40 nm.

La matrice organica è costituita principalmente da collagene di tipo I (90%) e altre proteine non-collagene che comprendono proteoglicani, glicoproteine, sialoproteine e proteine contenenti GLA. I proteoglicani sono composti da glicosaminoglicani acidi, solitamente solforati, uniti assieme da brevi catene proteiche. Quelli meglio conosciuti sono il Proteoglicano di tipo I (PG-I), che si ritrova sia nella sostanza intercellulare mineralizzata che in quella non mineralizzata, il cosiddetto tessuto osteoide ed il Proteoglicano di tipo II (PG-II), detto anche decorina, che si ritrova solo nella sostanza intercellulare mineralizzata e si ipotizza che abbia un ruolo nell'orientare la deposizione dei cristalli minerali lungo le microfibrille collagene.

Le Glicoproteine, di solito fosforilate o solfatate, includono molecole diverse, alcune delle quali giocano un ruolo fondamentale nel controllo dei processi di mineralizzazione. Tra queste si annoverano: 1) l'Osteonectina, la glicoproteina più abbondante, dotata di alta affinità per il calcio, sia come ione libero che associato in complessi di tipo cristallino, 2) la Fosfatasi alcalina, un enzima capace di idrolizzare gruppi fosfato legati a substrati organici (quali ad es. il piridossal-5-fosfato) in ambiente alcalino (pH 8-10) e 3) la Fibronectina, una molecola di adesione localizzata prevalentemente nella matrice pericellulare e caratterizzata da una porzione capace di legarsi al collagene. Si ritiene che sia coinvolta nei processi di migrazione, adesione alla matrice e organizzazione delle cellule dell'osso.

Le sialoproteine, o BSP (dall'acronimo inglese bone sialo-proteins, sialoproteine dell'osso), sono glicoproteine peculiari contenenti residui glicidici di acido sialico. Si ritiene pertanto che le sialoproteine ossee abbiano la funzione fisiologica di consentire l'adesione delle cellule alla matrice ossea. Se ne conoscono più tipi: l'osteopontina (o BSP-I), la BSP-II e la glicoproteina acida dell'osso (o BAG-75). Le proteine contenenti l'acido α -carbossiglutammico (GLA) comprendono: l'Osteocalcina, o proteina GLA dell'osso, una piccola

proteina contenente 3-5 residui di GLA. E' stato ipotizzato che essa possa giocare un ruolo inibitorio nella mineralizzazione.

La Proteina GLA della matrice è presente sia nell'osso maturo che in quello in via di formazione, nonché nella cartilagine destinata a essere sostituita da tessuto osseo, come la cartilagine di accrescimento. Il suo ruolo biologico non è del tutto chiaro. Questa composizione dona al tessuto resistenza e leggerezza, proprietà meccaniche che lo rendono adatto alla funzione di sostegno. Inoltre la presenza di un elevata quantità di calcio libero e sottoforma di fosfato rendono l'osso fondamentale per l'omeostasi di questo elemento, regolata dall'azione combinata degli ormoni PTH e calcitonina.

Le cellule del tessuto osseo

La componente cellulare è costituita da quattro tipi di cellule: cellule osteoprogenitrici (o preosteoblasti), osteoblasti, osteociti e osteoclasti.

Le cellule osteoprogenitrici sono cellule di origine mesenchimale, hanno forma fusata o ovalare, con citoplasma scarso e basofilo e nucleo eucromatico con grande nucleolo. Gli altri organuli sono poco rappresentati. Esse sono in grado di produrre e secernere le bone morphogenetic proteins (BMP), fattori di crescita e di differenziamento autocrini. Capaci di divisione mitotica, si differenziano in osteoblasti.

Gli osteoblasti presentano un ergastoplasma sviluppato e un grande apparato di Golgi. I mitocondri contengono numerosi granuli densi, interpretabili come accumuli di ioni calcio. In prossimità dell'apparato di Golgi sono visibili vescicole con vario aspetto contenenti sostanze da esocitare: alcune di queste sono oblunghe e contengono molecole di procollagene; altre vescicole sono rotonde e si pensa contengano proteoglicani e altre molecole della sostanza fondamentale. Nel citoplasma periferico possono essere presenti dei corpi delimitati da membrana, detti globuli calcificanti, di 0,2-0,5 μm di diametro, in

cui sono localizzati enzimi glicoproteici come la fosfatasi alcalina e la pirofosfatasi. Essi non vanno confusi con le cosiddette sferule calcaree (calcifying globules), che si incontrano nella matrice ossea mineralizzata e che rappresentano i nuclei iniziali di aggregazione dei cristalli. Gli osteoblasti sono uniti tra loro e con gli osteociti vicini mediante giunzioni serrate (o gap junctions), tramite le quali le cellule si scambiano molecole segnale per la coordinazione dell'attività metabolica e di deposizione della matrice ossea.

Gli osteociti sono le cellule tipiche dell'osso maturo, responsabili del suo mantenimento ed anche capaci di avviarne il rimaneggiamento. Sono cellule terminali, con una autonomia di vita finita, finemente regolata da meccanismi endocrini. L'osteocita è una cellula stellata, con un corpo cellulare a forma di lente biconvessa e numerosi prolungamenti citoplasmatici. Al microscopio ottico, l'osteocita presenta un nucleo eterocromatico con un piccolo nucleolo ed un citoplasma perinucleare piuttosto scarso che, negli osteociti più giovani, è tenuemente basofilo.

Il corpo dell'osteocita rimane racchiuso in una nicchia scavata nella sostanza intercellulare ossea, detta lacuna ossea, la cui forma ricalca quella della cellula, mentre i prolungamenti sono accolti all'interno di sottili canali scavati nel tessuto osseo e definiti canalicoli ossei. Alle loro estremità, i prolungamenti di un osteocita sono connessi mediante giunzioni serrate con quelli degli osteociti circostanti. Tra la membrana plasmatica del corpo cellulare e dei prolungamenti e la matrice mineralizzata rimane uno spazio sottile occupato da tessuto osteoide che non mineralizza. Attraverso il tessuto osteoide delle lacune e dei canalicoli ossei, che sono ampiamente comunicanti, l'acqua e le sostanze disciolte (gas respiratori e metaboliti) riescono a raggiungere tutti gli osteociti, anche quelli più distanti dai vasi sanguigni. Metaboliti e molecole segnale disciolti nel citoplasma possono inoltre essere scambiate tra gli osteociti per il tramite delle giunzioni serrate.

Gli osteoclasti sono cellule di tipo macrofagico, responsabili del riassorbimento osseo nei processi di rimodellamento. Derivano dalla fusione dei preosteoclasti che originano nel midollo osseo emopoietico dalla stessa linea dei monociti. Vengono trasportati attraverso il sangue nei siti in cui avverranno i processi di riassorbimento.

Gli osteoclasti maturi sono cellule giganti (100-200 μm), plurinucleate in quanto originate dalla fusione dei singoli precursori mononucleati. Il citoplasma è acidofilo. L'osteoclasto attivato è aderente alla matrice mineralizzata in via di riassorbimento ed è solitamente accolto in una cavità, detta lacuna di Howship, che si forma a seguito dell'azione erosiva della cellula sull'osso. Sul versante della cellula che si appone all'osso è visibile il cosiddetto orletto increspato, che appare come un ispessimento della superficie cellulare con una sottile striatura disposta perpendicolarmente alla superficie stessa. Con metodi istochimici, a livello dell'orletto increspato si può rivelare la presenza dell'enzima anidrase carbonica e di pompe a protoni. Ai margini dell'orletto increspato vi è una porzione di citoplasma di aspetto astrutturato, detta zona chiara.

L'azione erosiva dell'osteoclasto si manifesta con la formazione della lacuna di Howship. Una volta formata una prima lacuna, l'osteoclasto si distacca dalla matrice ossea, si muove per moto ameboide su una porzione di osso adiacente a quella appena riassorbita, aderisce nuovamente e forma una nuova lacuna. In questo modo l'osteoclasto procede lungo l'osso scavandovi solchi profondi. Nel loro insieme, più osteoclasti attivati riescono in un tempo relativamente breve a riassorbire porzioni anche cospicue di osso.

La funzione osteoclastica è finemente regolata da fattori ormonali e locali. In particolare, gli osteoclasti sono le uniche cellule dell'osso che possiedono i recettori per l'ormone calcitonina, prodotto dalle cellule parafollicolari (o cellule C) della tiroide, con azione antagonista al paratormone. La calcitonina è un inibitore del riassorbimento dell'osso, essendo capace di indurre il distacco degli

osteoclasti dall'osso, la scomparsa dell'orletto increspato e la riduzione del metabolismo cellulare.

L'azione combinata di osteoblasti ed osteociti rendono l'osso una struttura altamente dinamica, capace di rinnovarsi continuamente e di modellarsi in risposta a stimoli chimici, ormonali e meccanici. Per operare in modo coordinato gli osteoblasti e gli osteoclasti comunicano tra loro in maniera diretta tramite contatti cellula-cellula dovuti a interazioni ligando-recettore e, indirettamente, grazie alla secrezione di molecole solubili quali citochine, ormoni e fattori di crescita. Alterazioni fisiologiche possono tuttavia rompere l'equilibrio sintesi/demolizione dando origine a variazioni della struttura che ne alterano le proprietà meccaniche e possono quindi portare a condizioni patologiche (es. osteoporosi).

Principali tappe di differenziamento degli osteoblasti

Gli osteoblasti derivano da cellule staminali mesenchimali, (MSCs) presenti nello stroma del midollo osseo. Si tratta di cellule multipotenti che sono capaci, seguendo un preciso programma di espressione genica tessuto-dipendente, di differenziarsi in diversi tipi cellulari tra cui condrociti, fibroblasti, mioblasti ed adipociti.

L'osteoblastogenesi è un processo che partendo da una MSCs porta alla formazione di un pre-osteoblasto ed infine ad un osteoblasto maturo capace di depositare matrice ossea e di regolare la mineralizzazione. Diversi ormoni e citochine sono coinvolti nel processo. Tra queste le BMP, TGF, FGF e membri della famiglia Wnt. La prima tappa dell'osteoblastogenesi prevede il differenziamento della cellula staminale mesenchimale in una cellula osteocondroprogenitrice per effetto del fattore Wingless-int (Wnt), il quale inibisce anche il differenziamento in senso preadipocitico (13).

Questo processo è accompagnato dall'attivazione di fattori trascrizionali pro-osteogenici, come il runt-related transcription factor 2 (runx2), osterix (osx), il distal-less homeobox5 (dlx-5) e dalla soppressione del fattore trascrizionale adipogenico CCAAT enhancer binding protein α (C-EBP α) e del peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). Alti livelli di Wnt e runx2 promuovono l'osteoblastogenesi a spese della condrogenesi (14). Ratti privi di runx2 non sono in grado di formare tessuto osseo mentre presentano una cartilagine ipertrofica (15). A questo punto il preosteoblasto smette di proliferare, sulla membrana cellulare è altamente espresso l'enzima fosfatasi alcalina (ALP) e secerne particolari proteine come l'osteonectina, l'osteopontina e sialoproteine.

L'ALP e il recettore di tipo 1 paratiroideo (PTH1R) sono marker precoci dei preosteoblasti e aumentano negli osteoblasti maturi e durante la deposizione di matrice ossea ma declinano quando l'osteoblasto diventa osteocita. L'osteocalcina è un marker tardivo che è espresso solo in osteoblasti maturi non più proliferanti (16).

Meccanismi istologici e molecolari di deposizione di matrice ossea

La formazione di nuovo tessuto osseo avviene attraverso due fasi:

1. la sintesi di matrice non calcificata denominata sostanza osteoide
2. la mineralizzazione dell' osteoide attraverso la formazione di cristalli di idrossiapatite.

La produzione della matrice ossea e la sua mineralizzazione avvengono secondo un orientamento ben preciso: inizialmente l'osteoblasto depone osso dal lato rivolto verso la superficie ossea preesistente; successivamente ne depone da ogni lato tutto attorno a sé, di modo che ciascuna cellula si allontana progressivamente dalle circostanti a causa dell'interposizione di sostanza intercellulare.

A questo punto l'osteoblasto rallenta sostanzialmente la sua attività metabolica e si trasforma in osteocita, mentre nuovi osteoblasti si differenziano via dalle cellule osteoprogenitrici. Quando il processo di formazione di nuovo tessuto osseo si è esaurito, gli osteoblasti che rimangono a ridosso della superficie ossea cessano la loro attività, riducono i loro organuli e si trasformano in una membrana di cellule appiattite, le cosiddette cellule di rivestimento dell'osso (bone lining cells), a cui si attribuisce un ruolo nel mediare gli scambi tra vasi sanguigni e osteociti.

Non sono ancora completamente chiari i meccanismi di calcificazione: è certo che nel processo sono implicate le vescicole secretorie e le proteine della matrice. Le vescicole si formano negli osteoblasti attraverso un processo di fusione della membrana plasmatica e vengono rilasciate nell' osteoide per gemmazione. Sono strutture attive che presentano sulla membrana diversi scambiatori ionici e gli enzimi fosfolipasi, fosfatasi alcalina e metalloproteasi. All'interno sono presenti ioni come Pi , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} , fosfolipidi e proteine.

La fosfatasi alcalina accumula all'interno delle vescicole elevate quantità di Pi dall'esterno, idrolizzando derivati fosforilati e trasportando il Pi all'interno. Contemporaneamente viene accumulato Ca^{2+} a causa della presenza di fosfolipidi e glicoproteine che legano il Ca^{2+} con grande affinità. Il progressivo aumento di questi ioni determina dopo poche ore la formazione di precipitati formati da complessi di Ca^{2+} e PO_4^{2-} con fosfolipidi e glicoproteine. Questi complessi si accrescono formando anche cristalli di idrossiapatite. Il contatto delle vescicole con la struttura mineralizzata esterna causa l'attivazione della fosfolipasi di membrana che ne determina la lisi. Segue quindi il riversamento del loro contenuto nella matrice.

Tra le proteine implicate nel processo di mineralizzazione sono di particolare importanza l'osteonectina e l'osteocalcina.

L' osteocalcina è la principale proteina non collagene presente nella matrice extracellulare. Sintetizzata e secreta esclusivamente dagli osteoblasti nell'ultimo stadio di maturazione, essa è considerata un indicatore del differenziamento osteoblastico. Si pensa che l'osteocalcina giochi un ruolo importante nel controllo della nucleazione dei cristalli di idrossiapatite. L'espressione dell'osteocalcina è modulata dall'ormone paratiroideo e da diversi altri fattori. E' stato dimostrato che la via della proteina chinasi cAMP dipendente ha un ruolo importante nel meccanismo d'azione dell'ormone PTH e nella regolazione dell'espressione dell'osteocalcina.

L'osteonectina, chiamata anche SPARC, è una proteina abbondantemente espressa nell'osso in attivo rimodellamento. L'osteonectina è sintetizzata dalle cellule della linea osteoblastica; lega l'idrossiapatite, il Ca^{2+} , il collagene di tipo 1 ed inibisce la mineralizzazione *in vitro*. Si ritiene che essa agisca come elemento di nucleazione dei cristalli minerali, in quanto ritenuta capace di concentrare il calcio nelle sue adiacenze creando così le condizioni per avviare la precipitazione del fosfato di calcio.

La fosfatasi alcalina

La fosfatasi alcalina (ALP) è un enzima in grado di idrolizzare i legami fosfodiesterici a pH alcalino. Si tratta di una glicoproteina di membrana contenente acido sialico. E' presente sulla membrana cellulare degli osteoblasti e nelle vescicole della matrice ossea. L'enzima possiede diversi ruoli nel processo di mineralizzazione: 1) idrolisi di esteri di fosfati organici con aumento locale della concentrazione di fosfato, che facilita la precipitazione di fosfato di calcio; 2) trasporto del fosfato all'interno delle vescicole della matrice ossea; 3) attività pro-mineralizzante attraverso l'attività idrolasica degli inibitori della mineralizzazione.

E' stato dimostrato che l'attività dell'ALP è indotta dall'acido ascorbico (vitamina C) attraverso un processo che richiede p300/CBP e pRB. L 'ALP è un ottimo marker istochimico per la tipizzazione degli osteoblasti e la sua attività è un buon parametro per lo studio dell'attività mineralizzante.

Omeostasi del calcio e del fosforo

Il calcio nel corpo umano è circa l'1,5% del peso corporeo (70 Kg di peso: circa 1 Kg). Ogni giorno viene scomposto circa ½ grammo di calcio dagli osteoclasti. Vuol dire che in circa sette mesi lo scheletro viene demolito e ricostruito. Questo richiede evidentemente un notevole dispendio energetico, dato che il corpo necessita di :

- calcio per il funzionamento nervoso, muscolare etc.,
- fosforo per il metabolismo energetico (adenosinfosfato)

Il tessuto osseo è metabolicamente molto attivo poichè in esso coesistono continui processi di riassorbimento e di deposizione ossea, mirati ad adeguarne la struttura alle diverse e variabili sollecitazioni meccaniche a cui l'osso è sottoposto. Le modificazioni morfo-funzionali del tessuto osseo vengono indicate con il termine di *rimodellamento osseo*, inteso come il risultato di fenomeni di riassorbimento e di deposizione. In altri termini il rimodellamento osseo è un fenomeno per il quale l'osso possiede la capacità adattativa di ottimizzare la sua forma in funzione del carico che deve sopportare. Le ossa del sistema scheletrico hanno la funzione di serbatoio per circa il 98% delle riserve di calcio nell'organismo, mantenendo costanti i suoi livelli fisiologici nel sangue, regolandolo entro certi limiti (calcemia: 2,25 - 2,6 mmol/l). Per garantire la sua omeostasi, il calcio viene mobilitato dal sangue durante il rimodellamento osseo. E' l'equilibrio fra il deposito di osso da parte degli

osteoblasti e la demolizione e il riassorbimento della matrice ossea da parte degli osteoclasti che regola la calcemia.

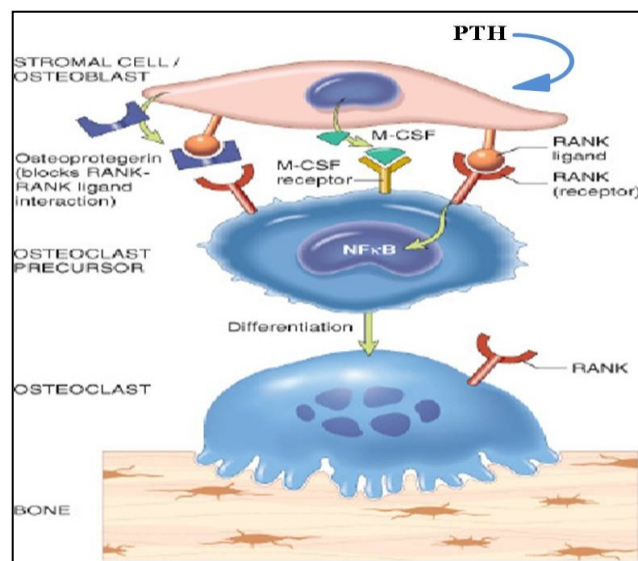
I meccanismi principali dell'omeostasi coinvolti nella regolazione della calcemia implicano la secrezione di due ormoni:

- l'ormone paratiroideo (PTH), secreto dalla paratiroide quando la calcemia diminuisce sotto i normali valori. Il PTH stimola l'attività degli osteoclasti facendo aumentare la demolizione della matrice ossea, il riassorbimento renale del calcio e la sintesi di vitamina D.
- la calcitonina, secreta dalla tiroide, viene prodotta in risposta ad una calcemia elevata e stimola la deposizione dell'osso da parte degli osteoblasti e inibisce l'attività degli osteoclasti. Il calcio verrà così depositato e diminuirà quello circolante.

La funzione osteoclastica è finemente regolata da fattori locali e ormonali. La calcitonina è un inibitore del riassorbimento osseo in quanto è capace di indurre il distacco degli osteoclasti dall'osso, la scomparsa dell'orletto a spazzola e la riduzione del metabolismo cellulare. Il recettore per la molecola è espresso già nei precursori circolanti degli osteoclasti, tanto che viene utilizzato come discriminante per l'identificazione di questo tipo cellulare. Tuttavia i preosteoclasti non esprimono il recettore per il paratormone, la cui azione osteolitica sembra esplicarsi attraverso gli osteoblasti. Stimolati dall'ormone, questi ultimi si ritiene che liberino fattori solubili detti Osteoclast Activating Factors (OAF), i quali attivano gli osteoclasti ad iniziare il riassorbimento. Questa ipotesi sembra avvalorata dai risultati sperimentali *in vitro* che dimostrano come fattori quali il paratormone, la vitamina D e alcune citochine siano incapaci di stimolare gli osteoclasti a riassorbire l'osso, a meno che non siano mantenuti in coltura con gli osteoblasti (16). Un OAF identificato recentemente è RANK-L, appartenente al sistema di recettori e ligandi OPG/RANK-L/RANK e oggi ritenuto fondamentale nella regolazione del

processo di osteoclastogenesi. RANK-L lega il recettore RANK espresso sulle membrane cellulari dei precursori osteoclastici, promuovendone il differenziamento e la maturazione. OPG, prodotta dagli osteoblasti, svolge il ruolo di recettore solubile di RANK-L inibendo l'osteoclastogenesi (17).

Sono stati evidenziati anche altri ormoni e fattori locali in grado di influenzare l'osteoclastogenesi e l'attività degli osteoclasti maturi, interferendo con il sistema OPG/RANK-L/RANK (18). Tra questi il già citato PTH, che legandosi ai recettori degli osteoblasti determina un incremento della sintesi di RANK-L e la conseguente maturazione delle cellule preosteoclastiche in osteoclasti maturi. Il paratormone (PTH) ha effetti complessi sulla matrice ossea, stimola infatti l'attività degli osteoclasti e quindi i processi di riassorbimento con conseguente aumento dei livelli plasmatici di calcio e fosforo; ma un eccesso di PTH stimola anche la proliferazione e l'attività degli osteoblasti, (ciò è dovuto alla stretta correlazione tra genesi e attività di osteoblasti e osteoclasti), in quanto è in grado di attivare il sistema osteoprotegerina (OPG)/RANK-L, sostenendo l'azione antiriassorbitiva di OPG e stimolando la funzione osteoblastica (attività anabolizzante) in colture d'organo (19).



1.3.1 Il sistema scheletrico in condizioni di microgravità

E' stato largamente dimostrato che la microgravità produce profondi cambiamenti in numerose funzioni fisiologiche. L'apparato scheletrico è uno degli apparati maggiormente sensibile alla microgravità. Sulla terra l'osso è costantemente sottoposto a processi di decalcificazione e ricalcificazione, regolati da numerosi fattori, tra cui è essenziale la contrazione muscolare che permette il mantenimento della stazione eretta sulla terra impedendo al corpo di cadere in avanti. Tali muscoli sono per questo chiamati antigravitari (muscoli della colonna vertebrale, della parte anteriore della coscia e posteriore della gamba.). Le continue contrazioni muscolari, del tutto inavvertite, necessarie alla stazione eretta provocano continue sollecitazioni sull'osso. Queste sollecitazioni rappresentano uno stimolo alla deposizione di calcio. L'attività fisica della quotidiana vita di relazione, poi, più o meno accentuata ed intensa, rappresenta un secondo stimolo fondamentale.

Non esistendo nello spazio la necessità della stazione eretta, così come nella lunga permanenza a letto o in condizioni di scarso movimento fisico (anziani, disabili, ecc.), l'osso perde la sua capacità di rigenerarsi e la decalcificazione prevale sulla deposizione di minerali di calcio (osteoporosi). Al rientro dalle missioni spaziali di media e lunga durata sono necessari mesi affinché il contenuto minerale osseo possa essere recuperato appieno e non è affatto certo che ciò possa avvenire dopo una permanenza di qualche anno nello spazio.

1.3.2 Studi in microgravità reale

Esperimenti "in vivo"

Fin ad oggi possediamo risultati di 40 anni di esperimenti riguardanti 6 gruppi di voli: i voli Gemini, le lunghe missioni Skylab, le missioni russe Cosmos, le lunghe missioni Salyut-7 e MIR, i brevi voli dello Space Shuttle e le recenti missioni a bordo della Stazione Spaziale internazionale (dai 3 ai 6 mesi).

Uno dei primi studi, eseguito da Mack et al. nel 1967 durante un volo Gemini (20), riporta una riduzione negli astronauti della densità ossea ed una diminuzione del calcio osseo tra il 3% e il 9% dopo un periodo compreso tra 4 e 14 giorni di volo orbitale. Ulteriori studi metabolici sugli stessi voli, condotti da Lutwak et al. (1969) (21), hanno rivelato una chiara tendenza all'incremento dell'escrezione urinaria del calcio e dell'idrossi-prolina, indicanti una demolizione della matrice ossea. Nella missione Biosatellite-III, utilizzando primati non umani (Macaca Nemestrina), è stata riscontrata una diminuzione media della densità ossea del 4,5% in vari siti anatomici dopo 9 giorni di volo (22).

Analisi condotte su astronauti durante la missione Apollo 17 riportano una riduzione di circa lo 0,2 % del calcio corporeo totale, dopo 14 giorni di volo (23). Questa riduzione è stata comparata con quella riscontrata in studi di bed-rest (24).

Il riassorbimento osseo è stato confermato dopo i 28 giorni della missione Skylab-II (12) e in due membri dell'equipaggio della missione Skylab-IV: questo riassorbimento osseo non ritornava a livelli basali neanche 97 giorni dopo il volo (25).

Verso la metà degli anni 70, in una serie di voli (missioni Cosmos e Biocosmos) furono effettuati studi su ratti e scimmie Rhesus, che hanno

evidenziato osteopenia delle ossa lunghe ed un incremento dell'ampiezza delle lacune degli osteociti, che suggerisce osteolisi perilacunare (26, 27, 28).

Nella missione Cosmos 1514, analisi istomorfologiche hanno rivelato un incrementato numero di osteoclasti e una riduzione del collagene di tipo I e III nel femore di ratto (29, 30).

Negli anni 90 numerosi astronauti si sono susseguiti sulla stazione spaziale russa MIR ed il suo predecessore Salyut-7. In nove cosmonauti, Schneider et al. nel 1992 (31) osservarono una riduzione della densità della pelvi e del collo del femore dopo 312 giorni di volo. In studi condotti durante la missione Euro Mir 95, valutando in cosmonauti markers di formazione e di riassorbimento osseo, si evidenziò una diminuzione del 30% della fosfatasi alcalina ossea rispetto al dosaggio pre-volo (32).

Vico et al. (33) dimostrarono che il deterioramento dell'osso della tibia di astronauti, dopo una missione della durata di circa sei mesi, persisteva a lungo anche dopo il ritorno a terra, suggerendo che il tempo di recupero è maggiore del periodo di permanenza in condizioni di microgravità.

Esperimenti “in vitro”

Nel 1992, durante la missione IML, furono utilizzati come campioni arti embrionali di ratto tra i 16 e i 17,5 giorni. Dopo 4 giorni di coltura in microgravità reale si notò un calo del 40-50% dell'uptake del calcio (34).

Esperimenti condotti utilizzando la linea osteoblastica MC3T3-E1, durante la missione shuttle STS-56, hanno mostrato una significativa riduzione della crescita cellulare e del numero delle fibre da stress oltre ad un'anomala morfologia da cui si ipotizza un generale collasso del citoscheletro (35).

Carmeliet e coll., utilizzando invece la linea di osteosarcoma MG-63, riscontrarono una ridotta espressione genica di ALP, di collagene di tipo I e di osteocalcina (36).

1.3.3 Studi in condizioni di microgravità simulata

Il limitato accesso alle sperimentazioni in condizioni di microgravità nello spazio, per gli elevati costi e la complessità nell'attuarle, ha indotto i ricercatori del settore biomedico ad intraprendere metodi capaci di simulare la microgravità sulla terra: sono iniziate così le varie sperimentazioni in bed-rest, clinostato, con ratti sospesi per la coda (rat hindlimb unloading by tail suspension) (37).

Esperimenti “in vivo”

Negli anni 70'-80' la NASA ha sviluppato un modello di ipocinesia che prevedeva l'immobilizzazione in posizione seduta di scimmie Macaca Mulatta per due settimane e i risultati suggerirono che le proprietà meccaniche delle vertebre erano alterate alla fine del 14° giorno (-12%) e continuavano a diminuire (-44%) dopo 14 giorni di recovery (38). Misure istomorfometriche effettuate sull'osso trabecolare delle vertebre hanno rivelato una quasi totale assenza di formazione e un drastico incremento del riassorbimento osseo (39).

Un decremento del volume dell'osso e una riduzione del 35% della sua crescita furono notati nel ratto dopo solo 5 giorni di hindlimb unloading (40). Osservazioni fatte su volontari in esperimenti di bed-rest mostrarono risultati simili a livello delle ossa lunghe (tibia e femore) (41). Ulteriori studi in bed rest hanno evidenziato un aumento dell'escrezione urinaria di calcio (42).

Successive ricerche, ugualmente condotte su ratti sospesi per la coda, hanno messo in evidenza una ridotta differenziazione degli osteoblasti dopo 7

giorni. A sei settimane invece, si è riscontrata una significativa alterazione della struttura ossea (riduzione del numero e dello spessore delle trabecole), e dunque una maggiore fragilità dello scheletro, conseguenza notata anche in altri esperimenti in cui i ratti sospesi per 2 settimane mostravano ossa sensibili alla fratture (43-46).

Sempre dopo 14 giorni di sospensione per la coda, Basso et al. (47) hanno mostrato un calo nella proliferazione delle popolazioni di cellule osteoprogenitrici CFU-O (osteoblast colony forming units) e CFU-AP (ALP-positive colony forming units).

Recentemente è stato dimostrato che 24 ore di immobilizzazione su un letto inclinato anteriormente di 6° (bed rest) sono sufficienti a indurre un significativo incremento dell'attività degli osteoclasti, come dimostrato da dosaggi dei marker di riassorbimento osseo (48).

Esperimenti” in vitro”

Guignandon et al. (49) hanno osservato una dimensione cellulare inferiore rispetto ai controlli nella linea cellulare ROS/17/2.8 durante un volo parabolico del 1995.

Nel 2000 Sakar e coll. (50) hanno osservato, oltre ad una disorganizzazione dell'actina, una distribuzione perinucleare dell' integrina $\beta 1$, ipotizzando una riorganizzazione dei contatti focali in seguito ad esposizione alla microgravità.

Una soppressione della differenziazione osteoblastica (decremento fattori di trascrizione AP-1 e Runx-2) è stata osservata in MC3T3- E1 da Ontiveros e McCabe usando il simulatore di microgravità Rotating Wall Vessel (RWV) (51).

Studi condotti su cellule mesenchimali stromali (MSC) umane hanno mostrato una distruzione delle fibre da stress di F-actina e un conseguente incremento di G-actina. Inoltre l'attività di RhoA, una piccola GTPase coinvolta

nella regolazione della formazione delle fibre da stress, è significativamente ridotta (52).

1.4 L'immunosenescenza

L'aumento della vita media rappresenta una delle grandi conquiste del ventesimo secolo. Ciò implica che un numero sempre crescente di anni vengono trascorsi in senescenza con conseguenze socio-sanitarie di vasta portata, divenendo di importanza prioritaria sviluppare nuove tecniche di ricerca affinché le persone anziane possano vivere la propria senescenza nelle migliori condizioni di salute possibili. Perciò l'incremento della popolazione anziana pone una serie di affascinanti sfide scientifiche. Da una parte l'esigenza di nuovi approcci terapeutici nell'ambito di quadri clinici che spesso coinvolgono molte malattie, in particolare quelle degenerative che aumentano in prevalenza con l'età. Dall'altra, l'importanza di identificare e approfondire lo studio dei meccanismi che rappresentano le basi dell'invecchiamento stesso.

Negli ultimi anni la ricerca di un singolo fattore responsabile dell'invecchiamento, come l'attività di un singolo gene o il deterioramento di un sistema chiave, è stata sostituita dalla visione di un processo multifattoriale estremamente complesso, somma di fattori genetici, ambientali e stile di vita.

L'invecchiamento è clinicamente associato con una aumentata frequenza e gravità di neoplasie, malattie infettive e infiammatorie croniche e autoimmuni. Queste alterazioni del sistema immunitario correlate con l'età sono note col nome di immunosenescenza. Il riparo del DNA, gli antiossidanti enzimatici e non enzimatici, la produzione di *Heat Shock Proteins* (HSPs), l'attività della poli (ADP-riboso) polimerasi e l'apoptosi, intesa come il processo ancestrale con cui vengono eliminate le cellule danneggiate, mutate, infette o trasformate, rappresentano i principali meccanismi di difesa cellulare del nostro organismo.

La *teoria del network* ipotizza una serie di interconnessioni settate a livelli differenti fra questi meccanismi (53, 54). Questi processi cellulari e molecolari costituiscono la rete basale di difesa contro lo stress, che da un punto di vista evolutivo è altamente conservata nelle diverse specie e si è arricchita ed ampliata generando nuovi e più elevati livelli di organizzazione in grado di interagire (55). Un'alterazione o un difetto di questi impedirebbe alla cellula di mantenere la propria omeostasi causandone la senescenza, intesa come invecchiamento a livello cellulare determinato da modificazioni fisiologiche (inclusa la capacità di risposta e/o la produzione di fattori di crescita), con conseguente sbilanciamento tra proliferazione e morte cellulare in tessuti ed organi. Anche il sistema immunitario e quello neuro-endocrino, caratterizzati da strette interazioni, condividendo mediatori comuni hanno il fine di garantire l'omeostasi dell'intero individuo. L'organismo è continuamente esposto ad agenti stressogeni di natura fisica (UV e radiazioni ionizzanti), chimica (componenti e prodotti del metabolismo) e biologica (virus), potenzialmente dannosi per il mantenimento dell'integrità funzionale della cellula.

Un'altra teoria sull'invecchiamento, la così detta *teoria del rimodellamento* (56) sostiene che l'invecchiamento non è un deterioramento, ma piuttosto un dinamico riassetto globale di ciò che viene definito *spazio immunologico*. A questa teoria ha dato un contributo notevole la scelta di studiare soggetti ultracentenari poiché rappresentano l'esempio vivente dell'invecchiamento con successo, ossia il tipo di invecchiamento auspicabile in quanto esente da malattie croniche invalidanti. Questi soggetti sono un gruppo altamente selezionato che hanno vissuto per definizione più di cento anni senza essere andati incontro alle maggiori malattie età correlate (diabete, demenza, malattie cardiovascolari, tumori, etc). Negli anziani si riscontra una progressiva diminuzione del repertorio di linfociti T vergini e un progressivo aumento delle cellule effettrici/memoria. E' stato curioso però notare che nei centenari le alterazioni

osservate in molti parametri immunologici sono meno consistenti del previsto. Ad esempio, nonostante l'involutione timica, nei centenari si osserva una piccola ma costante produzione di linfociti vergini che ha fatto supporre la presenza di organi linfopoietici secondari.

1.4.1 Principali caratteristiche dell' immunosenescenza

Il deterioramento della funzione immunitaria che si verifica con l'avanzare dell'età viene definito con il termine "immunosenescenza" che indica una riduzione della resistenza alle infezioni e, secondo alcuni autori, al cancro (57).

Infatti il vaccino influenzale è efficace solo nel 30-40% dei casi in soggetti anziani e aumenta l'incidenza di neoplasie, in parte dovuta ad una inefficace sorveglianza da parte delle cellule natural killer.

I più evidenti cambiamenti che il sistema immunitario subisce con l'invecchiamento sono:

1) L'involutione del timo: questo organo subisce con l'avanzare dell'età una involuzione graduale che determina la riduzione dei livelli di produzione di cellule T vergini mature (58, 59). Diverse questioni sono ancora dibattute. In esperimenti su animali di età avanzata, infatti, il trapianto del timo o il ripristino completo della sua struttura e della sua funzione, mediante l'ormone della crescita, non migliora in maniera significativa la risposta immunitaria. Inoltre alcuni soggetti timectomizzati non mostrano un'alterazione del repertorio linfocitario (60), perciò è stato ipotizzato che altri organi o tessuti possano contribuire alla preservazione della funzione linfocitaria

2) L'esaurimento dei linfociti T naïve: le alterazioni che si verificano con l'avanzare dell'età a carico dei linfociti sono complesse. I cambiamenti più drammatici si verificano nel compartimento delle cellule T (61). Una delle maggiori caratteristiche dell'immunosenescenza è una progressiva riduzione di

linfociti T naïve (CD45RA⁺ e CD62L⁺ o CD95⁻) e un accumulo di cloni espansi di linfociti T memoria (CD45RO⁺ CD95⁺) (62). Questo fenomeno, che interessa entrambe le popolazioni di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺, anche se più marcato all'interno dei CD8⁺, riflette l'esposizione cumulativa a patogeni e il carico antigenico a cui l'individuo è stato sottoposto lungo l'arco della sua vita.

3) Diminuita attivazione e capacità proliferativa dei linfociti T: studi di attivazione dei linfociti T nel topo hanno identificato un'alterazione nella trasmissione del segnale subito dopo la stimolazione, includendo la riduzione dell'attivazione delle chinasi Raf-1/MEK/ERK, della protein-kinasi JNK e del flusso di Ca⁺⁺ intracellulare (63). Altri autori hanno identificato un declino dipendente dall'età pari a tre volte della fosforilazione della catena ζ del CD3 e una compromissione nella traslocazione della PKCθ dal citoplasma al sito di interazione del linfocita T con la cellula presentante l'antigene (64). Nell'uomo, le cellule CD3⁺ derivate da soggetti anziani mostrano una ridotta attivazione delle MAPK in seguito a stimolazione (65). Inoltre, altre vie di segnalazione possono essere influenzate dall'invecchiamento. Liu *et al.* dimostrarono che le chinasi ERK e JNK erano diminuite in linfociti stimolati con PMA provenienti da soggetti anziani e che il loro declino comportava la diminuzione dell'attivazione della chinasi Raf-1 (66). Alterazioni nella mobilizzazione del Ca²⁺, nella fosforilazione di residui di tirosina e nell'attivazione delle MAP chinasi sono state associate ad una riduzione in termini di espressione dell'IL-2 e del suo recettore (67, 68). Ad ogni modo il meccanismo alla base della diminuzione della responsività delle cellule T con l'invecchiamento rimane tutt'oggi oggetto di studio (69). Un ruolo importante nella regolazione dell'espressione genica nelle cellule T viene svolto dal fattore trascrizionale NF-κB, che regola l'espressione di quei geni che sono necessari nella risposta delle cellule T (IL-2, IL6, IL-8 e recettori di superficie delle cellule T). Con l'avanzare dell'età è stata osservata una diminuzione dell'attività di questo

fattore di trascrizione (70, 71), suggerendo una compromissione nell'attivazione del segnale proliferativo.

Un'altra modificazione a cui vanno incontro le sottopopolazioni di linfociti T naïve e di memoria con l'età è il progressivo accumulo età dipendente di linfociti CD28- in entrambi i compartimenti di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ (62, 72). Tali cloni linfocitari, privi del CD28, molecola co-stimolatoria essenziale per l'innescamento di una risposta immunitaria, non sono in grado di andare incontro ad espansione clonale, hanno una lunghezza dei telomeri più breve indicativa di una lunga storia replicativa. Queste cellule hanno già incontrato l'antigene, perdendo la capacità replicativa dipendente dalla costimolazione, conservano un fenotipo di memoria e possono essere identificate come cellule all'ultimo stadio di differenziamento, denominate effettrici terminali nel caso della sottopopolazione dei CD8⁺ o helper terminali nel caso della sottopopolazione dei CD4⁺.

4) Le alterazioni del pattern di citochine e l'inflammaging: le citochine sono molecole ad attività umorale filogeneticamente molto antiche e altamente conservate nel corso dell'evoluzione che svolgono un ruolo di mediazione e di comunicazione tra le diverse componenti del sistema immunitario. Esse rappresentano una classe eterogenea di proteine solubili in grado di intervenire fisiologicamente in complessi meccanismi immunitari e neuroendocrini. Infatti esiste un equilibrio di produzione di queste molecole caratterizzato da livelli fluttuanti di citochine ad azione rispettivamente pro- e anti-infiammatoria prodotte dalle varie cellule del sistema immunitario al fine di mantenere l'omeostasi immunologica e di permettere la polarizzazione delle risposte immunitarie (73). Durante l'invecchiamento, da un lato si osserva una diminuzione, seppure reversibile, dei livelli di IL-2, citochina chiave del processo di attivazione del linfocita T, dall'altro si verifica un aumento nella produzione di mediatori pro-infiammatori quali IL-1, IL-6 e Fattore di Necrosi

Tumorale- α (TNF- α) (74). Il risultato è un incremento correlato all'età dello stato pro-infiammatorio dell'organismo. La presenza di questi aumentati marcatori di uno stato infiammatorio cronico subclinico è stato chiamato "inflammaging" (75). E' stato proposto che una efficace risposta infiammatoria utile per la risoluzione delle infezioni in giovane età possa diventare in vecchiaia causa di numerose malattie quali artrosi, diabete, malattie cardiovascolari e neurodegenerative. Segni in inflammaging sono stati trovati inaspettatamente anche in centenari sani, contemporaneamente a un aumento di marcatori anti-infiammatori, come IL-10 e TGF-beta (76, 77). Si pensa quindi che a fianco a un fenomeno infiammatorio sia presente, un altrettanto importante fattore per la longevità, un fenomeno compensatorio anti-infiammatorio (anti-inflammaging) e che quindi la longevità sarebbe il risultato di un bilanciamento tra queste due risposte contrastanti (78).

5) L'aumentata suscettibilità all'induzione all'apoptosi e il paradosso infiammazione–apoptosi: l'apoptosi tende ad aumentare in alcuni tessuti per effetto dell'età (79, 80). Herndon *et al.* nel 1997 dimostrarono che le cellule T con fenotipo CD3⁺CD45RO⁻ provenienti da soggetti anziani hanno un'apoptosi aumentata rispetto a cellule T provenienti da soggetti giovani (81). Aspinall *et al.* (1998) osservarono un incremento dell'espressione dei markers Fas e Fas ligando ed una diminuzione dell'espressione di Bcl-2 in cellule di memoria T CD4⁺ e CD8⁺ provenienti da soggetti anziani rispetto a controlli giovani (82). I difetti nella segnalazione transmembrana (83, 84), l'espressione differenziale dei geni che controllano il ciclo cellulare (85, 86), la diminuita attività dei fattori trascrizionali che regolano l'espressione delle linfochine (87), la minore produzione di IL-2 e l'espressione difettiva del suo recettore (88, 89) possono condurre ad una morte cellulare eccessiva.

6) Danneggiamento delle estremità cromosomiche (telomeri) e riduzione dell'attività telomerasica: l'accorciamento delle estremità telomeriche può

svolgere un ruolo nella senescenza cellulare. Infatti, Weng *et al.* dimostrarono che la lunghezza media dei telomeri in cellule naïve e di memoria si accorciava di 0.3 PD (Population Doubling) ogni anno (90).

1.5 L' Apoptosi

Sono state definite due forme di morte cellulare, con delle fondamentali differenze dal punto di vista biochimico e morfologico: l'apoptosi e la necrosi. Solo nel 1972, dopo la pubblicazione di un importante articolo a firma di Currie, Willye e Kerr, l'apoptosi fu riconosciuta come processo biologico fondamentale per gli organismi multicellulari. Con questo termine si intende un processo fisiologico di morte cellulare programmata o "suicidio cellulare" atto a eliminare una cellula irreversibilmente danneggiata, con il fine di proteggere dal danno le cellule vicine e quindi l'intero organismo. E' possibile in questo modo, diversamente dalla necrosi, controllare fenomeni di autoimmunità, infiammazione e embriogenesi. L'apoptosi gioca un ruolo importante nella morfogenesi dei mammiferi, nella distruzione di cellule immunologicamente reattive contro il self, cellule infettate o geneticamente danneggiate. La morte cellulare apoptotica è finemente regolata in tutti i suoi aspetti ed è un processo svolto attivamente dalla cellula e che per questo richiede dispendio di energia, con il fine di salvaguardare l'organismo nel suo complesso.

A differenza dell' apoptosi, la necrosi è un evento accidentale, passivamente subito dalle cellule, che si verifica in seguito ad una varietà di stimoli diversi di natura chimico-fisica, batteriologica-virale e patologica. Inoltre la necrosi è un fenomeno acuto che si svolge nel giro di pochi minuti e che provoca infiammazione.

Caratteristiche morfologiche

Nel processo apoptotico si verificano delle profonde e specifiche modificazioni della cellula, che perde rapidamente il suo volume, staccandosi da quelle vicine e perdendo l'asimmetria dei fosfolipidi di membrana. Vengono così esposti componenti normalmente non espressi. A livello nucleare, si osserva la disgregazione del nucleolo, la condensazione e il taglio della cromatina in frammenti di 180-200 paia di basi, il DNA ladder. A questo punto granuli compatti di cromatina degradata si spostano verso la periferia del nucleo, formando una caratteristica “mezzaluna”. Frammenti di materiale nucleare giungono in prossimità della membrana plasmatica, dove vengono circondati tramite estroflessioni della membrana, dando alla cellula il caratteristico aspetto a bolle (blebs). Queste bolle si staccano poi dal corpo cellulare trascinando parte del citoplasma e del materiale nucleare e costituendo i cosiddetti corpi apoptotici, riconosciuti e fagocitati dalle cellule vicine, senza dar luogo a processi infiammatori.

Caratteristiche biochimiche

Importante evento del programma apoptotico riconoscibile sin dalle fasi precoci è la traslocazione della fosfatidilserina (PS) dal versante citoplasmatico del doppio strato lipidico al versante esterno della membrana plasmatica (esternalizzazione). Questo segnale gioca infatti un ruolo fondamentale nel riconoscimento e nella fagocitosi delle cellule apoptotiche da parte dei macrofagi.

La frammentazione del DNA è un “end-point” dell'apoptosi. Avviene ad opera di specifiche endonucleasiche che tagliano a livello di linker di DNA compresi fra i nucleosomi producendo dei frammenti nucleosomiali o oligonucleosomialidi di 180 pb o multipli.

I diversi stimoli apoptogeni seguono due principali e distinti pathways (91): una via è attivata da “segnali di morte” che arrivano ai recettori di superficie, l’altra, attivata da segnali endogeni, è regolata dal mitocondrio. Queste vie sono regolabili e convertibili fin quando convergono nell’attivazione delle caspasi ovvero proteasi a cisteina in grado di tagliare il frammento peptidico situato dopo un residuo di acido aspartico. Le caspasi vengono sintetizzate in forma di zimogeni inattivi (pro-caspasi). Nelle cellule apoptotiche la pro-caspasi viene processata per auto proteolisi o per intervento di altre caspasi. Le caspasi iniziatrici vengono attivate da stimoli a livello della membrana plasmatica (caspasi-8,-10) o dal rilascio di citocromo-c mitocondriale (caspasi-9). Le caspasi effettrici (caspasi-3, -6, -7), attivate dalle iniziatrici, sono responsabili della rottura proteolitica di importanti substrati citoplasmatici e nucleari .

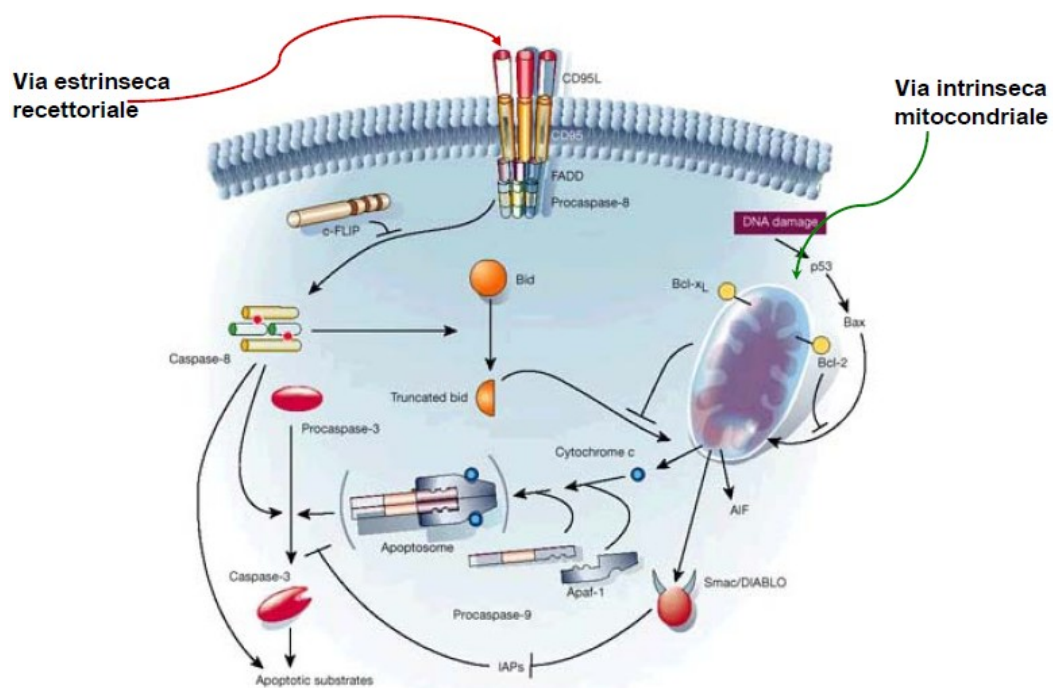


Fig.1: Schema riassuntivo dei Pathways estrinseco ed intrinseco dell’apoptosi

1.6 Fagocitosi

La fagocitosi è il necessario step finale della apoptosi. Essa porta alla eliminazione (clearance) delle cellule apoptotiche da parte di fagociti, i quali possono essere “professionisti” (professional) e “non professionisti” (amateur). Le cellule apoptotiche sono generalmente rapidamente rimosse, prima che perdano la loro integrità di membrana, al fine di prevenire i danni causati da un accidentale rilascio del loro contenuto antigenico e citotossico che stimolerebbe la produzione di auto-anticorpi, tipica delle malattie autoimmuni (92, 93). Infatti, se la presenza di cellule apoptotiche eccede la capacità di eliminazione da parte dei macrofagi, la cellula da apoptotica evolve in cellula con necrosi secondaria determinando il rilascio del suo contenuto cellulare e un danno nei tessuti circostanti. Inoltre la fagocitosi è accompagnata dal rilascio di segnali anti-infiammatori, come la produzione di Trasforming growth factor-beta (TGF-beta), la Prostaglandina E2 (PGE2) e l’Interleuchina 10, che sono importanti per la risoluzione delle infiammazioni e la regolazione delle risposte immuni (94).

Affinché avvenga il riconoscimento tra macrofago e cellula apoptotica, quest’ultima nelle prime fasi del processo apoptotico espone sulla sua superficie alcune modificazioni conosciute col nome di “Eat me signals”, quali la esposizione della fosfatidilserina (95, 96) e la perdita di acido sialico delle estremità delle catene oligosaccaridiche delle glicoproteine e dei glicolipidi di membrana (97, 98, 99). Non è del tutto chiaro se per la rimozione delle cellule apoptotiche sia sufficiente uno di questi segnali, se si renda necessaria una loro cooperazione o se esista una precisa sequenza temporale nella loro manifestazione sulla superficie cellulare. Alcuni studi indicherebbero che l’esposizione della fosfatidilserina sulla membrana delle cellule apoptotiche sia un segnale precoce e transitorio (100).

Cellule apoptotiche di dimensioni superiori a 2 micron, richiedono la coordinazione d'attività di diversi recettori. Due step son fondamentali, da una parte il “Tethering” (riconoscimento e binding) e a seguire il “Tickling” (internalizzazione e attivazione di downstream pathways) (101).

La funzione di riconoscimento e binding è spesso mediata dalle integrine, come $\alpha\beta5$, $\alpha\beta3$ (recettore della vitronectina), la famiglia delle $\beta2$ integrine (CD11/CD18) e il CD36 (integrin-associated protein). Tutti questi recettori contengono un motivo RGD (Arg-Gly-Glu), come quello usato per legare le proteine della matrice fibronectina e vitronectina (102). Tale motivo ha però un differente ruolo durante la fagocitosi, si tratta infatti di un sito di riconoscimento per proteine denominate “opsonine”, proteine solubili secrete da differenti tipi cellulari, tra cui i macrofagi, che fungono da ponte molecolare tra i recettori del macrofago e i segnali “eat me” della cellula apoptotica. Questa famiglia di proteine sieriche include l'annexina1, la trombospondina (TSP), MFG-E8 (Milk fat globule EGF-factor 8), Del-1, $\beta2$ -glycoprotein 1, protein S e Gas6.

La integrina $\alpha\beta3$ e il CD36 sono i principali recettori implicati nel riconoscimento delle cellule apoptotiche mediante il legame con la opsonina trombospondina (103, 14). In particolare l'integrina $\alpha\beta3$, ma non il CD36, è in grado di legarsi direttamente alla trombospondina mediante il suo dominio RGD (105, 106). Il CD36 giocherebbe invece un ruolo di amplificazione nel riconoscimento della cellula apoptotica. E' possibile che questa amplificazione sia dovuta alla sua capacità di legare lipoproteine ossidate (107). Un ruolo di primo piano ha certamente anche la riorganizzazione del citoscheletro nel veicolare i due recettori in posizione prossimale per una perfetta azione sinergica.

Questa grande complessità e la ridondanza di meccanismi di eliminazione delle cellule apoptotiche mediante fagocitosi nei mammiferi denota la sua importanza e le sue implicazioni fisiologiche.

2. SCOPO DELLA TESI

L'ambito in cui si inserisce la presente ricerca nasce dall'osservazione che le più comuni alterazioni della microgravità sul sistema immune mostrano forti analogie con i corrispondenti processi cellulari e molecolari osservati durante la immunosenescenza. Per esempio i livelli plasmatici delle citochine proinfiammatorie (IL-6, TNF- α , IL-1- β) sono significativamente aumentati, si riscontra drammatica riduzione della proliferazione di T linfociti umani attivati con mitogeni, una diminuzione della espressione genica dell' IL-2 e del suo recettore CD25, un'aumentata sensibilità all'apoptosi.

Poichè l'immunosenescenza è un *continuum* di cambiamenti inevitabilmente correlati alle patologie associate all'età, è difficile discriminare i contributi apportati all'immunosenescenza dalle varie patologie di cui possono esser reduci gli anziani. A tale scopo studiare le stesse variazioni osservate durante l' immunosenescenza in cellule del sistema immune di soggetti giovani o animali da laboratorio sicuramente sani sottoposti a microgravità, potrebbe essere uno strumento sperimentale per una migliore comprensione di alcuni processi molecolari e cellulari osservati negli anziani.

Nella prima parte del mio dottorato, come preliminare allo studio dell'immunosenescenza abbiamo voluto testare il Clinostato o RPM (Random Positioning Machine), apparecchiatura (presente da 10 anni nei laboratori del Dipartimento di Scienze Fisiologiche, Biochimiche e Cellulari), tradizionalmente usata per esperimenti *in vitro* in condizioni di microgravità simulata, per lo studio sull'animale *in toto*, su piccoli roditori (ratti o topi). Tali studi di fisiologia animale in vivo si avvarranno in futuro di una modernissima apparecchiatura, tuttora in fase di collaudo, la MHOR, che verrà presto montata a bordo della RPM. La MHOR consentirà una maggiore autonomia di gestione (15-20 giorni) degli animali impiegati in tali esperimenti, per quanto riguarda il

cibo, l'acqua da bere e la toilette. Per la validazione di tale dispositivo simulante la microgravità si è ricorso ad un modello sperimentale ampiamente conosciuto nel campo della fisiologia spaziale: l'effetto della microgravità sul tessuto osseo. Tale effetto provoca negli astronauti che permangono nello spazio per lunghi periodi, una condizione molto simile all'osteoporosi. L'osteoporosi è una malattia d'interesse sociale che colpisce individui anziani, prevalentemente donne in età postmenopausale e soggetti costretti a una lunga permanenza a letto. La sua eziologia è multi-causale ed ancora scarsamente conosciuta.

La perdita di tessuto osseo ed il rischio di frattura rappresentano perciò uno scenario medico di importanza prioritaria nella progettazione delle future missioni spaziali a lungo termine e nello sviluppo di contromisure innovative per la salute degli astronauti in ambiente microgravitazionale. Il presente studio è stato più precisamente condotto sul grado di differenziamento di cellule stromali ossee in osteoblasti maturi di ratto sottoposto a condizioni di microgravità simulata nella Random Positioning Machine (RPM) per 72 ore.

Nella seconda parte del mio dottorato abbiamo rivolto l'attenzione su un'analogia particolarmente interessante riscontrata sia tra gli effetti della microgravità sul sistema immune sia tra i parametri ematici negli anziani, e cioè la maggiore suscettibilità all'apoptosi e l'aumento dei livelli sierici delle citochine infiammatorie. Ciò costituisce un paradosso ancora inspiegato in quanto una delle finalità dell'apoptosi è proprio quella di evitare l'istaurarsi di fenomeni infiammatori.

Durante i processi di morte cellulare programmata infatti, questa esigenza è soddisfatta dal fatto che il contenuto dei corpi apoptotici risulta confinato da porzioni di membrana evitando così il rilascio di materiale intracellulare che causerebbe l'istaurarsi di fenomeni infiammatori e produzione di auto-anticorpi. Un efficiente sistema di fagocitosi inoltre è necessario per evitare che cellule apoptotiche non prontamente eliminate vadano incontro a processi di necrosi

secondaria con le stesse conseguenze infiammatorie e autoimmuni.

L'incremento dei fenomeni apoptotici, e allo stesso tempo dell'infiammazione, che caratterizzano alcune patologie correlate all'invecchiamento e le alterazioni dovute alla microgravità, possono quindi essere interpretati ipotizzando che la marcata apoptosi non sia seguita da una efficiente rimozione fagocitica delle cellule apoptotiche e dei corpi apoptotici. A tale scopo, nella seconda parte del mio dottorato, abbiamo isolato monociti da sangue periferico di donatori effettuando indagini preliminari per la valutazione del differenziamento in macrofagi e della capacità di fagocitosi mediante *Zimosan* a diversi giorni di differenziamento.

A questo punto saggi di interazione e fagocitosi di linfociti indotti all'apoptosi e valutati per la traslocazione della *fosfatidilserina* e la frammentazione del DNA, son stati messi in coltura con macrofagi da giovani e da anziani scelti in base al *senieur protocol*, protocollo ad hoc per gli studi gerontologici. Ulteriori esperimenti son stati condotti con colture di macrofagi, derivati da soggetti giovani, in condizioni di microgravità simulata.

Parallelamente si è valutata la capacità di interazione e fagocitosi in ratti sottoposti a microgravità simulata per 5 giorni.

Si è quantizzata la capacità di interazione e fagocitosi nelle diverse condizioni sperimentali. E' stata inoltre valutata la morfologia cellulare, l'organizzazione del citoscheletro e la localizzazione di integrine di membrana in quanto la riorganizzazione del citoscheletro è fondamentale sia nelle fasi iniziali di interazione con la cellula apoptotica, determinando la polarizzazione dei recettori deputati al riconoscimento, sia per l'azione vera e propria di fagocitosi.

Infine sono stati condotti esperimenti sulla capacità di binding nei confronti della trombospondina, e sulle variazioni dell' indice di fagocitosi nelle diverse condizioni in seguito ad aggiunta nel mezzo di interazione di questa

opsonina che media l'interazione tra superficie delle cellule apoptotiche e il macrofago.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Random Positioning Machine (RPM)

Data l'impossibilità di riprodurre sulla terra la reale assenza di peso presente nell'ambiente spaziale, per poter condurre esperimenti in microgravità si deve ricorrere all'uso di apparecchiature che permettono di simulare la quasi assenza di gravità. Molto affidabili in tal senso si sono dimostrati i clinostati, quello bidimensionale o Fast Rotating Clinostat (FRC) e soprattutto quello tridimensionale o Random Positioning Machine (RPM) (fig.2). Il Dipartimento di Scienze Fisiologiche, Biochimiche e Cellulari di Sassari ha in dotazione tali strumenti da oltre un decennio.



Fig.2: Random positioning machine (RPM)

Il clinostato tridimensionale RPM, attraverso movimenti rotazionali, è capace di far variare casualmente la posizione del campione nelle tre dimensioni dello spazio e ottenere in questo modo condizioni di microgravità simulata, dell'ordine di 10^{-3} g. Esso è costituito da due telai rotanti, indipendenti, mossi da

due cinghie collegate ai due motori fissati al telaio di supporto dell'apparecchiatura.

Il campione va sistemato il più vicino possibile al centro del pannello interno, dove può raggiungere il massimo della microgravità. Due livelli a bolla presenti sui due telai sono necessari per il bilanciamento manuale. La rotazione è generata da due motori ed è sotto il controllo di un Personal Computer (PC) e di un programma appositamente realizzato, che fanno sì che la risultante dei vettori gravitazionali, cui è sottoposto il campione, tenda costantemente allo 0, annullando così gli effetti della gravità terrestre. La velocità angolare di rotazione dei telai è variabile da 30° a 360°/s. La validità del clinostato tridimensionale è stata valutata confrontando i risultati ottenuti in microgravità reale (shuttle e razzi sonda) su linfociti umani (fig.3). I parametri finora analizzati mediante esperimenti *in vitro* sui T linfociti umani dimostrano che la RPM è un valido strumento per simulare la microgravità, che si aggira intorno a 10^{-3} x g.

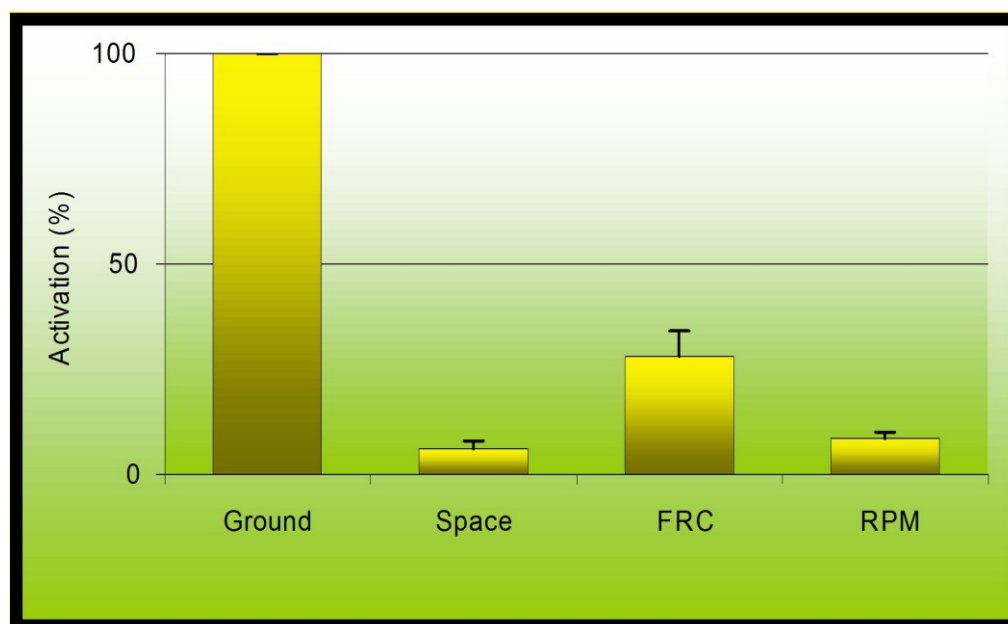


Fig.3: Effetti della microgravità sulla attivazione dei Linfociti T umani.

1° PARTE

ESPERIMENTI *IN VIVO* ED *IN VITRO* IN CONDIZIONI DI MICROGRAVITÀ SIMULATA SUL DIFFERENZIAMENTO DI OSTEOBLASTI DI RATTO

3.2. Esperimento in vivo

Negli esperimenti condotti in questa tesi di dottorato sono stati utilizzati ratti maschi albini Wistar di peso compreso tra 150 e 175 grammi. I ratti sono stati suddivisi in 3 gruppi:

-**RPM**: costituito da ratti bloccati all'interno di un semicilindro di perspex posizionato al centro del pannello interno del clinostato e tenuti in rotazione per 72 ore.

-**Controllo in RPM (CR)**: composto da ratti bloccati per 72 ore ugualmente in un semicilindro di perspex posto sulla base statica del clinostato e non sul pannello rotante.

-**Controllo in gabbia (CG)**: costituito da ratti che permangono per 72 ore in una gabbia standard.

Gli esperimenti sono stati effettuati in accordo con la legge italiana (D.L. 116,1992), che permette di effettuare esperimenti sugli animali da laboratorio solo dopo la sottomissione alle autorità competenti di un progetto di ricerca e in accordo ai "Principi della cura degli animali da laboratorio" (NIH publication no. 80-23, recise 1996).

Coltura di osteoblasti da midollo osseo di ratto

L'esperimento comprendeva le seguenti operazioni:

- Sacrificati i ratti con una dose letale di uretano (1,5 g/Kg).
- Disinfettata la cute degli animali con tintura di iodio.
- Asportato il femore e ripulito sterilmente con l'aiuto di forbici e pinzette sterili in capsula Petri con PBS sterile supplementato di antibiotici 5x.
- Tagliate le epifisi per esporre il canale midollare.
- Riempita una siringa da 20 ml con un ago corto 25G con terreno di coltura α -Minimum Essential Medium (α -MEM)
- Siringato il terreno dentro il canale midollare e raccolto il midollo in un tubo da 50 ml.
- Centrifugato per 10' a 170 xg (860 rpm).
- Risospeso il midollo ed effettuato il conteggio delle cellule.
- Seminate le cellule in piastre multiwells da 12 pozzetti ad una densità pari a 2×10^6 cellule /pozzetto e in multiwells da 24 alla densità di 600.000/pozzetto su vetrino portaoggetto per l'analisi in fluorescenza.
- Utilizzato per la coltura medium α -MEM contenente il 10% di siero fetale bovino, Hepes 20 mM, gentamicina 50 μ g/ml e supplementato con 0,2 mM di Acido Ascorbico e 10 mM di α -glicerofosfato per il differenziamento della linea osteoblastica (metodo Maniatopoulos et al. 1988) (100)
- Cambiato il terreno dopo 5-6 giorni per permettere alle cellule stromali di aderire.
- Una volta aderite il cambio è stato fatto ogni 4 giorni.

- Effettuate le analisi di valutazione del differenziamento osteoblastico dopo 3 settimane.

3.3. Esperimento *in vitro*

Al fine di validare il nostro modello *in vivo*, si è proceduto alla:

1. valutazione del differenziamento osteoblastico in seguito ad esposizione in microgravità simulata per 72 ore del midollo osseo di ratto contenente tra le cellule staminali anche i precursori osteoblastici.
2. valutazione della funzionalità osteoblastica, esponendo a condizioni di microgravità simulata per 9 giorni, osteoblasti già differenziati da midollo di ratto.

Isolamento di cellule staminali mesenchimali da midollo osseo di ratto

L'esperimento ha previsto le seguenti operazioni:

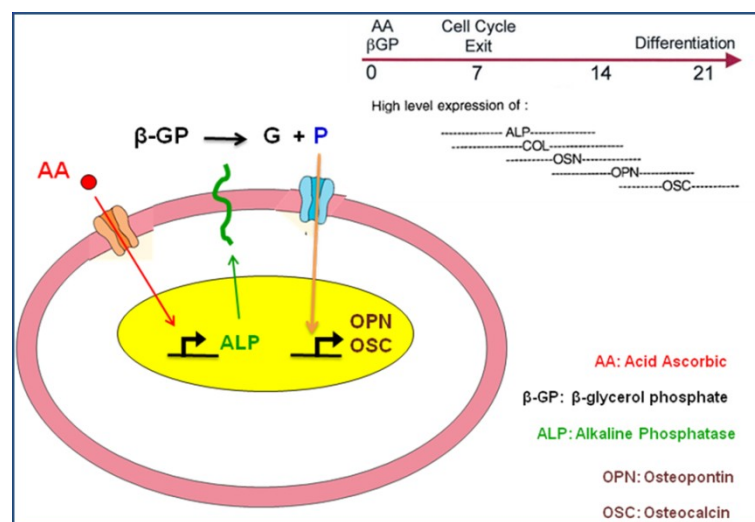
- Sacrificati i ratti con una dose letale di uretano (1,5 g/Kg).
- Disinfettata la cute degli animali con tintura di iodio.
- Asportato il femore e ripulito sterilmente con l'aiuto di forbici e pinzette sterili in capsula Petri con PBS sterile supplementato di antibiotici 5x.
- Tagliate le epifisi per esporre il canale midollare.
- Riempita una siringa da 20 ml con un ago corto 25G con terreno di coltura α Minimum Essential Medium (α MEM)
- Siringato il terreno dentro il canale midollare e raccolto il midollo in un tubo da 50 ml.
- Centrifugato per 10' a 170 xg (860 rpm).
- Risospeso il midollo ed effettuato il conteggio delle cellule.

- Seminate le cellule in piastre multiwells da 12 pozzetti ad una densità pari a 2×10^6 cellule /pozzetto.

Induzione al differenziamento osteoblastico

Al fine di indurre il differenziamento delle cellule mesenchimali staminali in osteoblasti maturi si è utilizzata una metodica risalente al 1988 messa appunto da Maniopoulos et al. (108) ampiamente validata e tuttora considerata la migliore. Questo metodo prevede l'utilizzo di acido ascorbico e β glicerofosfato quali supplementi al terreno di coltura in grado di indirizzare la cellula verso il differenziamento osteoblastico.

Si è dimostrato che l'acido ascorbico penetra nella cellula attraverso un canale Na^+ -dipendente e, oltre ad essere indispensabile per la idrossilazione in prolina del collagene neoformatosi, promuove l'espressione dell'enzima fosfatasi alcalina, il quale è un marker specifico di differenziamento osteoblastico che viene traslocato in membrana dove idrolizza il β glicerofosfato presente nel mezzo (109). Il β glicerofosfato non è solo fonte di fosfato per la produzione di matrice ossea ma è anche un modulatore positivo di altri geni osteoblastici quali l'osteopontina e l'osteocalcina, come riassunto nello schema seguente:



Il protocollo per il differenziamento ha previsto i seguenti passaggi:

- Utilizzato medium α -MEM contenente il 15% di siero fetale bovino, Hepes 20 mM, gentamicina 50 $\mu\text{g/ml}$ e supplementato con 0,2 mM di Acido Ascorbico e 10 mM di β -glicerofosfato.
- Cambiato il terreno dopo 5-6 giorni per permettere alle cellule stromali di aderire.
- Una volta aderite il cambio è stato fatto ogni 4 giorni.
- Effettuate le analisi di valutazione del differenziamento osteoblastico dopo 3 settimane.

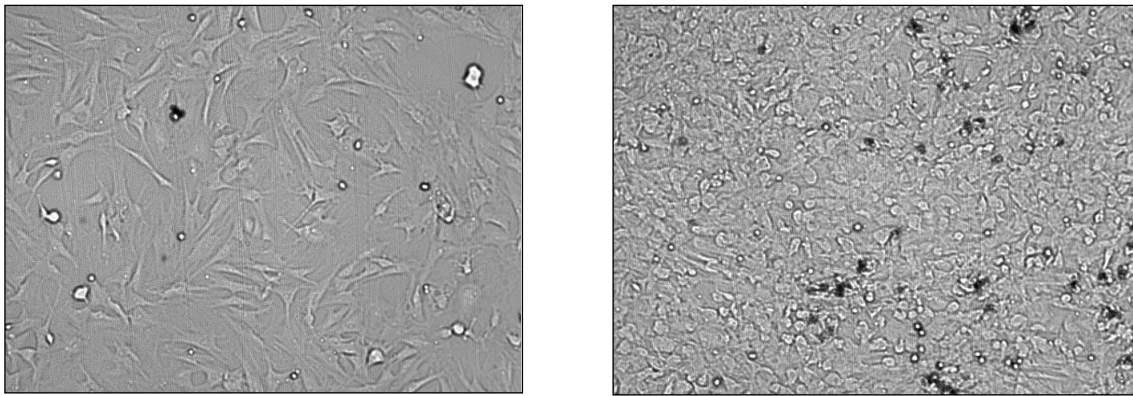


Fig.4: Immagini ottenute al microscopio a contrasto di fase, con ingrandimento 20x, di una coltura di osteoblasti a A) 8 giorni dall'espianto e B) 21 giorni dall'espianto.

3.4 Tecniche di indagine

3.4.1 Dosaggio dell'attività della fosfatasi alcalina

La determinazione dell'attività della fosfatasi alcalina è stata compiuta utilizzando un kit diagnostico fluorimetrico e uno spettrofotometrico a raggi UV (TECAN). In questo metodo fluorimetrico abbiamo usato come substrato il 4-methylumbelliferyl-phosphate. Quest'ultimo è idrolizzato dall'enzima in un prodotto fluorescente, il 4-methylumbelliferone (4-MU). Il prodotto del

clivaggio (4-methylumbelliferone) è intensamente fluorescente a pH 10.3, con un'eccitazione massima a 364 nm e un'emissione di fluorescenza massima a 448 nm.

La metodica ha previsto:

- Le cellule sono state lavate 2 volte con PBSO
- Raccolte in 200 μ l di buffer di lisi/well contenente 1% di Triton X-100, 150 mM NaCl e Tris 50mM pH 10.3.
- Aliquote di 20 μ l di lisato vengono trasferite nelle multiwell da 96 pozzetti.
- Incubate con 12 μ g di substrato.
- L'intensità della fluorescenza viene misurata con il fluorimetro (TECAN).
- La relazione tra l'intensità della fluorescenza e la concentrazione di 4-MUP è stata valutata con una retta di calibrazione, ottenuta attraverso misurazioni di differenti concentrazioni note di 4-MU.
- L'attività enzimatica è stata normalizzata alla concentrazione totale di proteine. La quantità di proteina presente è stata valutata con il metodo Bradford. L'attività dell' ALP è espressa in mM / μ g di proteine totali. Per l'elaborazione statistica è stato effettuato il T-test utilizzando il software Sigma Stat.

3.4.2 Colorazione istologica dei noduli di mineralizzazione

La sintesi di matrice mineralizzata è stata analizzata con il metodo istochimico Alizarin Red (AR-S), specifico per la deposizione di calcio. Ciascuna molecola di colorante AR-S lega 2 molecole di Ca^{++} . Oltre alla visualizzazione dei noduli formati, questa tecnica ci ha permesso di effettuare un'analisi colorimetrica quantitativa basata sulla solubilizzazione della matrice colorata in rosso.

Metodica:

- Lavate le cellule 3 volte con PBSO
- Fissate con 3,7% di formaldeide per 30 min a 4°C
- Lavate 2 volte con H₂O distillata
- Colorate con 40 mM Alizarin Red (pH 4.1–4.3) per 10 min.
- Lavato il monostrato con H₂O distillata
- Osservati e fotografati al microscopio (ingrandimento 20x) i noduli di mineralizzazione.
- Solubilizzata la matrice con 10% di (w/v) cetylpyridinium chloride (CPC) in 10 mM di PBSO
- Lettura della densità ottica della soluzione a 550 nm allo spettrofotometro.

La concentrazione di calcio presente nella matrice è stata calcolata mediante interpolazione delle assorbanze su una curva di calibrazione ottenuta con concentrazioni note di Alizarin Red. La deposizione di calcio è stata normalizzata al totale delle proteine ed espressa come μg di AR-S/ μg proteine. Per l'elaborazione statistica è stato effettuato il T-test utilizzando il software Sigma Stat.

3.4.3 Analisi in fluorescenza della morfologia cellulare e dei microfilamenti di actina

Camere di coltura: OPTICELL

L'analisi morfologica degli osteoblasti e la marcatura dei filamenti di actina in fluorescenza è stata eseguita sfruttando le speciali camerette di coltura OptiCell (Nunc).



Ogni unità è costituita da due membrane trasparenti gas permeabili di polistirene incollate su un telaio di resina, ciascuna delle quali ha una superficie di adesione di 50 cm² ed uno spessore di 75µm. La distanza tra le due membrane è di 2 mm e si ottiene così un volume di soli 10 cm³. Le singole camere presentano lateralmente due fori chiusi da membrane e da valvole che ne permettono il caricamento mediante una siringa e un apposito ago.

La struttura, il ridotto volume e la tenuta stagna rendono queste camere di coltura ideali per l'esposizione delle cellule alla microgravità in clinostato, che richiede come requisito fondamentale il completo riempimento dei compartimenti. Le loro membrane molto sottili, dotate di una rifrangenza simile al vetro e non assorbenti i raggi UV, le rendono inoltre ideali per le metodiche in fluorescenza. Inoltre è possibile tagliare le unità in più parti e le singole parti possono essere utilizzare per diverse metodiche d'indagine.

Marcatura del network di β -tubulina:

- Fissaggio in paraformaldeide al 4% per 30 minuti a 4°C.
- Lavaggio in PBSO 3 volte per 10 minuti (PBSO è PBS senza Ca^{++} e Mg^{++}).
- Permeabilizzazione in PBSO/Triton-X100 0.1% per 3 minuti a temperatura ambiente.
- Lavaggio in PBSO per 10 minuti
- Incubazione in PBSO-BSA 3% (Albumina Serica Bovina) per 30 minuti a temperatura ambiente. Incubazione con l'anticorpo primario (monoclonale Anti- β -tubulina, isotipo IgG1 mouse, clone TUB 2.1, SIGMA) 1:100 in PBSO per 1 h in camera umida a temperatura ambiente.
- Lavaggio in PBSO-BSA 3% per 10 minuti.
- Lavaggio 2 volte in PBSO, 10 minuti per lavaggio.
- Incubazione con l'anticorpo secondario (Anti-mouse IgG Fc specifico, SIGMA) coniugato con Fluoresceina Isotiocinato (FITC) per 45 minuti, 1:100 in camera umida a 37°C e al buio
- Lavaggio 3 volte con PBSO, 10 minuti per lavaggio.
- Lavaggio 2 volte con H_2O .
- Montaggio dei vetrini con ProLong Gold antifade (Invitrogen)

Marcatura dei filamenti di actina

- Fissaggio in Paraformaldeide 4% per 30 minuti a 4°C
- Lavaggio in PBSO 3 volte per 10 minuti
- Permeabilizzazione in PBSO/Triton-X100 0.1% per 3 minuti a temperatura ambiente.
- Lavaggio in PBSO per 10 minuti.
- Incubazione in PBSO-BSA 3% (Albumina Serica Bovina) per 30 minuti a temperatura ambiente.
- Incubazione con phalloidina coniugata con Tetrametil Rodamina (TRIC), diluita 1:1000 con PBS per 6 minuti in camera umida a temperatura ambiente.
- Lavaggio in PBSO-BSA 3% per 10 minuti.
- Lavaggio 2 volte in PBSO, 10 minuti per lavaggio.
- Lavaggio 2 volte con H₂O.
- Montaggio dei vetrini con ProLong Gold antifade (Invitrogen)

3.4.4 Analisi dei campioni

L'osservazione del network dei microtubuli e dell'actina è stata effettuata mediante microscopio rovesciato in fluorescenza (Olympus) ad immersione e ingrandimento 20X. I dati sono stati acquisiti mediante videocamera F View II Image con sensore CCD (2/3") e 1376x1032 a 8 bit di risoluzione, accoppiata col software "Analysis" (Soft Imaging System GmbH-Olympus).

L'area cellulare è stata calcolata con il software Image J e la distribuzione d'aria è stata ottenuta con il software MYSTAT.

2° PARTE

STUDIO IN VIVO E IN VITRO DELLA FAGOCITOSI IN CONDIZIONI DI MICROGRAVITÀ SIMULATA E NELL'ANZIANO.

3.5 Reclutamento dei soggetti

Sono stati reclutati in totale 9 soggetti anziani maschi (età compresa tra i 64 e i 96 anni) residenti nella provincia di Sassari, suddivisi in due gruppi di età:

- Medio Anziani: 5 soggetti in buono stato di salute di età compresa tra i 64 e gli 86 anni.
- Nonagenari: 4 soggetti in buono stato di salute di età compresa tra gli 89 e i 96 anni.

Per il reclutamento si son raccolte tutte le possibili informazioni riguardo le condizioni di salute, visionando le più recenti analisi cliniche, e lo stile di vita di ognuno di loro. Tutti i soggetti anziani perciò rispettano i canoni imposti dal Senieur Protocol (110,111) per gli studi gerontologici e cioè:

- Assenza di infezioni o infiammazioni da almeno 6 settimane
- Assenza di tumori in tutto l'arco della vita
- Assenza di vaccinazioni nelle 6 settimane precedenti i prelievi
- Assenza di altre condizioni che possono influenzare il sistema immunitario come malnutrizione, abuso di alcool e droghe
- Non assunzione di farmaci che possano influenzare il sistema immunitario
- Assenza di diabete

Il gruppo di controllo utilizzato è invece composto da 5 soggetti giovani, anch'essi maschi, tra i 20 e i 33 anni.

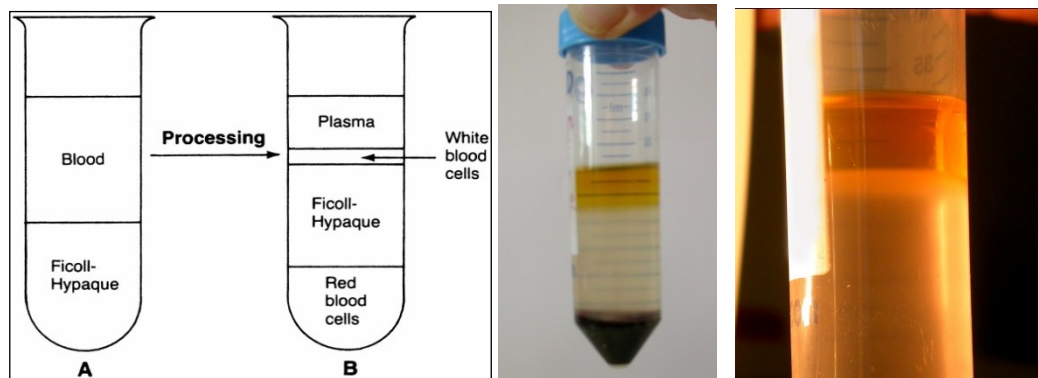
I ratti utilizzati erano maschi, di età giovane e sani, albini Wistar di peso compreso tra 200 e i 250 grammi sottoposti a microgravità simulata per 5 giorni.

3.6 Separazione dei PBMCs da sangue periferico

I Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) sono stati separati mediante gradiente di densità secondo la metodica di Böyum (112,113). Nel caso dei giovani son state usate sacche di buffy coat di 45 ml in media per l'isolamento di linfociti da PBMCs o 50 ml di sangue intero, in vacuum tainer contenenti EDTA, per l'isolamento dei monocito-macrofagi. Nel caso degli anziani si è lavorato con quantità inferiori, circa 10 ml di sangue periferico. Nel caso dei ratti si son recuperati circa 6 ml di sangue mediante iniezione intracardiaca. La procedura utilizzata per la separazione è la seguente:

- trasferito sangue dalla sacca in un provettone da 50 ml
- in caso di buffy coat diluito 1:10 con sali di Hanks molto delicatamente in flask da 75 cm²
- stratificati 30 ml di sangue su 20 ml di histopaque per ogni provettone da 50 ml
- centrifugato a 400 g (1350 rpm), 700 g nel caso del sangue proveniente da ratti (1800 rpm), per 30' a temperatura ambiente
- recuperati gli anelli di linfo-monociti (PBMCs, peripheral blood mononuclear cells)
- portati tutti a volume di 50 ml con sali di hanks

- centrifugati a 250 g (1150 rpm) per 10'
- eliminato il surnatante e risospeso il pellet in 40 ml di sali di hanks
- centrifugati a 250 g per 10'
- risospeso il pellet con 10 ml di soluzione lisante i globuli rossi (ACT: ammonium chloride solution tris-buffered) e incubato 10' a temperatura ambiente
- portato a 40 ml con sali di hanks
- centrifugato a 250 g per 10' e riuniti i pellet (2 per ciascun provettone)
- ripetere 3 volte riunendo di volta in volta le sospensioni cellulari fino ad avere un unico provettone
- risospendere in 30 ml medium di coltura RPMI 1640 contenente 40 mm di Hepes e 5 mg/l di gentamicina
- contare le cellule mediante metodo trypan blue: si ottengono dai 7 ai 10⁵ cellule PBMCs / ml di sangue.



3.7 Isolamento di monociti da PBMCs e valutazione del differenziamento in macrofagi.

I PBMCs così ottenuti son stati messi in coltura su multiwell da 24 ($2 \cdot 10^6$ cellule/pozzetto) in presenza di vetrino o su speciali camere di coltura, chambers slide, adatte per l'incubazione in RPM. La porzione aderente di cellule è costituita per circa il 95 % da monociti. Dopo 24 h si eliminata delicatamente mediante lavaggi con PBS la porzione di cellule non aderente costituita per lo più da linfociti. Vengono eseguiti lavaggi ogni 2 giorni al fine di evitare che i macrofagi ottenuti dal differenziamento dei monociti fagocitino eventuali detritti cellulari rimasti. Al 7° e 9° giorno son stati eseguiti saggi di fagocitosi come segue:

- incubazione (50 particelle/macrofago) di *Zimosan*, *Saccharomyces Cerevisae* coniugato col fluorocromo FITC per macrofago per 2 h a 37°C.
- Rimozione del *Zimosan* non fagocitato mediante lavaggi con PBS
- Fissazione dei campioni con paraformaldeide 4% per 30 min a 4 °C
- Lavaggio in PBSO 3 volte per 10 minuti
- Incubazione in PBSO-BSA 3% (Albumina Serica Bovina) per 30 minuti a temperatura ambiente.
- Incubazione con phalloidina coniugata con Tetrametil Rodamina (TRIC) e DAPI diluiti 1:1000 con PBS per 6 minuti in camera umida a temperatura ambiente.
- Lavaggio 2 volte in PBSO, 10 minuti per lavaggio.
- Lavaggio 2 volte con H₂O.
- Montaggio dei vetrini con ProLong Gold antifade (Invitrogen)
- Conta del numero di macrofagi che presentano interazione o fagocitosi su una media di 100 per vetrino

3.8 Isolamento di linfociti T da PBMCs e induzione di apoptosi per senescenza cellulare

Per isolare i linfociti T si usano colonne a selezione negativa che permettono di legare e trattenere all'interno della resina :

- i linfociti b mediante il legame tra la porzione Fab degli anticorpi presenti sulla superficie di tali cellule e beads di vetro coatate con anti-Ig;
- i monociti mediante il legame tra la porzione Fc degli anticorpi presenti sulla superficie di tali cellule e beads di vetro coatate con Ig.

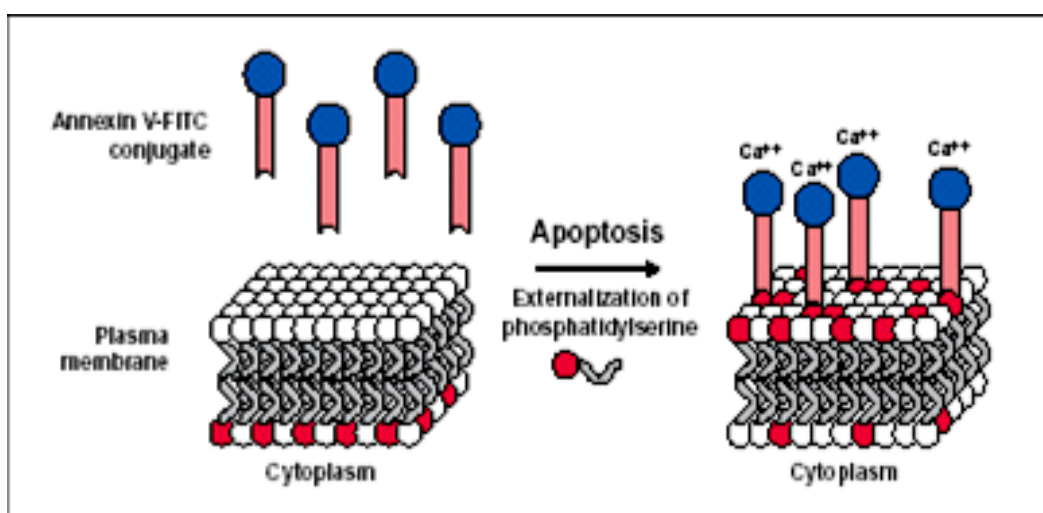
Le colonne assicurano un recupero e quindi una resa di linfociti T nel eluato del 32-40% rispetto al PBMCs caricato.

I linfociti così ottenuti son stati messi in coltura per 8 giorni al fine di indurre in esse l'apoptosi per naturale processo di senescenza cellulare.

La valutazione del grado di apoptosi e della proporzione di queste in fase iniziale o tardiva è stato ottenuto mediante saggi di binding alla Annessina V e saggi di frammentazione del DNA.

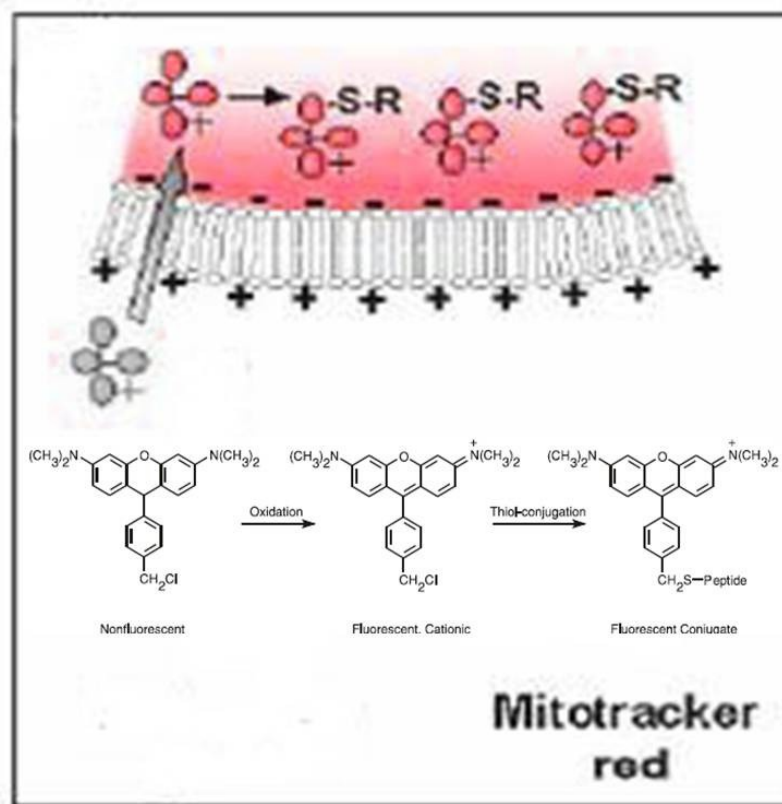
3.9 Determinazione della traslocazione della fosfatidilserina mediante marcatura con Annessina V / MitoTracker Red

L'uso dell'Annessina V consente di investigare la presenza di cellule apoptotiche presenti in una coltura cellulare in quanto essa tende a legare, e quindi a rendere visibile, un particolare fosfolipide di membrana con carica negativa, la fosfatidilserina (fig.3). Quest'ultima è fisiologicamente rivolta verso il citoplasma, poiché è sottoposta ad un controllo molto severo da parte del traslocatore Flippasi, e solo in caso di eventi apoptotici tale controllo viene perso, cosicché si può trovare esposta su entrambe i lati della membrana plasmatica. Questo meccanismo risulta essere una manifestazione molto precoce dell'apoptosi e la sua indagine permette, dunque, di distinguere cellule apoptotiche in fase iniziale.



L'annexina V, anticoagulante umano, è un fosfolipide con peso molecolare di 35-36 kD Ca^{2+} -dipendente che possiede un'alta affinità per la fosfatidilserina. Nel kit da noi utilizzato, l'annexina V è coniugata con il fluorocromo Alexa 488.

Inoltre abbiamo utilizzato il colorante MitoTracker Red in grado di evidenziare lo stato del potenziale di membrana del mitocondrio della cellula in esame. Questo colorante, in forma ridotta e non fluorescente, diffonde liberamente attraverso la membrane cellulare e la membrana esterna dei mitocondri, per poi essere ossidato in un composto fluorescente nella matrice dei mitocondri attivi, quindi delle cellule vitali, dove si accumula per legame covalente dei suoi gruppi cloro metilici con i gruppi tiolici delle proteine mitocondriali..



Le cellule apoptotiche, nell'analisi tramite il microscopio in fluorescenza, mostreranno una forte fluorescenza verde della Annessina V e una bassa emissione rossa del Mito Tracker; mentre le cellule vitali evidenzieranno una bassa fluorescenza verde e una forte fluorescenza rossa.

Protocollo usato per i nostri esperimenti:

Dopo trattamento dei campioni alle varie condizioni sperimentali, per il saggio di traslocazione della fosfatidilserina si è utilizzato un kit fornito dalla Invitrogen e si è lavorato come segue:

- Portare i campioni alla concentrazione di $5 \cdot 10^6$ /ml di terreno di coltura
- Preparare il buffer 1X annexin-binding a partire dal buffer 5X annexin-binding (50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5 mM CaCl₂, pH 7.4).
- Preparare la soluzione stock 10 mM di Mito Tracker Red dye
- Preparare la working solution 10 μ M, pipettando 1 μ l della precedente soluzione in 1 ml di terreno.
- Aggiungere 4 μ l della soluzione così preparata a ciascun campione di 1 ml e lasciare ad incubare per 30 minuti a 37° C.
- Lavare in PBS una volta centrifugando a 300 g, risospendere i campioni in 100 μ l del buffer 1X annexin-binding e aggiungere 5 μ l di Alexa Fluor 488 annessina V.
- Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti.
- Dopo l'incubazione aggiungere 400 μ l di 1X annexin-binding agitando leggermente e mettere i campioni in ghiaccio.
- Analizzare i campioni nel minor tempo possibile.

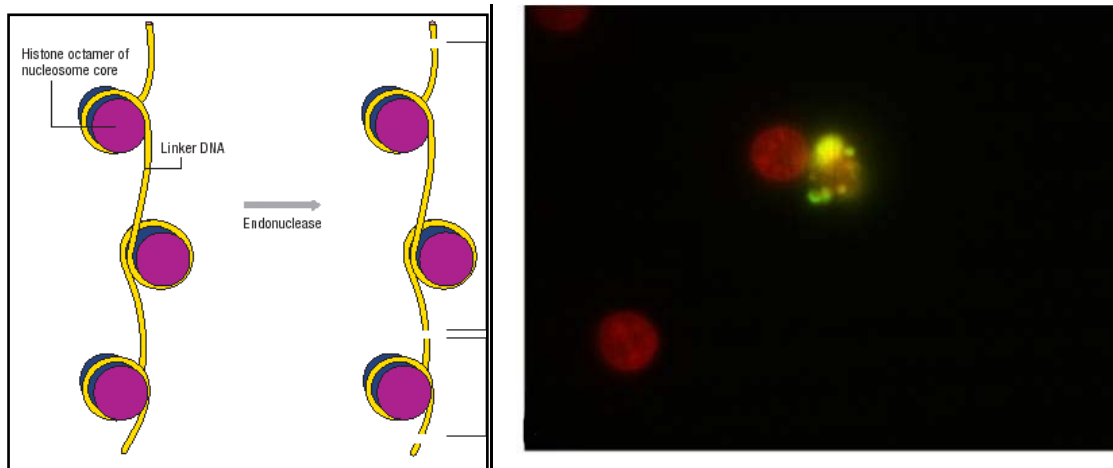
L'osservazione è stata eseguita con microscopio rovesciato a fluorescenza Olympus Italia, con obiettivo 20x utilizzando i seguenti filtri:

- Annessina V coniugata con Alexa 488 : Ex. 494 nm, Em. 517 nm
- Mito Tracker Red: Ex. 579 nm, Em. 599 nm

Le immagini sono state catturate con telecamera CCD-BN raffreddata e analizzate con il software Analysis.

3.10 TUNEL assay

La metodica TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling) consente di evidenziare un importante processo tardivo del processo apoptotico: la presenza di frammenti di DNA, prodotti dalle endonucleasi attivate dalle caspasi (fig.5). Infatti tale metodica si basa sul fatto che le terminazioni 3'-OH che si formano in seguito alla frammentazione del DNA possono essere utilizzate come substrato per la "Terminal deossinucleotidil Transferasi" o TdT. Questo enzima catalizza l'aggiunta di deossiribonucleotidi (dUTP) e nel nostro caso di Br-dUTP (5-bromo-2'-deossiuridina-5'-trifosfato) quale analogo della Timidina all'estremità 3'-OH dei frammenti di DNA in modo indipendente dallo stampo. Le cellule sono poi incubate con anti-BrdU marcata con FITC (isotiocianato di fluoresceina). Il DNA totale, sia delle cellule vive che di quelle apoptotiche, viene marcato tramite incubazione con Ioduro di Propidio e l'RNA delle cellule viene digerito con una soluzione contenente RNase A, questo perché lo Ioduro di Propidio è in grado di legare sia il DNA che RNA. Si analizza poi con microscopio in fluorescenza utilizzando gli opportuni filtri come nell'esempio in fig.6. Questa metodica consente la visualizzazione della frammentazione del DNA a livello di singole cellule.



Protocollo usato per i nostri esperimenti

Dopo trattamento dei campioni alle varie condizioni sperimentali, per il saggio TUNEL si è utilizzato un kit fornito dalla Invitrogen e si è lavorato come segue:

Primo giorno

Per ogni punto sperimentale:

- Sospendere $2 \cdot 10^6$ cellule in 0.5 ml di PBS
- Un controllo positivo è costituito da Jurkat trattate con Camptotecina 10 μM
- Aggiungere 5 ml di paraformaldeide al 4% per 30 minuti a 4°C
- Si eseguono poi 2 lavaggi in PBS centrifugando a 300 g
- Aggiungere 5 ml di etanolo al 70% (preventivamente preparato e raffreddato per almeno 30 minuti).
- Conservare i campioni a -20°C per 12/18 h al fine di ottenere un miglior risultato

Secondo giorno

- Centrifugare a 300 g per eliminare l'etanolo al 70%
- Risospendere in 1ml di Wash Buffer
- Lavare 2 volte in PBS centrifugando a 300 g

Si prepara intanto la “DNA labeling solution” (volume totale 50 µl/punto) e contenente:

- 10 µl Reaction Buffer
- 0.75 µl enzima TdT
- 8 µl BrdU
- 31.25 µl acqua distillata

La soluzione è attiva per 24 h.

- Risospendere controlli e campioni con 50 µl/punto per 60 minuti a 37°C, agitando ogni 15 minuti. E' possibile mantenere i campioni in termostato per un massimo di 4 h.
- Dopo l'incubazione effettuare due lavaggi con 1 ml di Rinse Buffer.
- Preparare l'anticorpo anti-BrdU coniugato con Alexa 488 addizionando 5 µl dello stock dell'anticorpo con 95 µl di Rinse Buffer e addizionarne 100 µl/punto e incubazione per 30 minuti in camera oscura.
- Addizionare poi 0.5 ml di Ioduro di Propidio contenente RNasi/punto per una concentrazione finale di 1 µg/mL (1.5 µM) e incubare per 30 minuti in camera oscura.
- Analizzare entro 3 h.

L'osservazione è stata eseguita con microscopio rovesciato a fluorescenza Olympus Italia, con obiettivo 20x utilizzando i seguenti filtri:

- Anti-BrdU coniugato con Alexa 488 : Ex. 494 nm, Em. 517 nm

- Ioduro di Propidio: Ex. 536 nm, Em. 617 nm

Le immagini sono state catturate con telecamera CCD-BN raffreddata e analizzate con il software Analysis.

Analisi quantitativa e statistica

La percentuale di cellule positive al saggio TUNEL e alla Annessina V è stata calcolata su un totale di 500 cellule per punto sperimentale e l'indagine statistica è stata effettuata mediante T test utilizzando SIGMA STAT software considerando una differenza significativa $P < 0,001$ e una differenza altamente significativa $p < 0,0001$.

3.11 Valutazione della capacità di interazione e fagocitosi di linfociti apoptotici in presenza o assenza di Trombospondina

Il saggio di fagocitosi con linfociti apoptotici prevedeva la seguente metodica:

- Dopo 8 giorni di coltura i linfociti, valutati per la percentuale di cellule apoptotiche, son stati marcati col fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) alla diluizione 1:1000 per 10 min
- Eseguiti 3 lavaggi con PBS mediante centrifugazione
- Incubazione dei linfociti marcati con i campioni di macrofagi provenienti da soggetti giovani e anziani alla concentrazione di 50 linfociti /macrofago in presenza o in assenza di Trombospondina alla concentrazione di 5 μg /ml di medium supplementato con l'aggiunta di 1mM di CaCl_2 e 1mM di MgCl_2 per 2 h a 37°C.

- Parallelamente set di macrofagi provenienti da soggetti giovani differenziati nelle camere di coltura chambers slide sono stati incubati sempre in presenza o assenza di trombospondina nel mezzo di interazione per 2h in condizioni di microgravità simulata sulla RPM.
- Eseguiti 3 lavaggi in PBS al fine di eliminare tutti i linfociti che non hanno interagito e non son stati fagocitati.
- fissazione dei campioni con paraformaldeide 4% per 30 min a 4 °C
- Eseguiti 3 lavaggi in PBSO per 10 minuti
- Incubazione in PBSO-BSA 3% (Albumina Serica Bovina) per 30 minuti a temperatura ambiente.
- Incubazione con anticorpo primario monoclonale anti-trombospondina clone TSP-B7 o anticorpo primario monoclonale anti CD18 clone 212701 alle diluizioni rispettivamente di 1:100 e 1:200 per 1h a temperatura ambiente
- Eseguiti 3 lavaggi in PBSO per 10 min
- Incubazione con anticorpo secondario anti-mouse coniugato col fluorocromo FITC alla diluizione 1:100 per 1h a temperatura ambiente
- Incubazione con phalloidina coniugata con Tetrametil Rodamina (TRITC) con PBS per 6 minuti in camera umida a temperatura ambiente.
- Lavaggio 2 volte in PBSO, 10 minuti per lavaggio.
- Lavaggio 2 volte con H₂O.
- Montaggio dei vetrini con ProLong Gold antifade (Invitrogen)
- L'osservazione è stata eseguita con microscopio rovesciato a fluorescenza Olympus Italia, con obiettivo 100x
- Conta del numero di macrofagi che presentano interazione o fagocitosi su una media di 100 macrofagi per vetrino
- Analisi statistica mediante T test utilizzando il software Sigma Stat

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Esperimenti in vivo ed in vitro in condizioni di microgravità simulata sul differenziamento di osteoblasti di ratto.

I risultati ottenuti dimostrano chiaramente che le condizioni di microgravità simulata inibiscono l'attività della fosfatasi alcalina e la deposizione di nuovo tessuto osseo da osteoblasti differenziati da cellule stromali di midollo osseo di ratto. Più precisamente la fosfatasi alcalina appare down-regolata dalla microgravità simulata, con una significativa diminuzione del 54% ($p < 0,05$) nei confronti dei ratti in gabbia (CG) e del 35% ($p < 0,05$) nei confronti dei ratti posti sulla base del RPM (CR) (Fig. 6). La fosfatasi alcalina è un enzima marker del differenziamento osteoblastico. Molteplici sono i ruoli dell'ALP nel processo di mineralizzazione: idrolisi a pH alcalino di esteri di fosfati organici con aumento locale della concentrazione di fosfato facilitante la precipitazione di fosfato di calcio. Questa attività è finalizzata all'iniziazione del processo di calcificazione. L'ALP oltre che sulla membrana esterna è presente (in quantità decisamente superiore) nelle vescicole della matrice ossea, sito iniziale di formazione del cristallo di idrossiapatite.

Anche la deposizione di nuova matrice calcificata risultava drammaticamente diminuita del 95% ($p < 0,0001$) nei campioni provenienti dai ratti sottoposti a microgravità simulata in RPM rispetto ai campioni provenienti da ratti tenuti in gabbia (CG). Tale diminuzione si limitava al 36% ($p < 0,001$) se confrontata con i campioni provenienti da ratti tenuti sulla base del RPM (CR) (Fig. 7).

Dal momento che la fosfatasi alcalina viene considerato come un ottimo marker e come molecola chiave nella regolazione del differenziamento degli osteoblasti, i risultati sopra riportati consentono di dimostrare che la

microgravità inibisce il differenziamento degli osteoblasti provenienti da animali sottoposti a simulate condizioni di microgravità a bordo del RPM.

Negli esperimenti in “vitro”, condotti sul midollo osseo (Fig 11) e sugli osteoblasti (15), è emersa ugualmente sia una riduzione della deposizione della matrice ossea, rispettivamente del 51% e del 60% ($p < 0,005$) sia dell’attività della fosfatasi alcalina, nella coltura di midollo del 68% e negli osteoblasti del 47,8% ($p < 0,005$).

Inoltre la distribuzione dell’area cellulare è notevolmente diminuita nelle cellule provenienti da animali sottoposti a condizioni microgravitazionali in RPM. In entrambi i controlli a 1 x g si è osservato che erano distribuite secondo una popolazione cellulare eterogenea comprendente cellule grandi e cellule piccole, mentre nei campioni provenienti dai ratti tenuti per 72 ore in RPM mostravano una omogenea popolazione di sole cellule piccole.

Inoltre negli esperimenti di immunofluorescenza l’aspetto dei filamenti di F-actina di queste ultime cellule mostrava una netta diminuzione della densità dei biopolimeri filamentosi, a conferma dell’importante ruolo del citoscheletro nella mecano-trasduzione dei segnali provocati dall’alterazione delle condizioni gravitazionali. Cambiamenti abbastanza simili nella distribuzione della actina, ed in modo particolare una netta riduzione delle stress fibers, sono in perfetto accordo con quanto riportato in letteratura relativamente a cellule HUVEC (114) ed a monociti J-111 (115) esposti a condizioni di microgravità.

Nel loro complesso tali risultati confermano quindi quanto riportato sinora in letteratura sugli esperimenti condotti in questi ultimi anni sull’effetto della microgravità sul tessuto osseo. L’originalità dei dati riportati in questa tesi sono però relativi al modello sperimentale utilizzato, e cioè all’utilizzo del ratto a bordo del clinostato tridimensionale RPM. I risultati ottenuti confermano la bontà del modello sperimentale già utilizzato nel Dipartimento di Scienze Fisiologiche, Biochimiche e Cellulari da alcuni anni e conferiscono una

validazione definitiva all'utilizzo del RPM per esperimenti di fisiologia animale "in vivo".

L'evoluzione naturale di questo modello sperimentale sarà il MHOR, una nuova apparecchiatura di recentissima costruzione che consentirà di tenere gli animali (topi o ratti) in clinostato per 15-20 giorni consentendo così anche esperimenti di più lunga durata in assenza di gravità. La fisiologia microgravitazionale simulata potrebbe trarre enormi vantaggi da una facility di questo tipo, anche in considerazione del fatto che fattori economici e la imminente andata in pensione dello shuttle non promettono per il futuro molte possibilità di volo per la realizzazione di esperimenti in condizioni di microgravità reale.

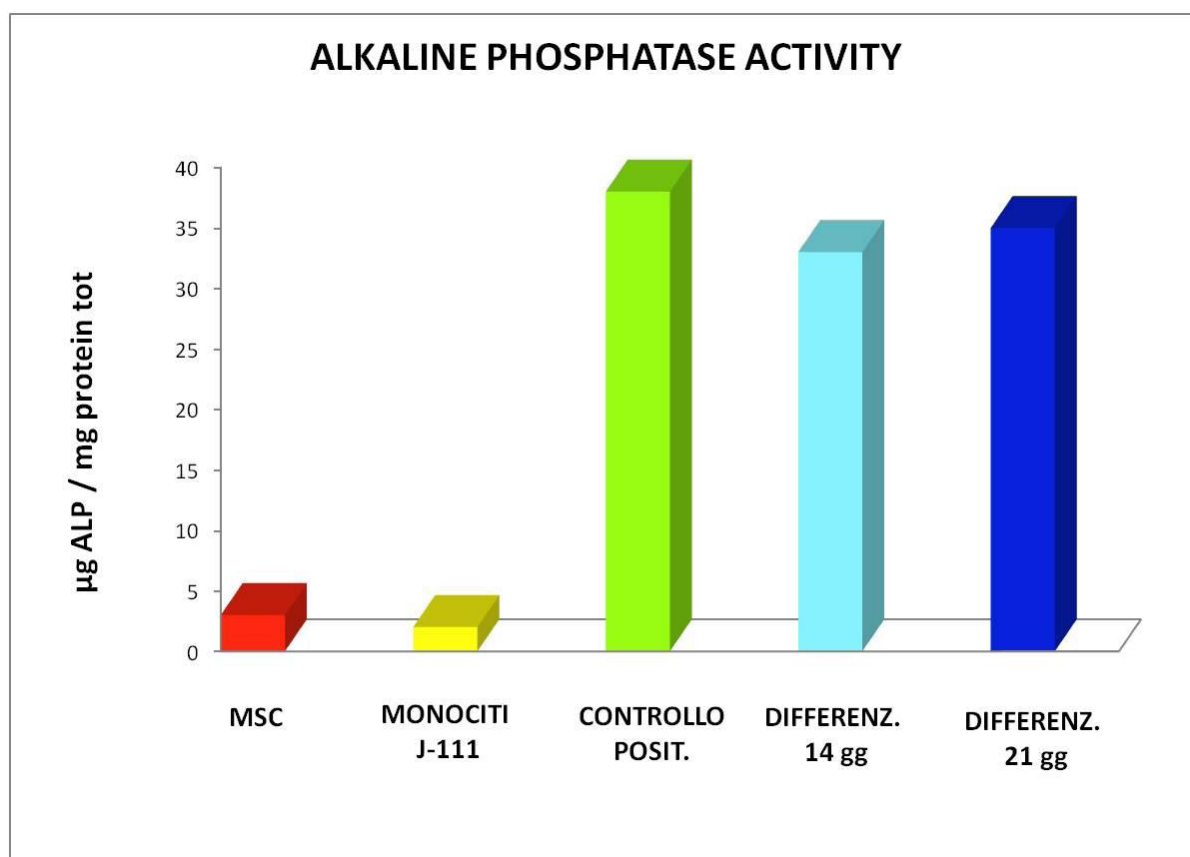


Fig..5: Confronto tra campioni derivati da cellule staminali non indotte al differenziamento e la linea di monociti J-111 quali controlli negativi, un controllo positivo fornito dal kit e 2 campioni ottenuti da cellule staminali di ratto indotte al differenziamento per 14 e 21 giorni.

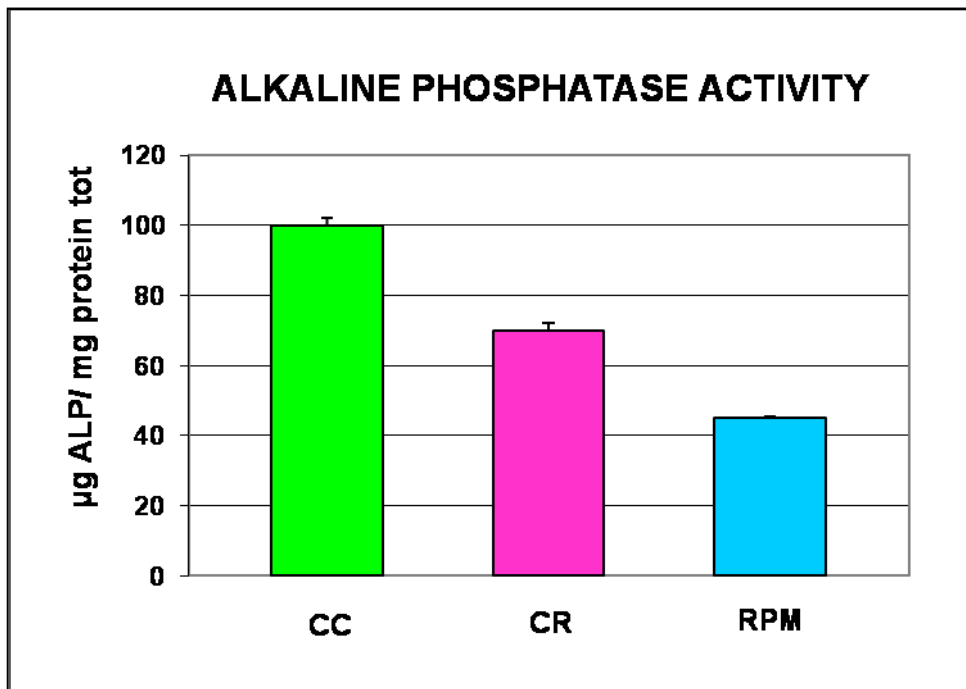


Fig..6: Valutazione dell' attività della Fosfatasi Alcalina (ALP) di osteoblasti derivati da midollo osseo di ratti sottoposti a condizioni di microgravità per 72h in RPM e relativi controlli. I risultati sono espressi in percentuale, rapportati al controllo CC (CC, Control Cage; CR, Control RPM). *RPM vs CR* $p < 0,05$, RPM vs CC* $p < 0,05$*

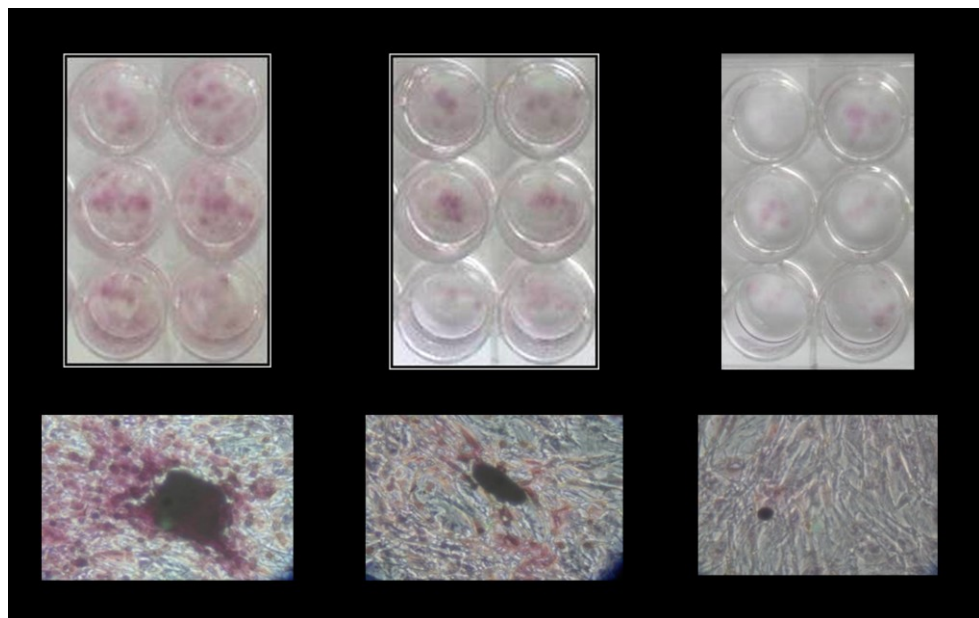
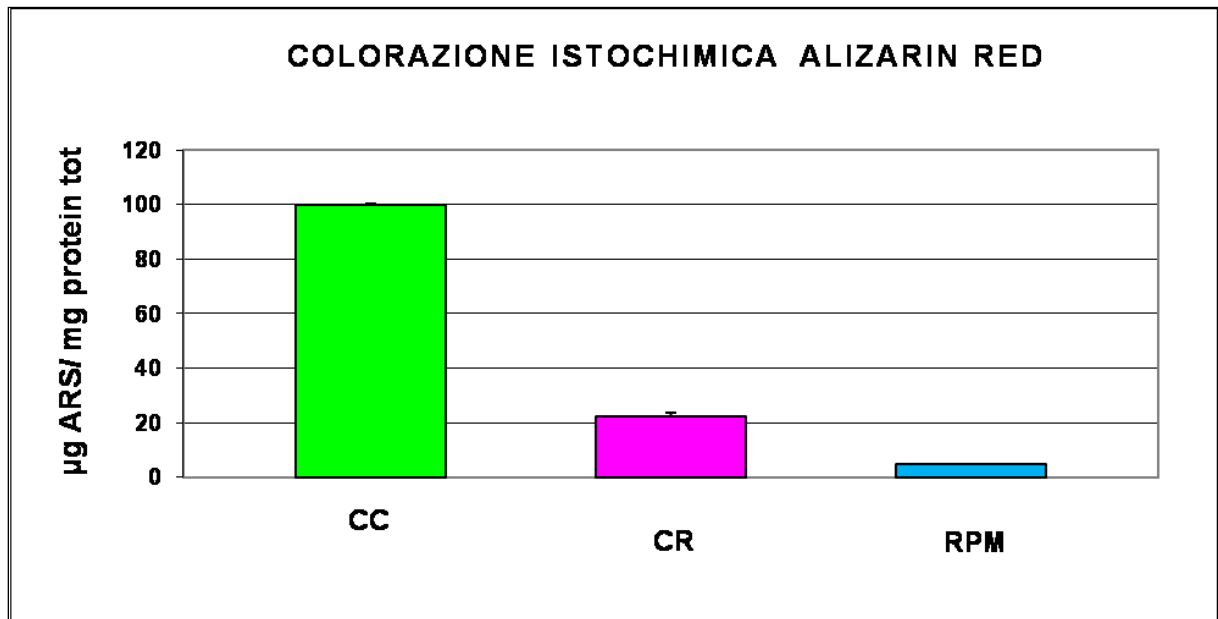


Fig.7: Quantificazione della mineralizzazione della matrice ossea dopo colorazione istochimica con alizarin red (ARS) di osteoblasti derivati da ratti esposti per 72h a condizioni di microgravità simulata in RPM. Il grafico5 mostra il dosaggio colorimetrico dei depositi di calcio nelle 3 condizioni. I risultati sono espressi in percentuale, rapportati al controllo CC (CC, Control Cage; CR, Control RPM; RPM). Le foto 5A,5B,5C e le immagini 5a,5b,5c di microscopia ottica (ingrandimento 20X) mostrano i noduli di mineralizzazione della matrice ossea. *RPM vs CR** $p < 0,001$ RPM vs CC*** $p < 0,0001$*

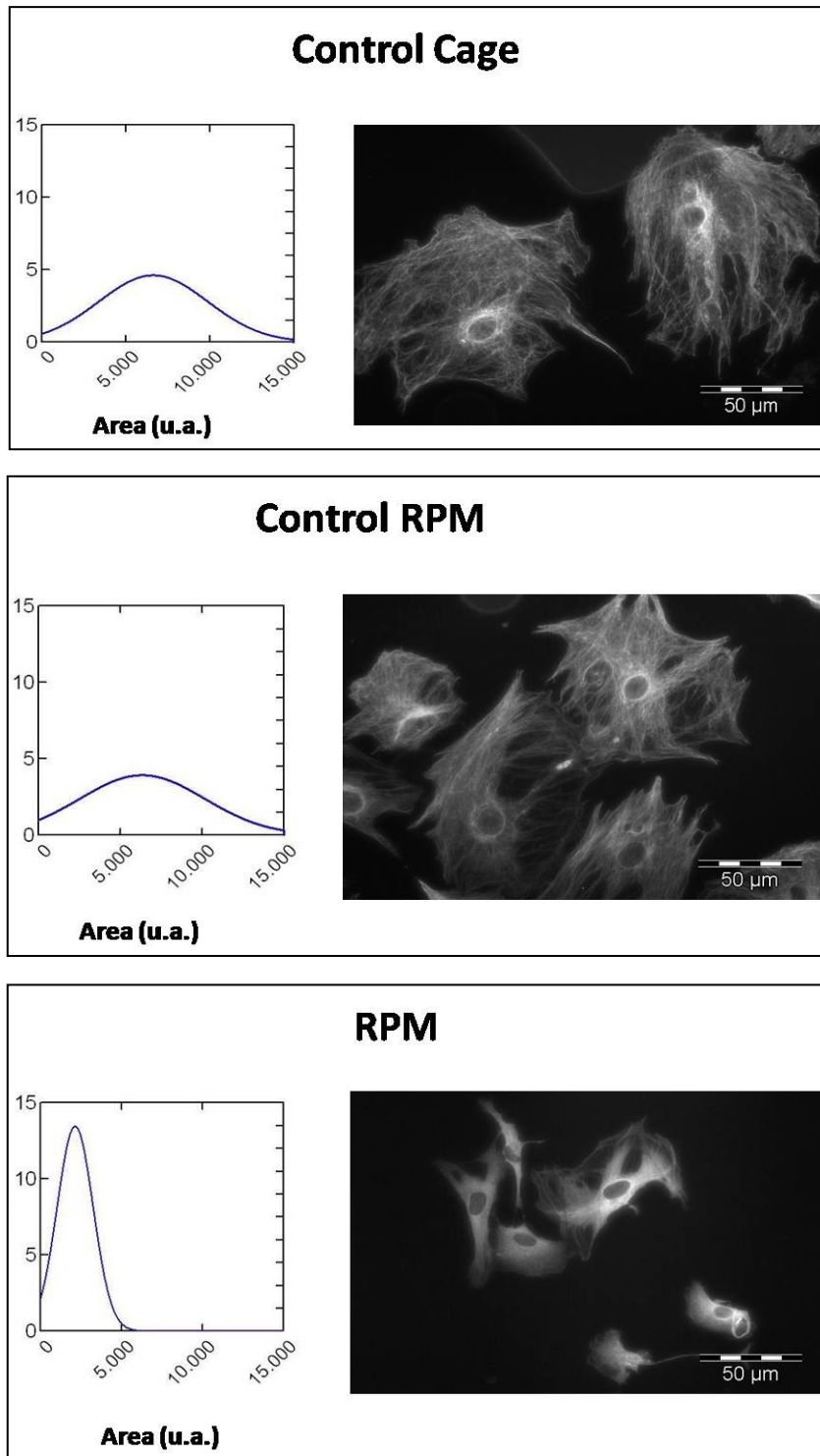


Fig.8: I grafici (4a;4b;4c;) mostrano la distribuzione d'aria, espressa in unità arbitrarie, delle popolazioni di osteoblasti derivati da ratti esposti per 72h a condizioni di microgravità simulata in RPM e relativi controlli (CC, Control Cage; CR, Control RPM), in seguito a immunomarcatura del network di β -tubulina.

RPM vs CR * $p < 0,05$ RPM vs CC * $p < 0,05$

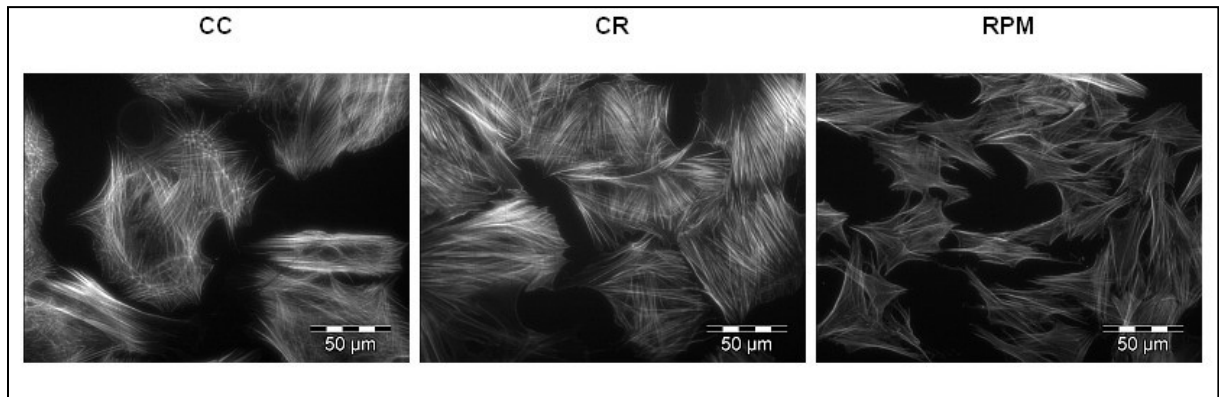


Fig. 9: Marcatura in fluorescenza dei microfilamenti di F-actina di osteoblasti derivati da ratti esposti per 72h a condizioni di microgravità simulata in RPM e relativi controlli (CC, Control Cage; CR, Control RPM).

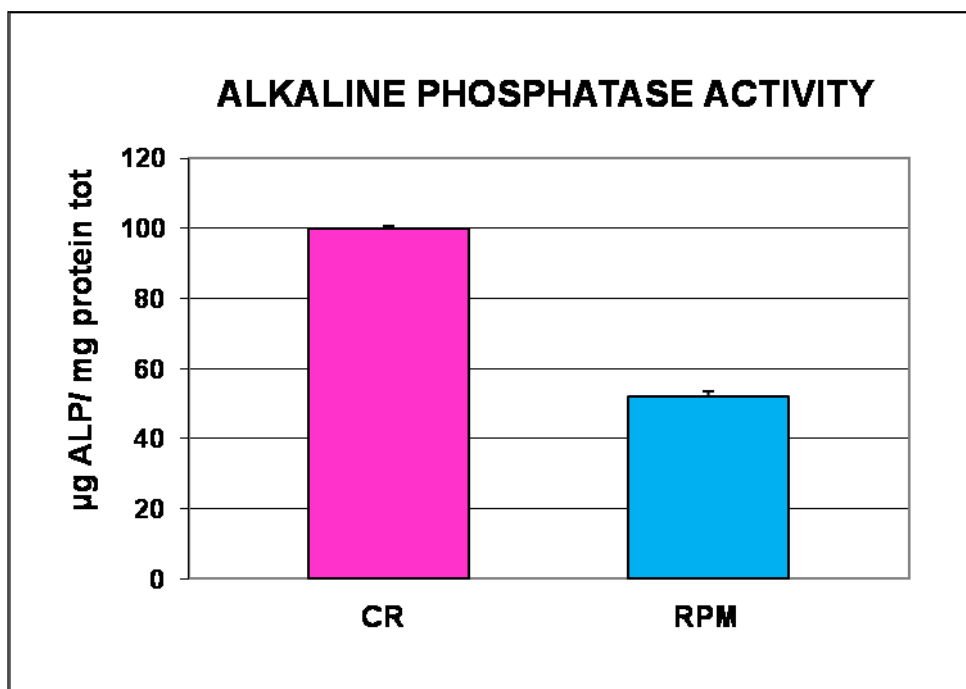


Fig. 10: Valutazione dell' attività della Fosfatasi Alcalina (ALP) di osteoblasti differenziati da midollo osseo sottoposto per 72h a condizioni di microgravità simulata in RPM.

RPM vs CR* $p < 0,05$

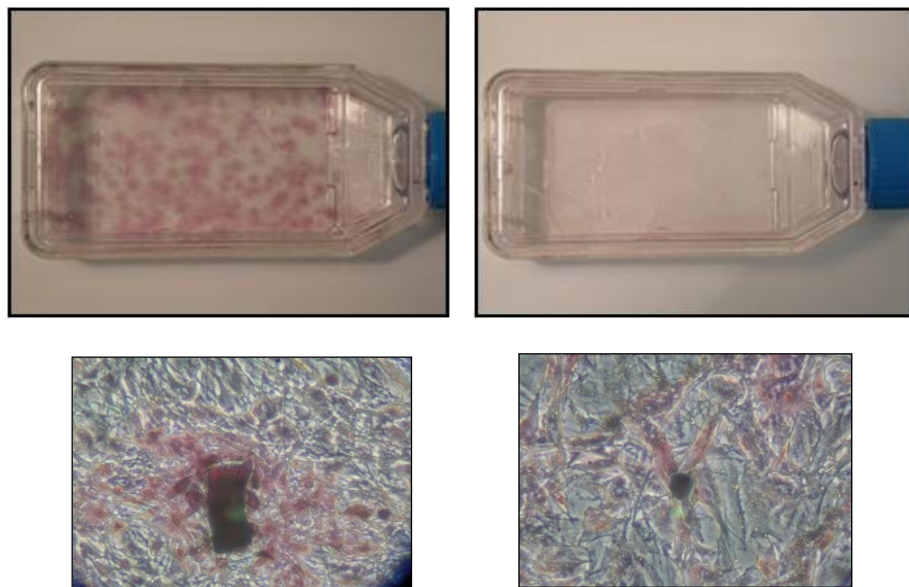
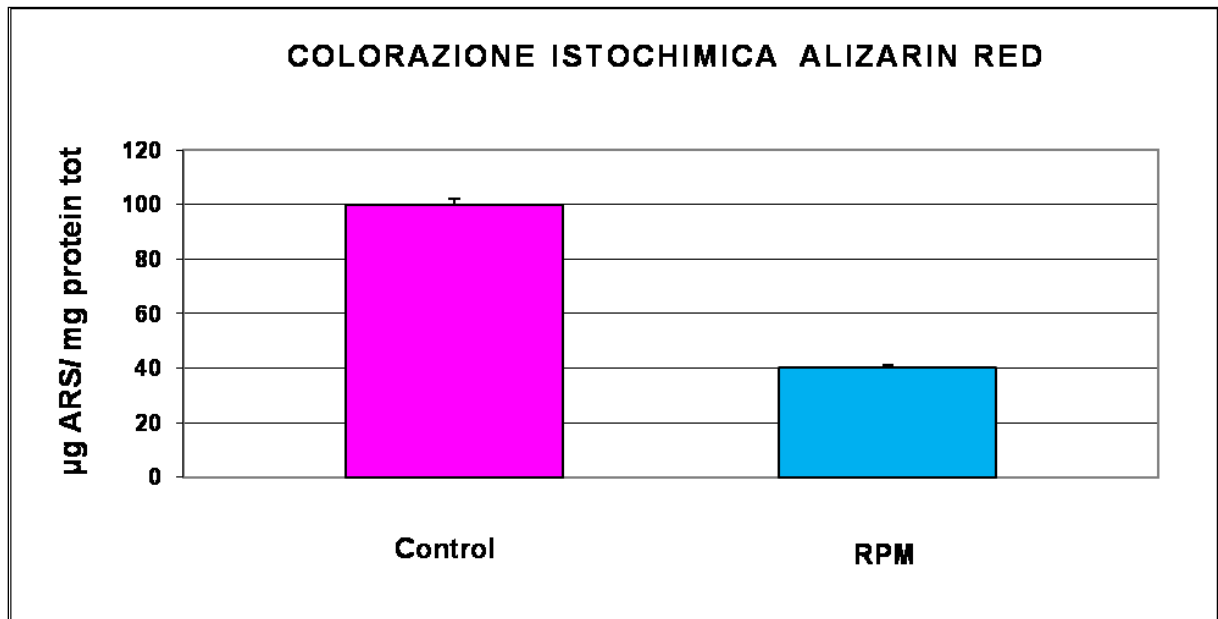


Fig.. 11: Quantificazione della mineralizzazione della matrice ossea dopo colorazione istochimica con alizarin red (ARS) di osteoblasti differenziati da midollo osseo esposto per 72h a condizioni di microgravità simulata in RPM.

Il grafico(3) mostra il dosaggio colorimetrico dei depositi di calcio nelle 3 condizioni (CC, Control Cage; CR, Control RPM; RPM).

Le foto(3A;3B;3C;) e le immagini(3a;3b;3c;) di microscopia ottica (ingrandimento 20X) mostrano i noduli di mineralizzazione della matrice ossea.

*RPM vs CR** $p < 0,001$*

*RPM vs CC*** $p < 0,0001$*

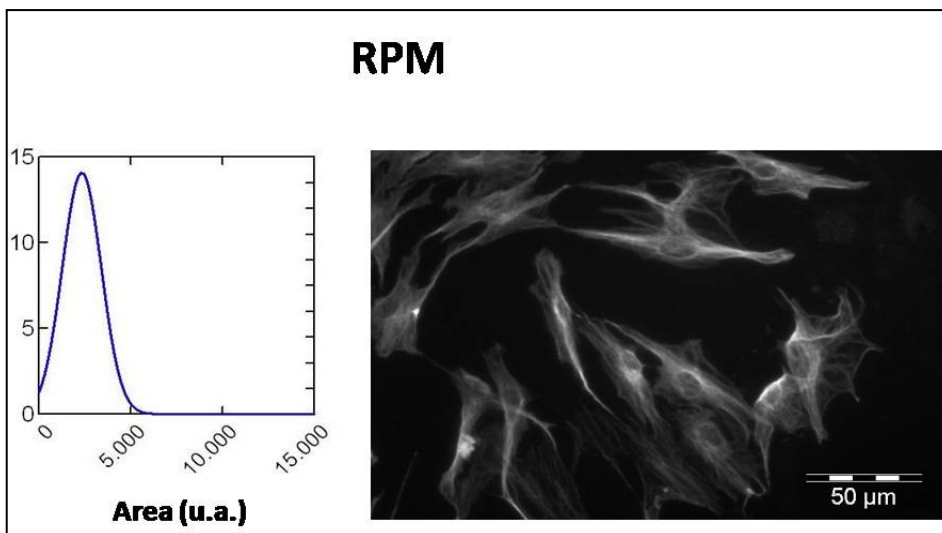
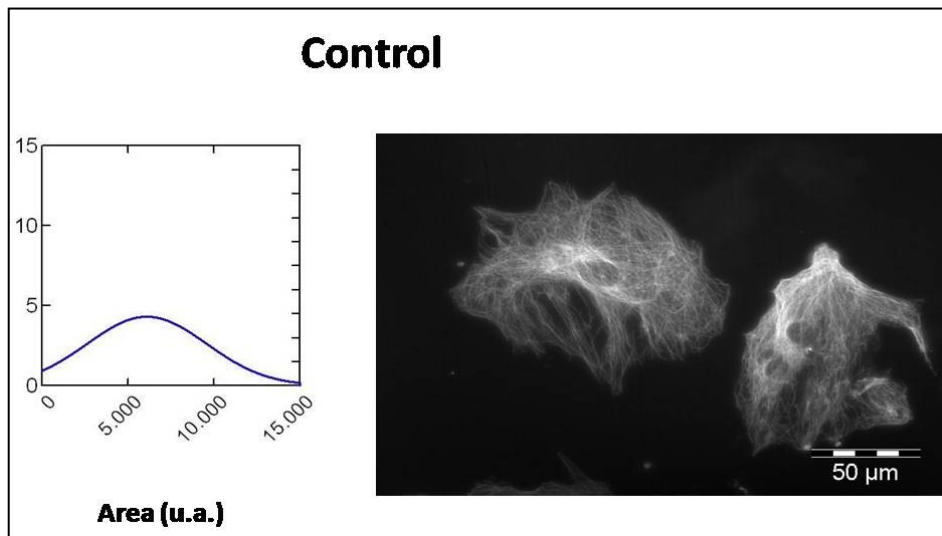


Fig. 12: I grafici (8a;8b;) mostrano la distribuzione d'aria, espressa in unità arbitrarie, delle popolazioni di osteoblasti differenziati da midollo osseo sottoposto per 72h a condizioni di microgravità simulata in RPM, in seguito a immunomarcatura del network di β -tubulina.
RPM vs CR $p < 0,05$*

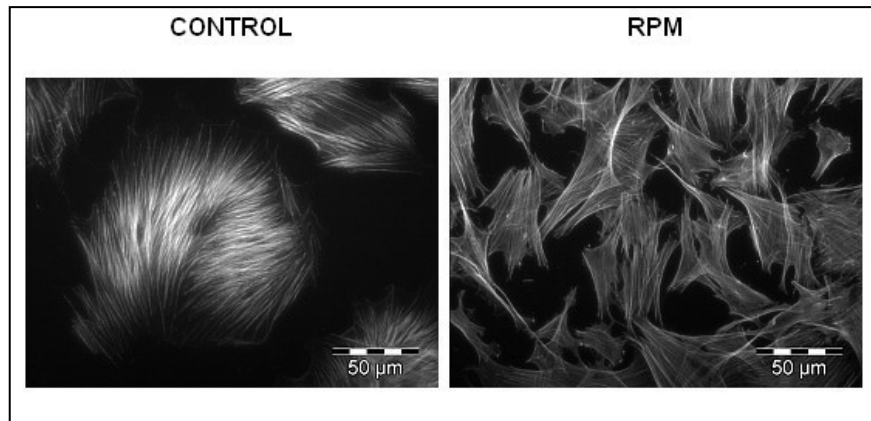


Fig. 13: Marcatura in fluorescenza dei microfilamenti di F-actina di osteoblasti differenziati da midollo osseo sottoposto per 72h a condizioni di microgravità simulata in RPM.

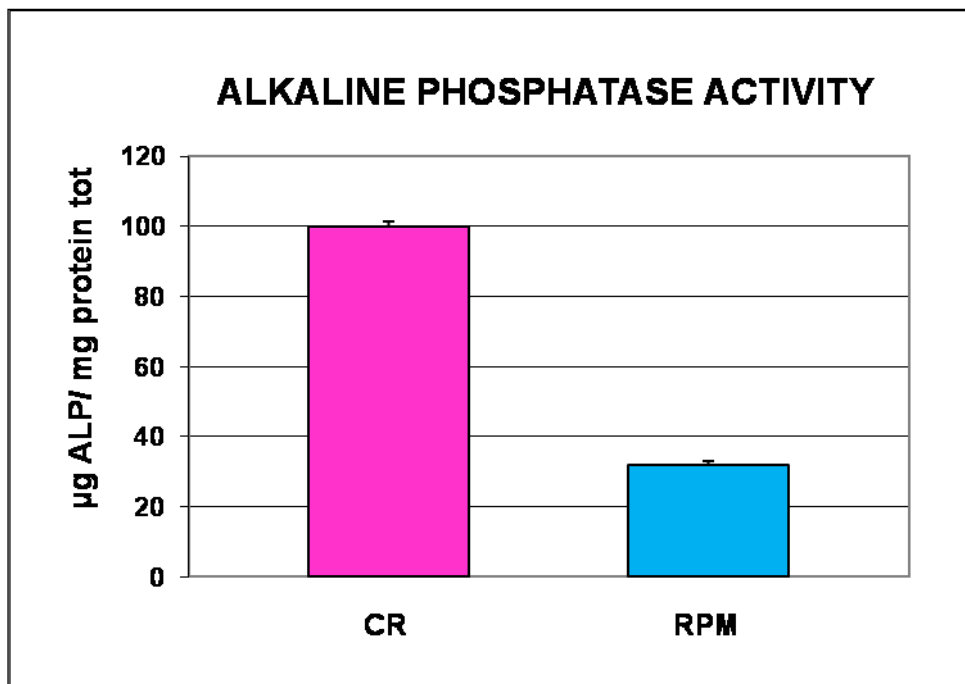


Fig. 14: Valutazione dell'attività della Fosfatasi Alcalina (ALP) di osteoblasti sottoposti per 9 giorni a condizioni di microgravità simulata in RPM.
RPM vs CR p < 0,05*

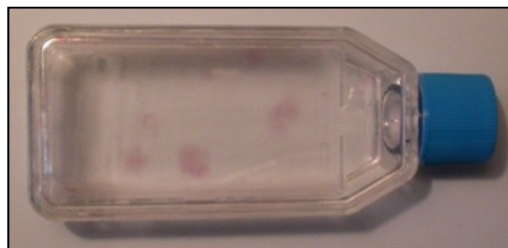
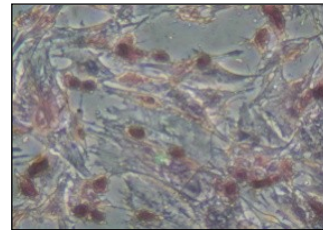
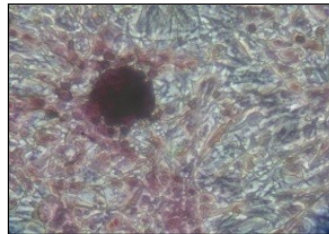
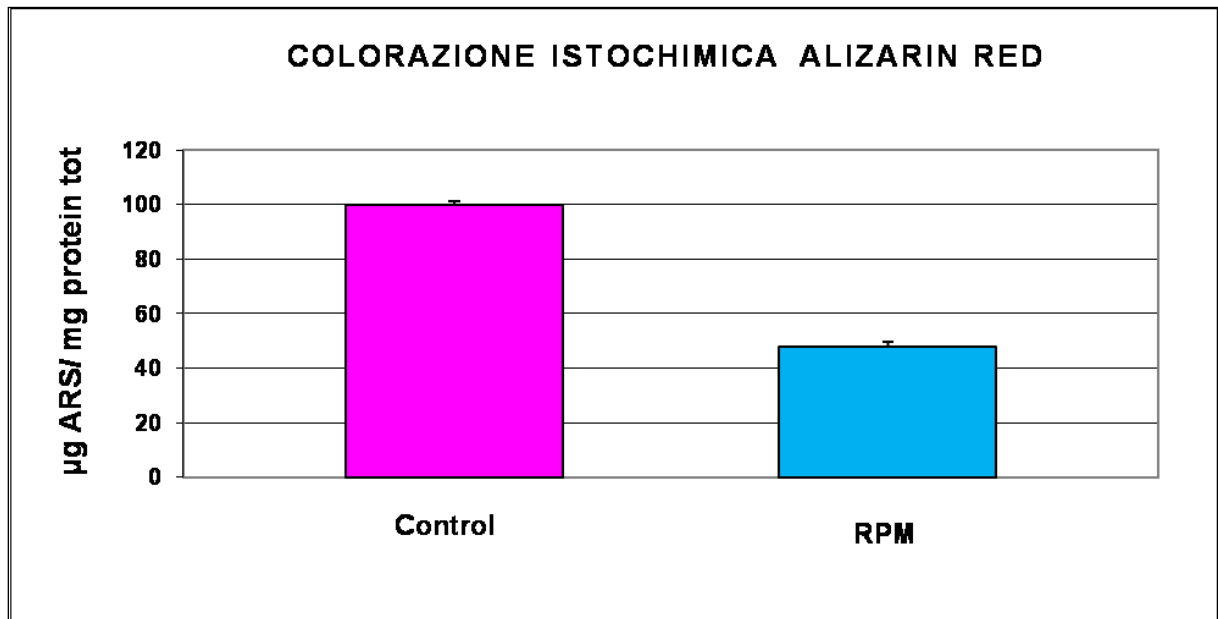


Fig. 15: Quantificazione della mineralizzazione della matrice ossea dopo colorazione istochimica con alizarin red (ARS) di osteoblasti sottoposti per 9 giorni a condizioni di microgravità simulata in RPM. Il grafico (11) mostra il dosaggio colorimetrico dei depositi di calcio. Le foto (11A;11B;) e le immagini (11a;11b;) di microscopia ottica (ingrandimento 20X) mostrano i noduli di mineralizzazione della matrice ossea.

RPM vs CR p < 0,05*

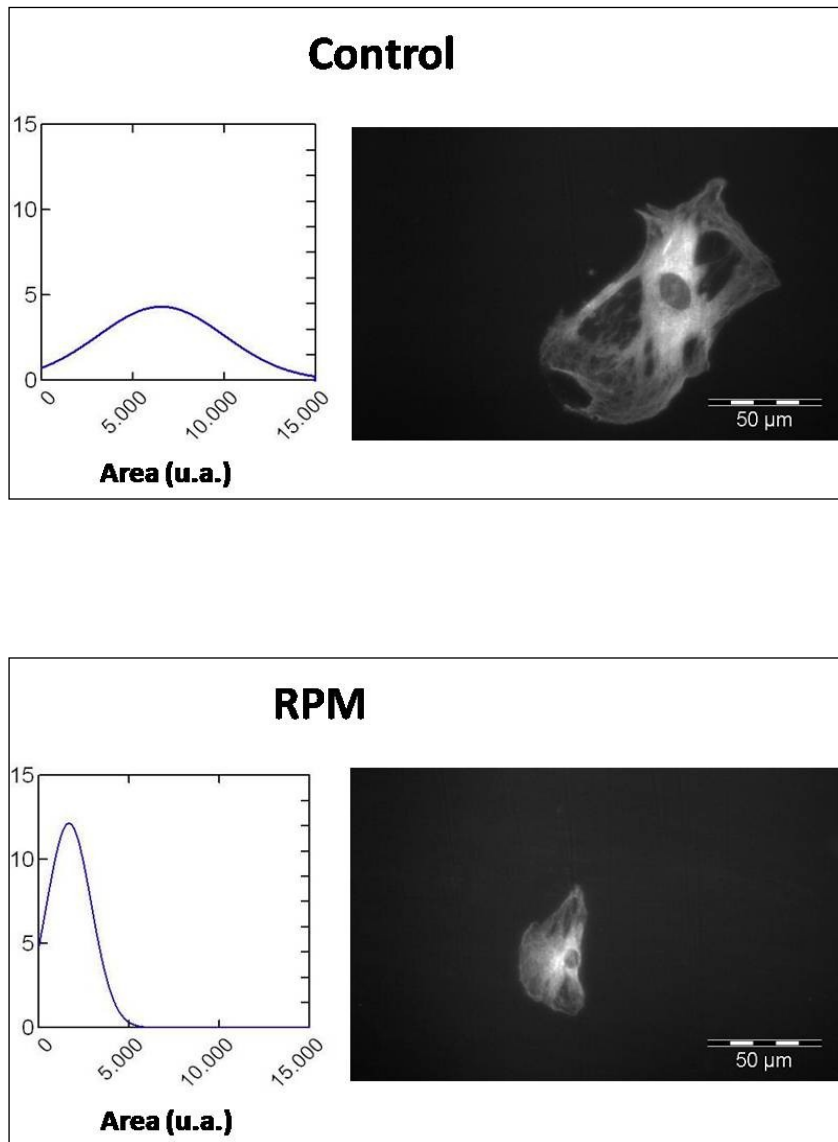


Fig. 16: I grafici (12a;12b;) mostrano la distribuzione d'area, espressa in unità arbitrarie, delle popolazioni di osteoblasti sottoposti per 9 giorni a condizioni di microgravità simulata in RPM, in seguito a immunomarcatura del network di β -tubulina.

*RPM vs CR** $p < 0,001$*

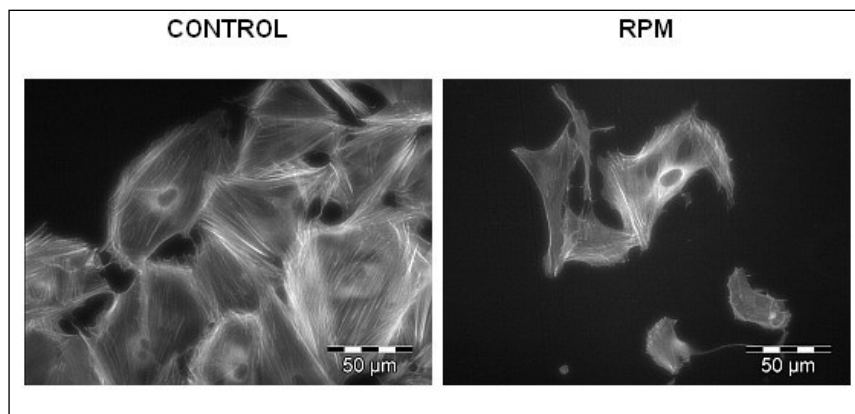


Fig. 17: Marcatura in fluorescenza dei microfilamenti di F-actina di osteoblasti sottoposti per 9 giorni a condizioni di microgravità simulata in RPM

4.2. Studio *in vivo* e *in vitro* della fagocitosi in condizioni di microgravità simulata e nell'anziano

Nella seconda parte del mio dottorato l'attenzione si è concentrata su una analogia particolarmente interessante riscontrata sia tra gli effetti della microgravità sul sistema immune sia tra i parametri ematici negli anziani, e cioè la maggiore suscettibilità all'apoptosi e l' aumento dei livelli sierici delle citochine infiammatorie. Ciò costituisce un paradosso ancora inspiegato in quanto una delle finalità dell'apoptosi è proprio quella di evitare l'istaurarsi di fenomeni infiammatori.

Durante i processi di morte cellulare programmata infatti, questa esigenza è soddisfatta dal fatto che il contenuto dei corpi apoptotici risulta confinato da porzioni di membrana evitando così il rilascio di materiale intracellulare, che causerebbe l'istaurarsi di fenomeni infiammatori e produzione di auto-anticorpi. Un efficiente sistema di fagocitosi inoltre è necessario per evitare che cellule apoptotiche non prontamente eliminate vadano incontro a processi di necrosi secondaria con le stesse conseguenze infiammatorie e autoimmuni. L'incremento dei fenomeni apoptotici, e allo stesso tempo dell'infiammazione, che caratterizzano alcune patologie correlate all'invecchiamento e le alterazioni dovute alla microgravità, possono quindi essere interpretati ipotizzando che la marcata apoptosi non sia seguita da una efficiente rimozione fagocitica delle cellule apoptotiche e dei corpi apoptotici. A tale scopo, abbiamo isolato monociti da sangue periferico di donatori effettuando indagini preliminari per la valutazione del differenziamento in macrofagi mediante valutazione della capacità di fagocitosi, a 7 e 9 giorni di differenziamento, nei confronti dello *Zimosan*, *Saccharomyces cerevisiae* coniugato col fluorocromo FITC per l'analisi in immunofluorescenza. Da tali esperimenti abbiamo potuto osservare che, mentre a 7 giorni di differenziamento il $67 \pm 6\%$ le cellule monocito -

macrofagiche avevano capacità fagocitaria, a 9 giorni più del $90 \pm 3\%$ delle cellule presentavano interazione e internalizzazione del *Zimosan* (Fig. 18, 30). Si è così stabilito a 9 giorni l'optimum di differenziamento dei macrofagi per i seguenti esperimenti in presenza di linfociti apoptotici.

Parallelamente abbiamo valutato il grado di apoptosi per senescenza di linfociti isolati da donatore e lasciati in coltura per 8 giorni ottenendo un $50 \pm 3\%$ di linfociti apoptotici. In particolare, mediante saggi di traslocazione della *fosfatidilserina* e frammentazione del Dna abbiamo stimato che il $35\% \pm 4$ dei linfociti si presentava in una fase iniziale di apoptosi, mentre il $15 \pm 3\%$ si trovava in una fase avanzata (Fig. 19). A questo punto si sono effettuati saggi di interazione e fagocitosi realizzando coculture di linfociti apoptotici e macrofagi provenienti da soggetti giovani e parallelamente sottoponendo coculture degli stessi soggetti in condizioni di microgravità simulata mediante la RPM. I risultati ottenuti (Fig. 20, 21), mostrano una altamente significativa diminuzione della capacità di interazione ($P= 0,024$) e internalizzazione ($P= 0,024$) dei linfociti apoptotici. Sono stati condotti esperimenti sulla capacità di binding nei confronti della *trombospondina*, e sulle variazioni dell'indice di fagocitosi nelle stesse condizioni in seguito ad aggiunta nel mezzo di interazione di questa opsonina che media l'interazione tra superficie delle cellule apoptotiche e il macrofago. Nella condizione di controllo la presenza della *trombospondina* determina un aumento del 12% dell'indice di interazione e del 15% della capacità di internalizzazione. Nei campioni il cui saggio di fagocitosi in presenza di *trombospondina* è stato effettuato in condizioni di microgravità simulata, pur osservando un lieve incremento, del 3 e 1% rispettivamente della capacità di interazione e fagocitosi, la differenza con i campioni di controllo rimane comunque altamente significativa ($P < 0,05$).

In esperimenti *in vivo* utilizzando la RPM si sono sottoposti ratti in condizioni di microgravità simulata per 5 giorni e i macrofagi ottenuti dopo 9

giorni di coltura son stati valutati per la loro capacità di fagocitare lo *Zimosan* ottenendo una riduzione del 19% rispetto a colture simili ottenute da ratti non sottoposti a microgravità simulata (Fig. 21). La differenza pur non essendo significativa ha comunque una certa importanza se consideriamo che le permanenze degli astronauti nello spazio son ben più lunghe di 5 giorni.

Negli ultima parte del mio dottorato mi son dedicata allo studio della fagocitosi su colture di macrofagi ottenute da soggetti anziani sani scelti in base al *senieur protocol*, protocollo ad hoc per gli studi gerontologici. La difficoltà nel reperire questi campioni ad oggi mi ha permesso di effettuare gli esperimenti solo su un ridotto numero di soggetti, che è stato suddiviso in 2 classi d'età. Una classe è costituita da anziani con un range di età tra i 74 e i 79 anni, mentre l'altra classe è costituita da nonuagenari con un range d'età tra i 89 e i 96 anni.

Esperimenti per valutazione della capacità di interazione (Fig. 23) e di internalizzazione (Fig. 24) di linfociti apoptotici hanno mostrato una riduzione seppur non significativa rispettivamente del 10 e 23 % nella classe di medio-anziani rispetto ai giovani mentre i risultati ottenuti per la classe dei nonuagenari sono pressochè sovrapponibili a quelli dei giovani (Fig. 31, 32). I dati mostrano una correlazione positiva tra la capacità d'interazione e di fagocitosi (Fig. 25). Il 75% dei soggetti appartenenti alla classe di medio anziani presentano un basso indice di interazione e di fagocitosi, proprio come i campioni sottoposti all'RPM, il 75% dei soggetti appartenenti alla classe dei nonuagenari mostrano un indice di interazione e fagocitosi simile a quello di campioni provenienti da soggetti giovani. Questi risultati che sembrano andar in controtendenza con l'opinione che con l'avanzare dell'età ci sia una generale compromissione di tutte le funzionalità fisiologiche dell'individuo, potrebbero da una parte far ipotizzare che in organismo molto anziano dove sono abbondanti i processi di senescenza cellulare i macrofagi siano in un stato di preattivazione per far fronte ai numerosi processi di degenerazione tissutale.

D'altra parte è risaputo che nei centenari e nei molto anziani alcune alterazioni osservate in molti parametri immunologici sono meno consistenti del previsto. Ad esempio, nonostante l'involutione timica, nei centenari si osserva una piccola ma costante produzione di linfociti vergini che ha fatto supporre la presenza di organi linfopoietici secondari. Inoltre in centenari sani sono stati trovati inaspettatamente, contemporaneamente a un aumento di marcatori pro-infiammatori, anche un consistente incremento di citochine anti-infiammatorie, come IL-10 e TGF-beta (76, 77). Si pensa quindi che a fianco a un fenomeno infiammatorio sia presente ed altrettanto importante per la longevità un fenomeno compensatorio anti-infiammatorio (anti-inflammaging) e che quindi la longevità sarebbe il risultato di un bilanciamento tra queste due risposte contrastanti (78). Con le dovute cautele, dovute all'esiguo numero dei soggetti su cui ho potuto indagare, si potrebbe ipotizzare che un sistema molto rapido di riconoscimento e fagocitosi sia presente in individui che abbiano superato una certa soglia critica che, osservando le ultime statistiche in questione di vita media mondiale (aspettativa di vita media mondiale 67, 82 per l'Italia) potrebbe essere durante la decade dei 70 anni di vita. I medio anziani vivrebbero quindi in uno stadio delicato, ricco di profondi rimodellamenti caratterizzati da una degenerazione sistemica dell'intero individuo, comprendente il sistema immunitario, rendendolo più suscettibile a gravi malattie. Fattori ambientali, comprendenti stile di vita, e genetici potrebbero avere un ruolo chiave nel decretare il non superamento di questa soglia o un invecchiamento con successo che permetterebbe ad essi di vivere più a lungo dovuto a l'instaurarsi di meccanismi compensatori in grado di contrastare il suo naturale declino.

Si è osservata, inoltre, una certa correlazione tra la capacità di fagocitosi e la preferenza per l'internalizzazione di linfociti in fasi iniziali di apoptosi (Fig. 27, 28). Il 75% degli individui della classe di medio anziani, così come quelli sottoposti a microgravità simulata, mostrano una preferenza per

l'internalizzazione di fasi avanzate e in particolare di corpi apoptotici. Un soggetto appartenente alla classe di medio anziani che si scosta da questo andamento, in quanto presenta una maggiore tendenza alla internalizzazione di linfociti in fasi iniziali di apoptosi, è lo stesso individuo che mostra un maggior indice di internalizzazione e fagocitosi simile a quello di giovani e nonuagenari. Viceversa, l'individuo appartenente alla classe di nonuagenari che presenta un andamento differente dagli altri nonuagenari, in quanto presenta minore capacità di internalizzazione di linfociti in fasi iniziali di apoptosi, presenta anche un basso indice di interazione e fagocitosi. E' difficile dare una spiegazione a questo comportamento. Allo stato attuale si potrebbe ipotizzare che le alterazioni a carico del citoscheletro ben note per i campioni sottoposti a microgravità, ma anche negli studi di immunosenescenza, inducano una preferenza per l'internalizzazione di materiali di piccole dimensioni come corpi apoptotici. Inoltre è noto che l'esposizione del segnale "eat me" della fosfatidilserina è molto rapido ma transiente nelle cellule apoptotiche, probabilmente a causa delle alterazioni a carico del network di actina nelle fasi avanzate di apoptosi (100). Macrofagi con una ridotta o più lenta capacità di interazione e fagocitosi potrebbero non riconoscere abbastanza rapidamente questo segnale che verrebbe perso, riuscendo a internalizzare solo materiale di più piccole dimensioni per mezzo di altri segnali "eat me", non comunque con un'efficacia tale da evitare i fenomeni di *inflammaging*. Queste ipotesi hanno bisogno comunque di essere supportate dall'indagine di un molto più vasto numero di campioni che, per la loro particolare età e stato di salute, fin ad ora non è stato possibile. E' rilevante comunque notare come i campioni sottoposti a microgravità, mostrino strette analogie con la prevalenza di individui della classe di medio anziani. In particolare, la preferenza per entrambi di internalizzazione di linfociti in fasi avanzate di apoptosi mostra, ancora una volta, un comportamento o tendenza simile, seppur più accentuato in

microgravità, tra i processi di senescenza cellulare e le alterazioni dovute alla microgravità.

Infine, illustro il caso di un individuo di 86 anni che rispetto a tutti gli altri ha presentato un correlazione negativa tra capacità di interazione e fagocitosi mostrando un elevato indice di interazione e un basso indice di fagocitosi. Ciò potrebbe esser dovuto o a una interazione non abbastanza stabile affinché faccia seguito una efficiente rimozione della cellula apoptotica, o una alterazione a carico dei recettori deputati alla internalizzazione. Esperimenti condotti su campioni di questo soggetto aggiungendo trombospondina nel mezzo, hanno mostrato un incremento considerevole, del 32%, dell'indice di internalizzazione (Fig. 29). Questi dati avvalorano la prima ipotesi e il sistema di riconoscimento e interazione da parte del sistema recettore della vironectina-trombospondina giocherebbe un ruolo fondamentale affinché si abbia una stabile interazione. E' noto che il macrofago sfrutta una moltitudine di recettori durante la fase di riconoscimento e interazione, proprio per consentire una più rapida ed efficace rimozione delle cellule apoptotiche. Non è del tutto chiaro se sia sufficiente solo uno di questi segnali, se si renda necessaria una loro cooperazione o se esista una precisa sequenza temporale.

L'osservazione di immagini in immunofluorescenza, in seguito a marcatura dell' integrina CD18/CD11b e della trombospondina, denota sia la presenza sia l'assenza nei siti interazione tra macrofago a linfocita apoptotico di uno di questi segnali (Fig. 34, 33), facendo ipotizzare una precisa sequenza temporale nel processo di interazione. Un esempio simile di precisa sequenza temporale la si osserva nei processi di interazione tra linfocita ed endotelio vasale, per mezzo di selectine prima e integrine poi, durante i processi di ricircolo (homing) dei linfociti e durante la diapedesi leucocitaria. D'altra parte, l'osservazione di polarizzazioni e clasterizzazioni di CD18/CD11b o trombospondina in porzioni di membrana che mostrano una certa invaginazione ma l'asserza di un

interazione col linfocita (Fig. 34, 33), farebbe ipotizzare la necessità di una cooperazione fra i segnali di riconoscimento, almeno nelle fasi iniziali, affinché si stabilisca un'interazione abbastanza stabile. E' noto per esempio che il recettore della vitronectina, il CD36 e la trombospondina agiscono in concerto nel mediare il riconoscimento del linfocita apoptotico. E' possibile che le fasi iniziali di interazione siano una tappa delicata, che evolve da un'iniziale interazione a bassa affinità per rafforzarsi mediante il reclutamento di altri recettori. In questi processi di polarizzazione recettoriale gioca un ruolo fondamentale anche la riorganizzazione del citoscheletro.

Nei mesi futuri, ulteriori indagini, supportate anche da un maggior numero di campioni, e la valutazione di altre classi di recettori ci permetteranno di individuare una più precisa sequenza temporale del complesso meccanismo di interazione tra linfocita apoptotico e macrofago.

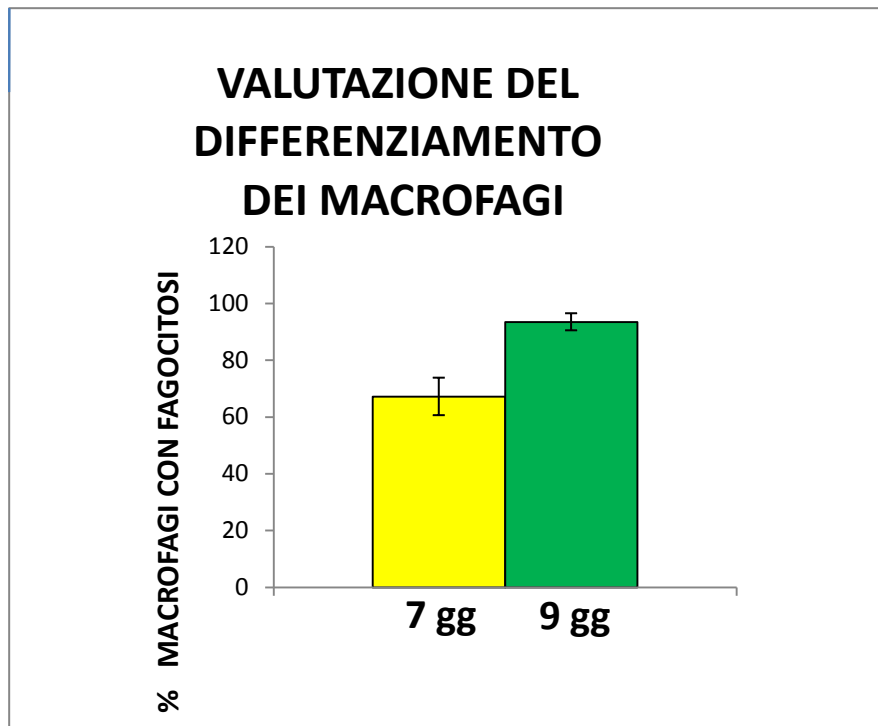


Fig. 18 Valutazione del differenziamento dei macrofagi mediante saggio di fagocitosi del Zimosan a 7 e 9 giorni di coltura

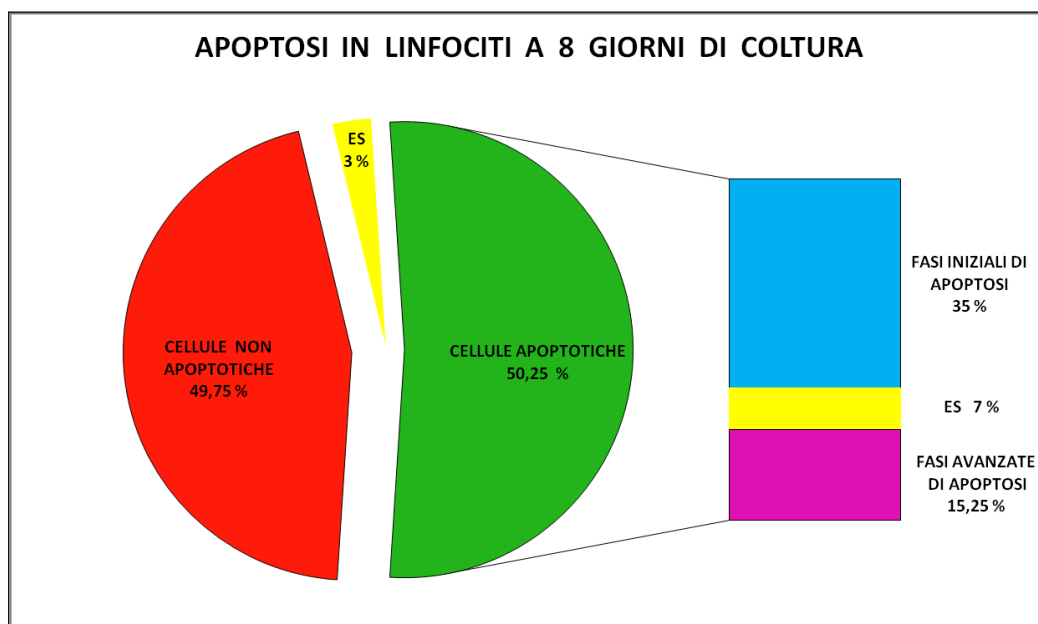


Fig. 19 Valutazione dei livelli di apoptosi di linfociti a 8 giorni di coltura mediante saggio della traslocazione della fosfatidilserina e frammentazione del DNA

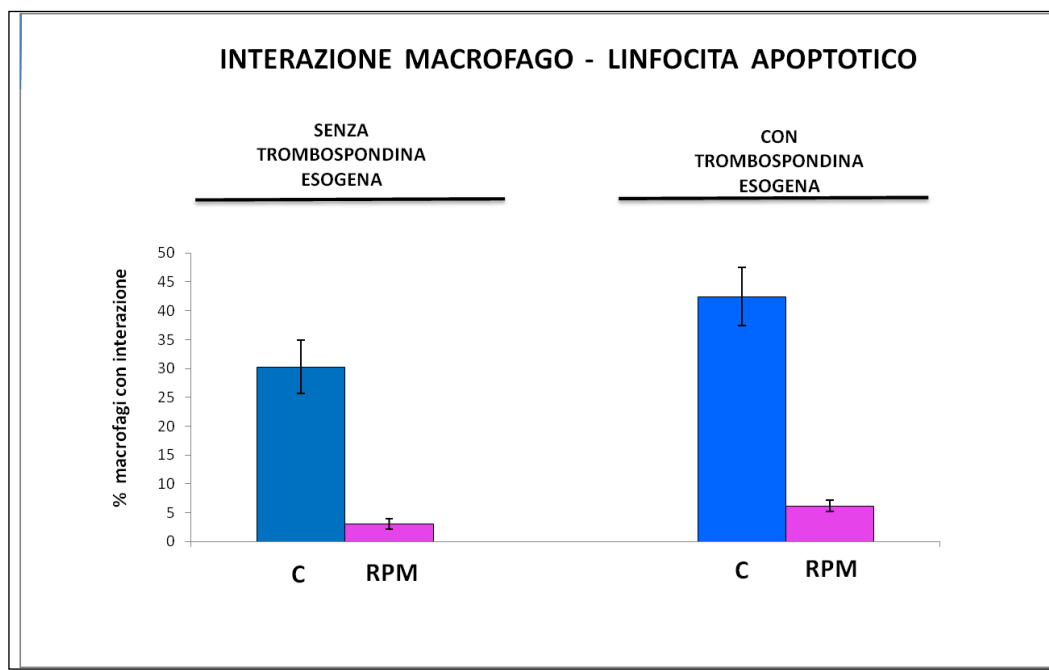


Fig. 20 Quantizzazione delle percentuali di macrofagi che presentano interazione con linfociti apoptotici in campioni sottoposti a microgravità simulata (RPM) e controlli (C) in presenza o assenza di Trombospondina. (*RPM vs C P<0,05*)

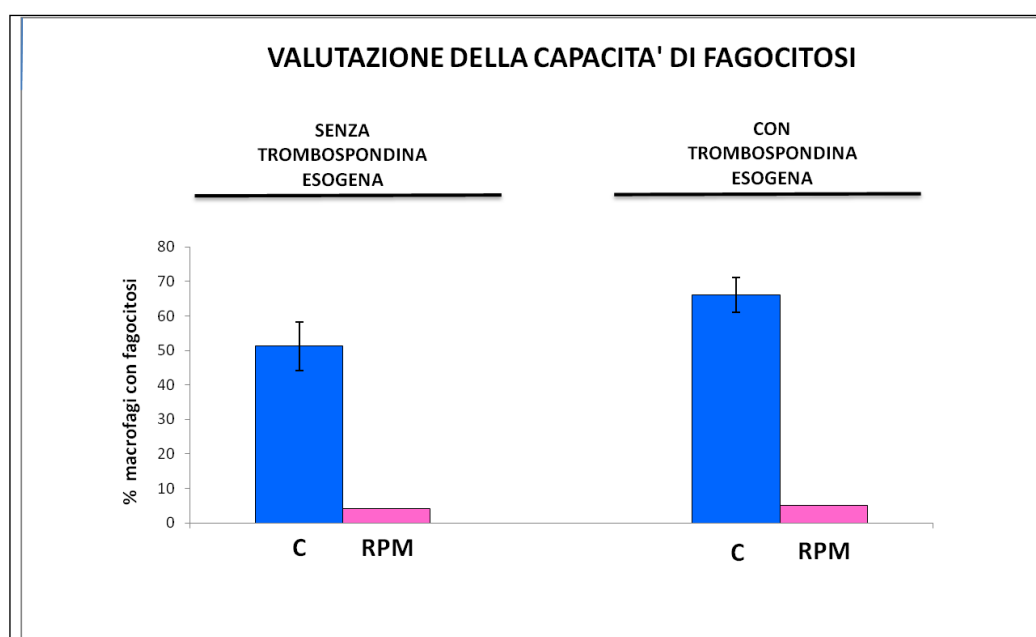


Fig. 21 Quantizzazione delle percentuali di macrofagi che presentano fagocitosi con linfociti apoptotici in campioni sottoposti a microgravità simulata (RPM) e controlli (C) in presenza o assenza di Trombospondina. (*RPM vs C P<0,05*)

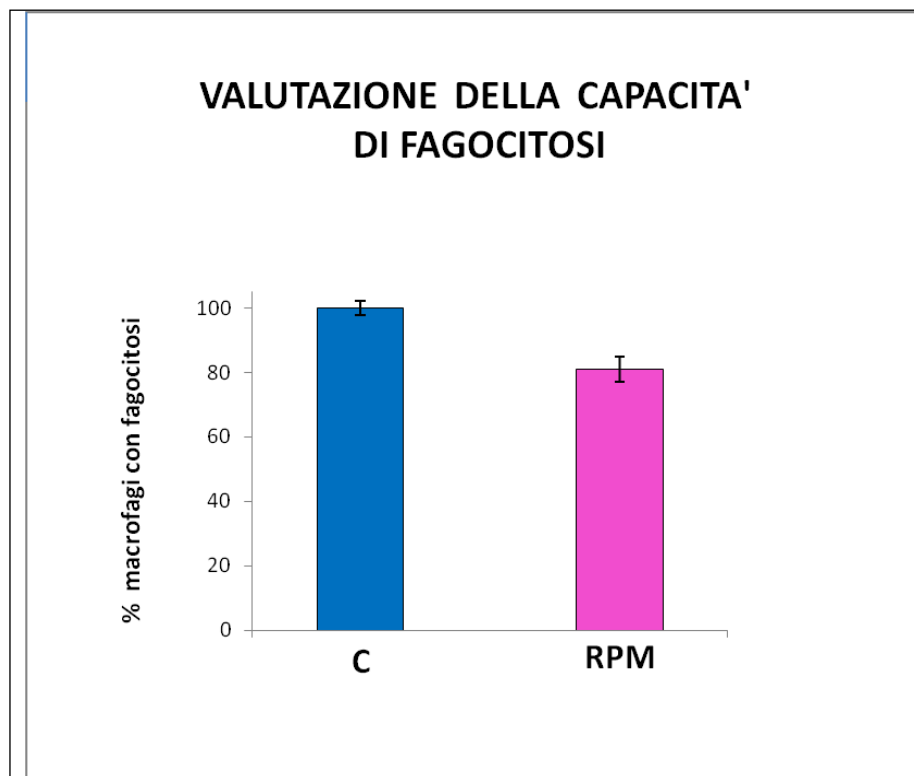


Fig.22 Quantizzazione delle percentuali di macrofagi che presentano fagocitosi in campioni ottenuti da ratti sottoposti a microgravità simulata (RPM) per 5 giorni e controlli (C).

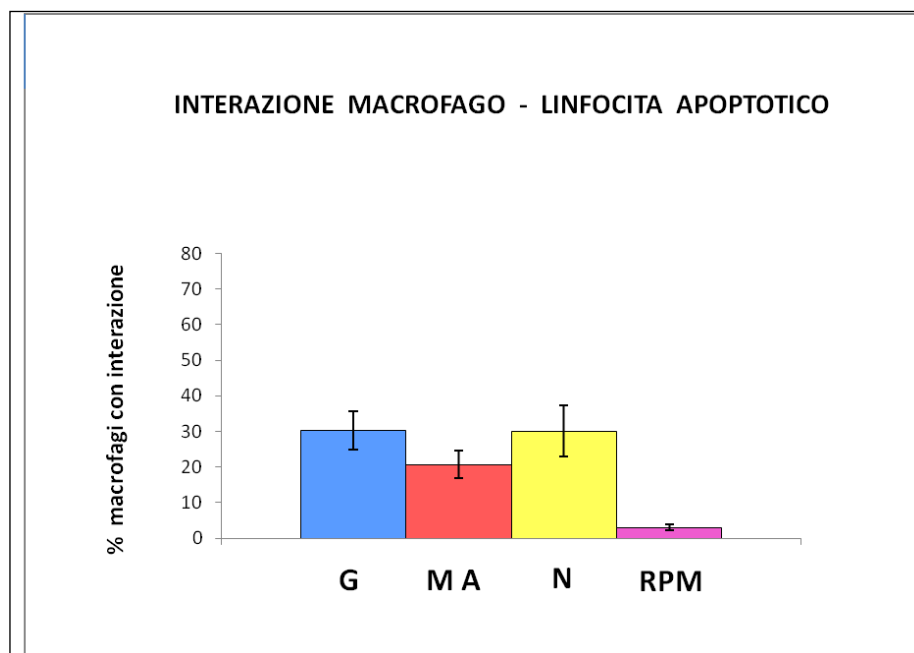


Fig. 23 Quantizzazione delle percentuali di macrofagi che presentano interazione con linfociti apoptotici in campioni ottenuti da soggetti giovani (G), medio anziani (MA), nonuagenari (N) e sottoposti a microgravità simulata (RPM).

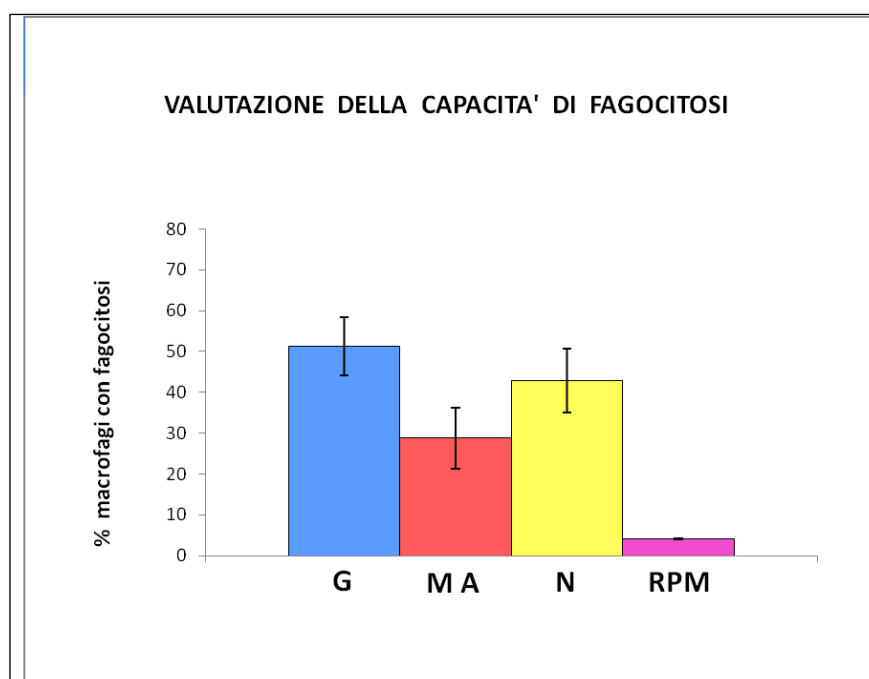


Fig. 24 Quantizzazione delle percentuali di macrofagi che presentano fagocitosi con linfociti apoptotici in campioni ottenuti da soggetti giovani (G), medio anziani (MA), nonuagenari (N) e sottoposti a microgravità simulata (RPM).

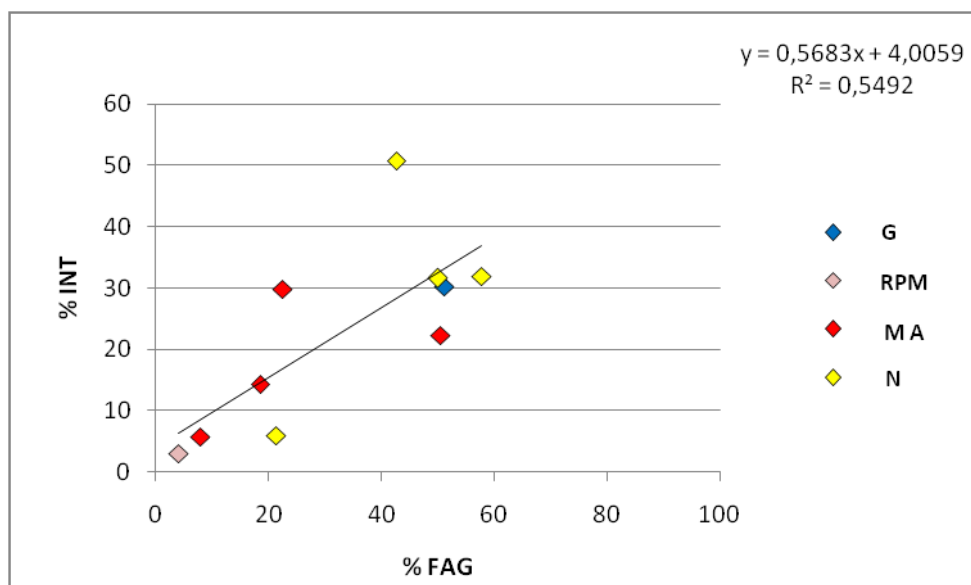


Fig. 25 Correlazione tra le percentuali di macrofagi con interazioni (%INT) e le percentuali di fagocitosi (% FAG) in campioni ottenuti da soggetti giovani (G), medio anziani (MA), nonuagenari (N) e sottoposti a microgravità simulata (RPM).

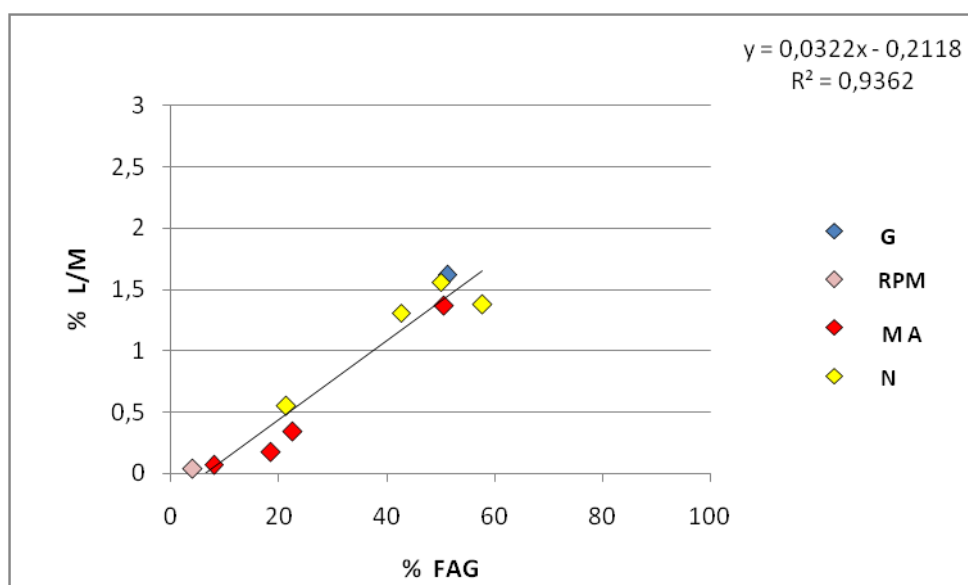


Fig. 26 Correlazione tra le percentuali del numero di linfociti fagocitati per macrofago (%L/M) percentuali di fagocitosi (% FAG) in campioni ottenuti da soggetti giovani (G), medio anziani (MA), nonuagenari (N) e sottoposti a microgravità simulata (RPM).

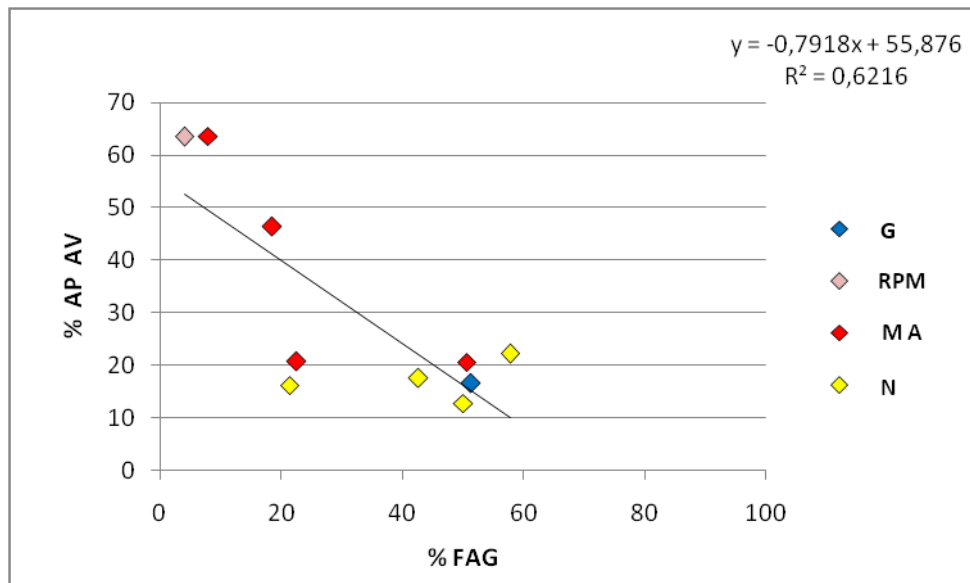


Fig. 27 Correlazione tra le percentuali dei linfociti fagocitati in fase avanzata di apoptosi (%AP AV) e le percentuali di fagocitosi (% FAG) in campioni ottenuti da soggetti giovani (G), medio anziani (MA), nonuagenari (N) e sottoposti a microgravità simulata (RPM).

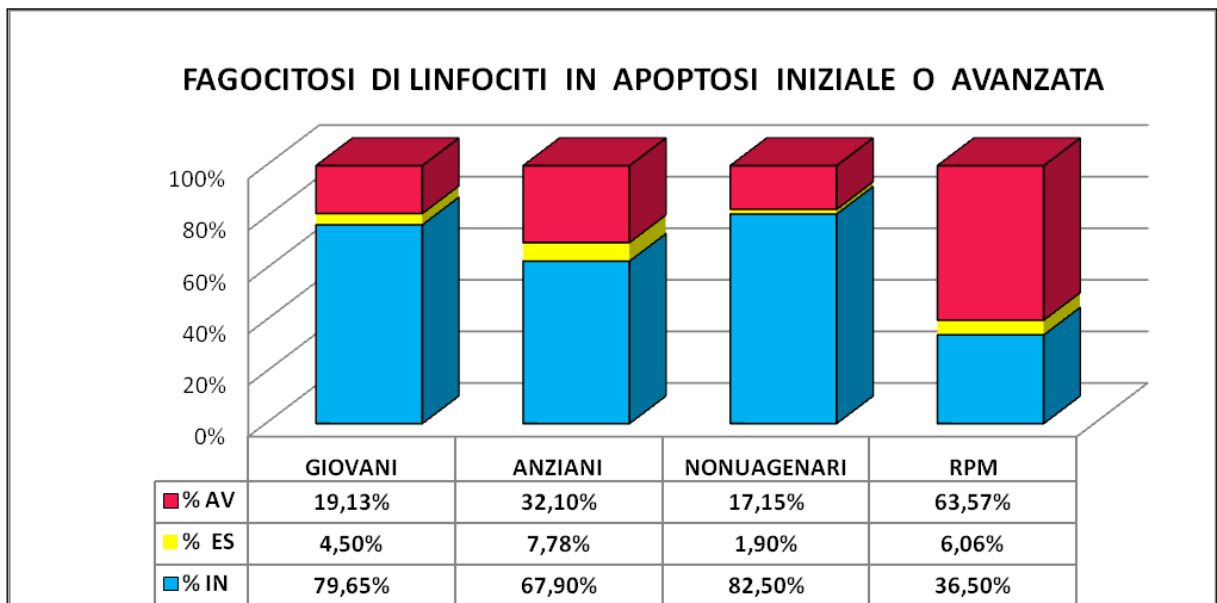


Fig. 28 Quantizzazione delle percentuali di linfociti fagocitati in fase iniziale o avanzata di apoptosi da macrofagi ottenuti da soggetti giovani (G), medio anziani (MA), nonuagenari (N) e sottoposti a microgravità simulata (RPM).

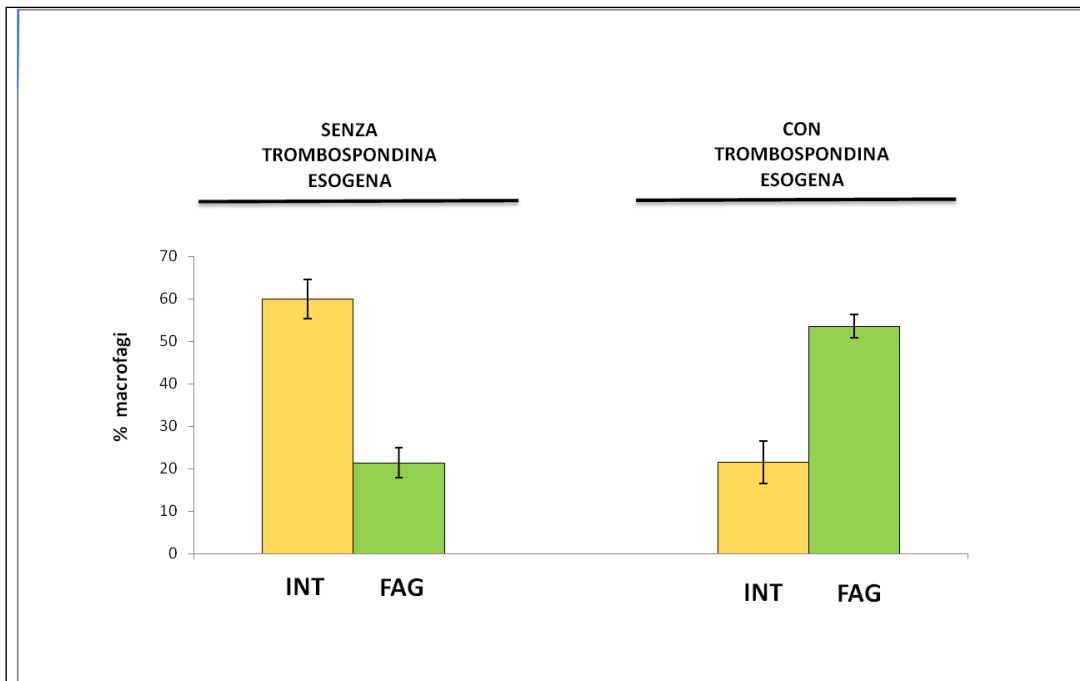


Fig. 29 Quantizzazione della capacità di interazione e fagocitosi in presenza o assenza di Trombospondina in un caso particolare di soggetto anziano.

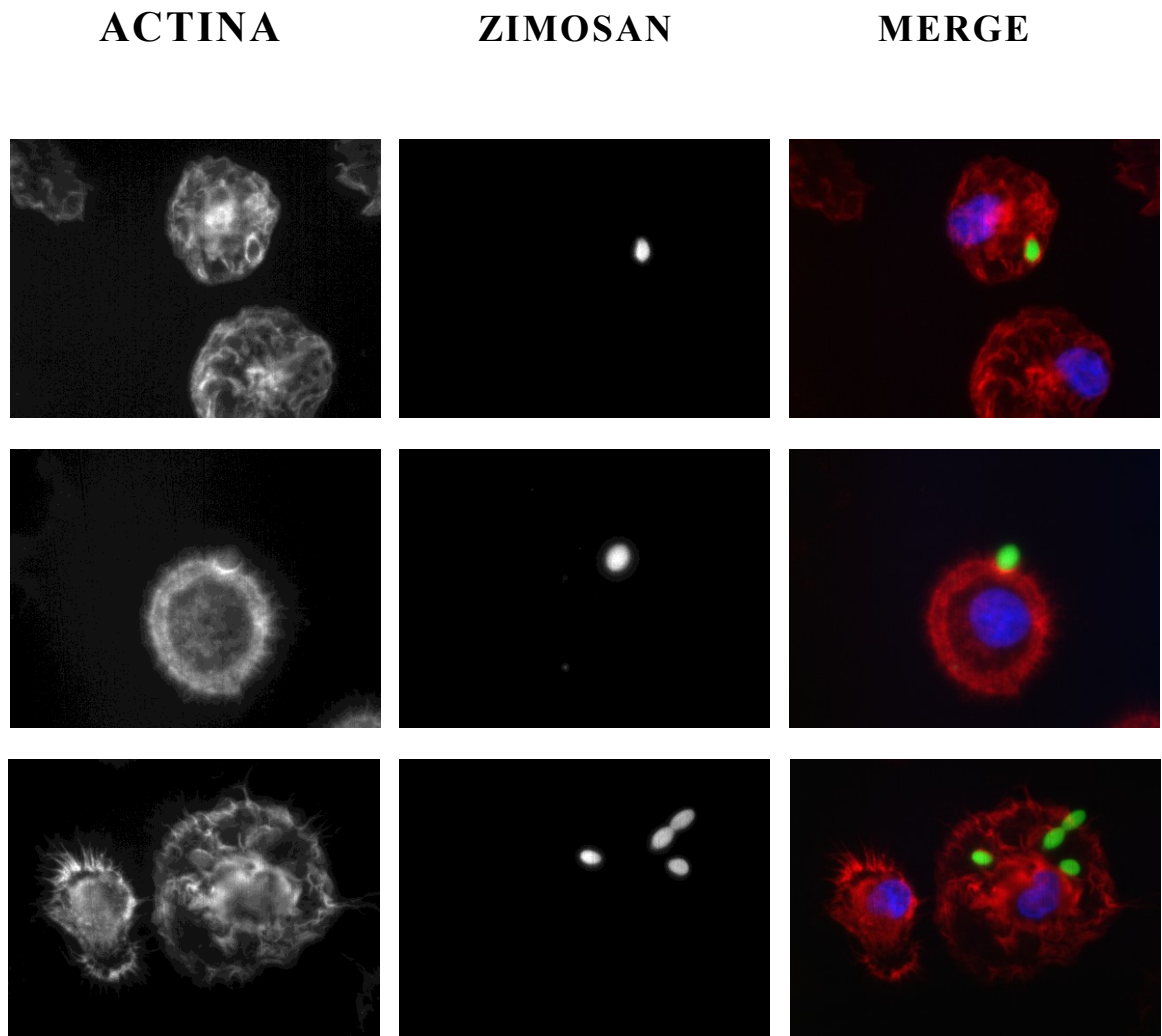


Fig. 30 Valutazione del differenziamento dei macrofagi mediante saggio di fagocitosi del Zimosan

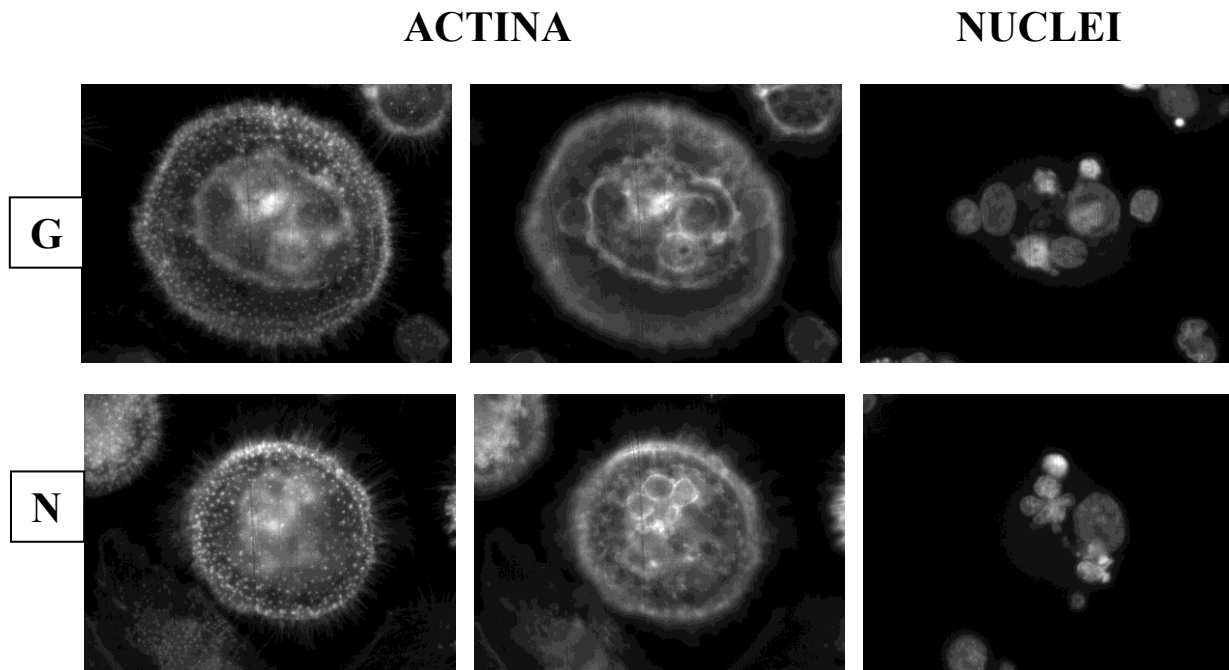


Fig. 31 Esempi di interazioni e fagocitosi di linfociti apoptotici in colture di macrofagi ottenute da soggetti giovani (G) e nonuagenari (N).

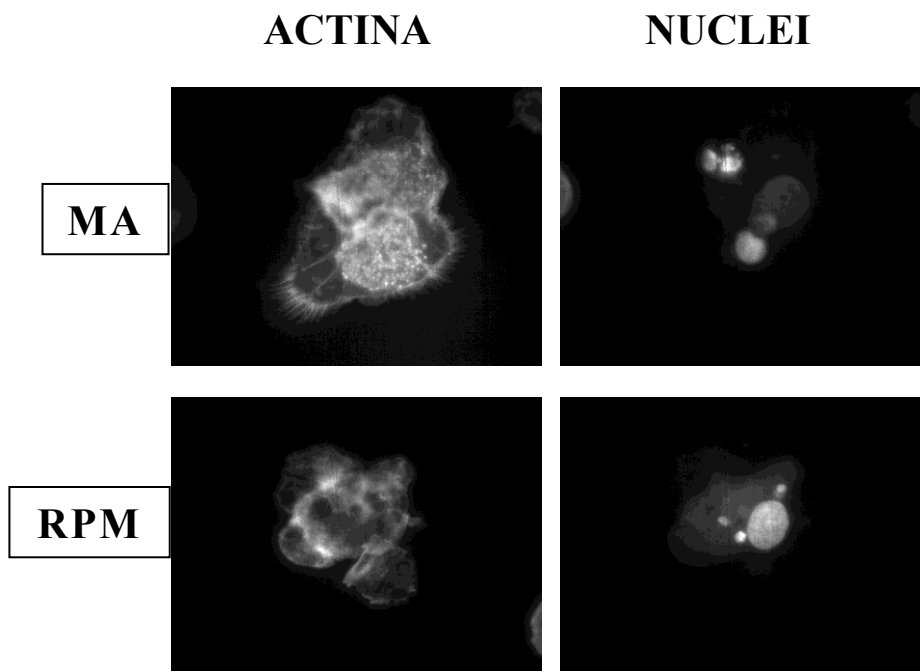


Fig. 32 Esempi di interazioni e fagocitosi di linfociti apoptotici in colture di macrofagi ottenute da soggetti medio anziani (MA) e sottoposti a microgravità (RPM)

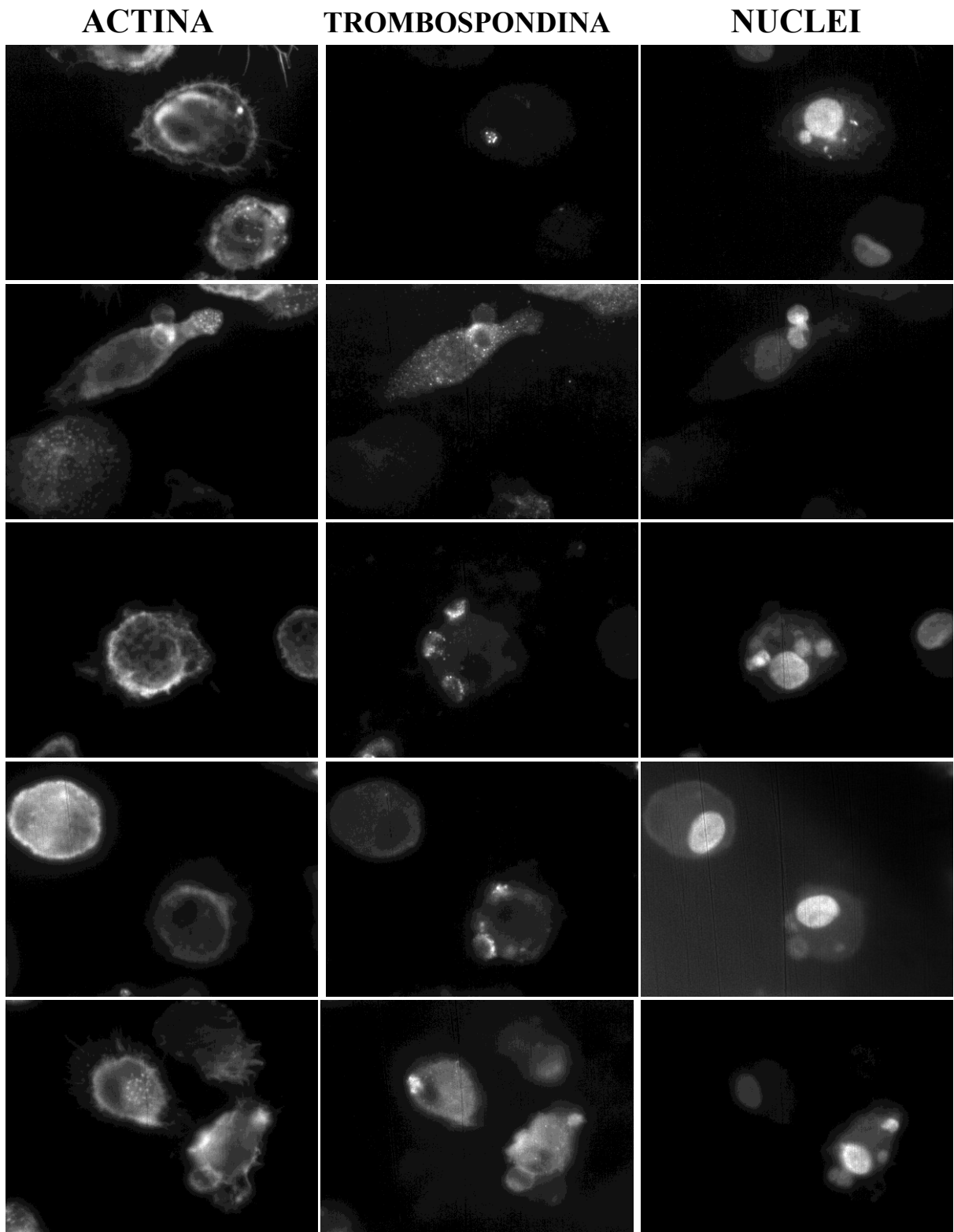


Fig. 33 Localizzazione della Trombospondina in co-culture di macrofagie linfociti apoptotici.

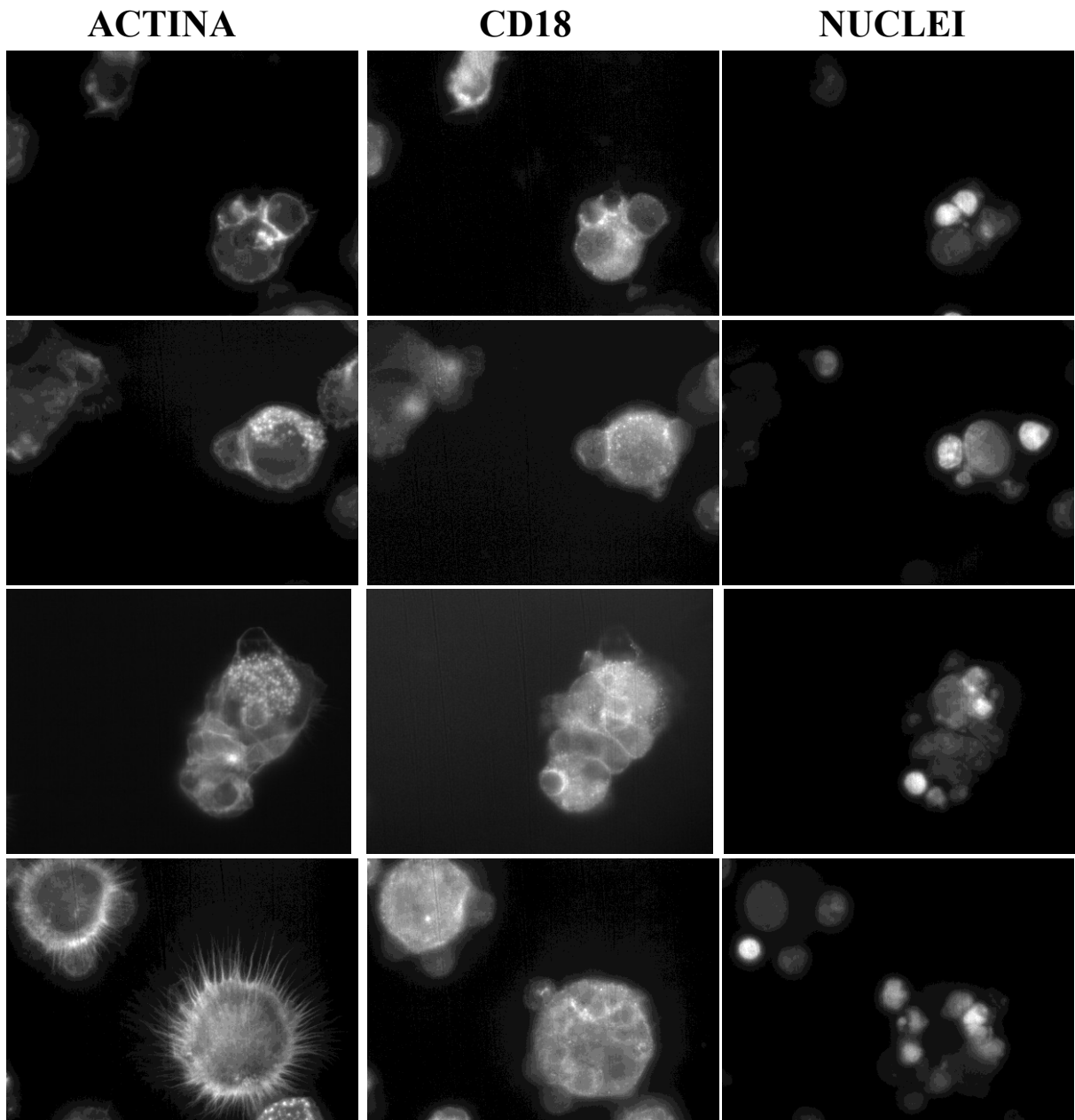


Fig. 34 Localizzazione dell' Integrina CD18/CD11b in co-culture di macrofagi e linfociti apoptotici.

5.BIBLIOGRAFIA

- 1 -*Knight T.A.*; “ON THE DIRECTION OF THE RADICLE AND GERMEN DURING THE VEGETATION OF SEEDS”; Philos. Trans. R. Soc. Lond. – Biol. Sci. 99, 108-120, 1806.
- 2 -*Briegleb W.* *Ein Beitrag zur Frage physiologischer Schwerelosigkeit*; in: “DEUTSCHE LUFT- UND RAUMFAHRT VORTRAGE AUS DEM INSTITUT FUER FLUGMEDIZIN GEHALTEN AUF DEM IV INTERNATIONALEN UND XII EUROPAEISCHEN KONGRESS FUER LUFT- UND RAUMFAHRTMEDIZIN IN ROM 1963 UND RAUMFAHRTMEDIZIN IN BUBLIN 1964”; DVL, Cologne, 7-42, 1965.
- 3 -*Scano A.*; “EFFETTI DI UNA VARIAZIONE CONTINUA DEL CAMPO GRAVITAZIONALE SULLO SVILUPPO ED ACCRESCIMENTO DI LATHYRUS ODORATUS COMMUNICATION AT 6TH INTERNATIONAL AND 12TH EUROPEAN CONGRESS ON AERONAUTICAL AND SPACE MEDICINE”; Rome, October 1963.
- 4 -*Mesland D.A.M., Anton A.H., Willemssen H., et al*; “THE FREE FALL MACHINE – A FACILITY FOR MICROGRAVITY RESEARCH IN LIFE SCIENCES”; Microgravity Sci. Technol. 9 , 10-14,1996.
- 5 -*Schwarzenberg M., Pippia P., Meloni M.A., et al*; “MICROGRAVITY SIMULATIONS WITH HUMAN LYMPHOCYTES IN THE FREE FALL MACHINE AND IN THE RANDOM POSITIONING MACHINE”; J.Gravit. Physiol. 5, 23-26,1998.
- 6 -*Peana T. A., Sechi S., Chessa M.L., Deligios, Meloni M.A. e Proto P.*; “EFFECTS OF CONDITIONS OF THREE- DIMENSIONAL CLINOSTATING ON CARRAGEIN- INDUCED PAW OEDEMA AND HYPERALGESIA IN RAT”; Journal of Gravitational Physiology 11, 2004.

- 7 -*Cogoli A. et al.*; “CELL SENSITIVITY TO GRAVITY”; *Science* 225, 228-230, 1984.
- 8 -*Claassen D.E. et al.*; “Impact of altered gravity on aspect of cell BIOLOGY”; *Int. Rev. Cytol.* 156, 301-373, 1994.
- 9 -*Cogoli A.*; “THE EFFECT OF HYPOGRAVITY AND HYPERGRAVITY ON CELLS OF THE IMMUNE SYSTEM”; *J. Leukoc. Biol.*, 54, 259, 1993.
- 10-*Cogoli A. and Cogoli-Greuter M.*; “ACTIVATION AND PROLIFERATION OF LYMPHOCYTES AND OTHER MAMMALIAN CELLS IN MICROGRAVITY”. In : *Advances in Space Biology and Medicine.* 6, 33-79, 1997.
- 11-*Cogoli A. et al.*; “CELL SENSITIVITY TO GRAVITY”; *Science* 225, 228-230, 1984 .
- 12-*Walther I., Pippia P., Meloni MA., Turrini F., Mannu F., Cogoli A.*; “SIMULATED MICROGRAVITY INHIBITS THE GENETIC EXPRESSION OF INTERLEUKIN-2 AND ITS RECEPTOR IN MITOGEN-ACTIVATED T LYMPHOCYTES”; *FEBS* 436, 115-118, 1998.
- 13-*Maccarrone M., Battista N., Meloni MA., Bari M., Galleri G., Pippia P., Cogoli A., Finazzi-Agrò A.*; “CREATING CONDITIONS SIMILAR TOO THAT OCCUR DURING EXPOSURE OF CELLS TO MICROGRAVITY INDUCES APOPTOSIS IN HUMAN LYMPHOCYTES BY 5-LIPOXYCENASE-MEDIATED MITOCHONDRIAL UNCOUPLING AND CYTOCHROME C RELEASE”; *J. Leuk. Bio.* 73, 472-481, 2003 .
- 14-*Bennet CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA*; “REGULATION OF OSTEOBLASTOGENESIS AND BONE MASS BY WNT10B. *PROC NATL. ACAD.*”; *Sci. USA*; 102: 3324-3329, 2005.

- 15 -*Glass DA II and Karsenty G: Minireview; "IN VIVO ANALYSIS OF WNT SIGNALLING IN BONE.ENDOCRINOLOGY"; 148: 2630-2634, 2007.*
- 16 -*Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G; "A CBFA1-DEPENDENT GENETIC PATHWAY CONTROLS BONE FORMATION BEYOND EMBRYONIC DEVELOPMENT"; Genes and Development; 13:1025-1036; 1999*
- 17 -*Nakashima K, de Crombrughe B; "TRANSCRIPTIONAL MECHANISM IN OSTEOBLAST DIFFERENTIATION AND BONE FORMATION"; Trends Genet; 19:458-466; 2003*
- 18 -*Kostenuik PJ., Shalhoub V. Osteoprotegerin; "A PHYSIOLOGICAL INHIBITOR OF BONE RESORPTION"; Curr Pharm Des, 7:613-35, 2001.*
- 19 -*Takai H., Kanematsu M., Yano K.; "TRANSFORMING GROWTH FACTOR- B (TGF- B) STIMULATES THE PRODUCTION OF OSTEOPROTEGERIN / OSTEOCLASTOGENESIS INHIBITORY FACTOR BY BONE MARROW STROMAL CELLS"; J Biol Chem, 273:27091-96, 1998.*
- 20 -*Howard GA., Bottemiller BL., Turner RT., Rader JJ., Baylink DJ.; "PARATHYROIDHORMONE STIMULATES BONE FORMATION AND RESORPTION IN ORGAN CULTURE: EVIDENCE FOR A COUPLING MECHANISM"; Proc Natl Acad Sci USA,; 78(5): 3204-08, 1981.*
- 21 -*Mack PB, LaChance PA, Vose GP & Vogt FB.; "BONE DEMINERALIZATION OF FOOT AND HAND OF GEMINI- TITAN IV, V AND VII ASTRONAUTS DURING ORBITAL FLIGHT"; Amer. J. Roentgenol, Rad. Therapy & Nuclear Med. 100: 503-11, 1967.*
- 22 -*Lutwak L, Whedon GD, Lachance PA, Reid JM & Lipscomb HS; "MINERAL, ELECTROLYTE AND NITROGEN BALANCE STUDIES*

- OF THE GEMINI- VII FOURTEEN- DAY ORBITAL SPACE FLIGHT”;
J. Clin. Endocrinol. 29:1140-56,1969.
- 23 -*Mack PB*; “BONE DENSITY CHANGES IN A MACACA NEMESTRINA MONKEY DURING THE BIOSATELLITE III PROJECT”; *Aerospace Med.*42: 828-33, 1971.
- 24 -*Rambaut PC, Leach CS & Johnson PC*; “CALCIUM AND PHOSPHORUS CHANGE OF THE APOLLO 17 CREW MEMBERS”; *Nutr. Metabol.* 18: 62-9, 1975.
- 25 -*Whedon GD, Lutwak L, Reid J, Rambaut P, Whittle M, Smith M & Leach C*; “MINERAL AND NITROGEN BALANCE STUDY, RESULTS OF METABOLIC OBSERVATIONS ON SKYLAB II 28-DAY ORBITAL MISSION”; *Acta Astronautica* 2:297-309, 1975.
- 26 -*Tilton FE, Degioanni JJC & Schneider VS*; “LONG-TERM FOLLOW-UP OF SKYLAB BONE DEMINERALIZZAZION”; *Aviat. Space Environ. Med.* 11: 1209-13, 1980.
- 27 -*Yagodovsky VS, Triftanidi LA & GoroKhova GP*; “SPACE FLIGHT”; *Amer. J. Physiol.* 252: R252-5, 1987.
- 28 -*Morey ER & Baylink Dj*; “INHIBITION OF BONE FORMATION DURING SPACE FLIGHT”; *Science* 201: 1138-41, 1978.
- 29 -*Turner RT, Bell NH, Duvall P, Bobyn JD, Spector M, Morey-Holton E & Baylink DJ*; “SPACEFLIGHT RESULT IN FORMATION OF DEFECTIVE BONE”; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 180: 544-9, 1985.

- 30 -*Bakulin AV, Ilyan EA, Organov VS & Lebedev VI*; “THE STATE OF BONES OF PREGNANT RATS DURING AN ACUTE STAGE OF ADAPTATION TO WEIGHTLESSNESS. IN: PROCEEDING, 2ND INTERNATIONAL CONFERENCE ON SPACE PHYSIOLOGY (TOULOUSE, FRANCE, 20-22 NOV. 1985)” ; Ed. Hunt JJ, ESA, Paris, pp.225-9, 1985.
- 31 -*Vico L, Chappard D, Alexandre C, Palle S, Minaire P, Riffat G, Novikov VE & Bakulin AV*; “EFFECTS OF WEIGHTLESSNESS ON BONE MASS AND OSTEOCLAST NUMBER IN PREGNANT RATS AFTER A FIVE-DAY SPACE FLIGHT (COSMOS 1514)” ; Bone 8: 95-103, 1987.
- 32 -*Schneider V, Organov V, Le Blanc A, Rakhmanov A, Bakulin A, Grigoriev A & Varonin L*; “SPACE FLIGHT BONE LOSS AND CHANGE IN FAT AND LEAN BODY MASS” ; J. Bone Min. Res. 117: S122 (abstract), 1992.
- 33 -*Calliot-Augusseau A., Lafage-Proust MH., Soler C., Pernod J., Dubois F. and Alezandre C.*; “BONE FORMATION AND RESORPTION BIOLOGICAL MARKERS IN COSMONAUTS DURING AND AFTER A 180-DAY SPACE FLIGHT (EUROMIR 95)” ; Clin Chem 44: 578-585, 1998.
- 34 -*Vico L, Collet P, Guignandon A, Lafage- Proust MH, Thomas T, Rehaillia M and Alexandre C*; “EFFECT OF LONG- TERM MICROGRAVITY EXPOSURE ON CANCELLOUS AND CORTICAL WEIHTBEARING BONES OF COSMONAUTS” ; Lancet 355: 1607-1611, 2000.
- 35 -*Van Loon JJWA, Bervoets DJ, Burger EH, Dieudonnè SC, Hagen JW, Semeins CM, Zandieh Doulabi B & Veldhuijzen JP*; “DECREASED MINERALIZATION AND INCREASED CALCIUM

- RELEASE IN ISOLATED FETAL MOUSE LONG BONES UNDER NEAR WEIGHTLESSNESS”; *J. Bone Min. Res.* 10: 550-7, 1995.
- 36 -*Hughes- Fulford M, Lewis ML*; “EFFECTS OF MICROGRAVITY ON OSTEOBLAST GROWTH ACTIVATION”; *Exp Cell Res*, 224:103-109, 1996.
- 37 -*Carmeliet G, Nys G, Bouillon R*; “MICROGRAVITY REDUCES THE DIFFERENTIATION OF THE HUMAN OSTEOBLASTIC MG-63 CELLS”; *J. Bone Miner Res* 12: 786-794, 1997.
- 38 -*Kazarian L.E., and H.E. Von Gierke*; “THE EFFECTS OF HYPOKINESIA IN PRIMATES ON BONE STRENGTH”; *Acta Astronaut.*,8, 1075-1082, 1981.
- 39 -*Morey-Holton E*; “A 14-DAY GROUND- BASED HYPOKINESIA STUDY IN NONHUMAN PRIMATES- A COMPILATION OF RESULTS”; *Nasa Technical Memorandum* 81268, 1-3, 1981.
- 40 -*Globus R.K., D.D. Bikle, and E. Morey- Holton*; “THE TEMPORAL RESPONSE OF BONE TO UNLOADING”; *Endocrinology*, 118, 733-742, 1986.
- 41 -*Roer R.D., and R.M. Dillaman*; “BONE GROWTH AND CALCIUM BALANCE DURING SIMULATED WEIGHTLESSNESS IN THE RAT”; *J. Appl. Physiol.*, 68, 13-20, 1990.
- 42 -*Le Blanc A.D., Schneider V.S., Evans H.J., Engelbretson D.A. and Krebs, J.M*; “BONE MINERAL LOSS AND RECOVERY AFTER 17 WEEKS OF BED REST”; *J. Bone Miner. Res.*5, 843-850, 1990.

- 43 -Halloran B.P., Bikle D.D., Harris J., Autry C.P., Currier P.A., Tanner S., Patterson- Buckendahl P., and Morey-Holton E.; “SKELETAL UNLOADING INDUCES SELECTIVE RESISTANCE TO THE ANABOLIC ACTIONS OF GROWTH HORMONE ON BONE”; *J. Bone Miner. Res.*10, 1168-1176, 1995.
- 44 -Westerlind K.C., Morey- Holton E., Evans G.L., Tanner S.J. and Turner R.T; “TGF-B MAY HELP COUPLE MECHANICAL STRAIN AND BONE CELL IN VIVO”; *J. Bone Miner. Res.*11 S. 377, 1996.
- 45 -Matsumoto T., Nakayama K., Kodama Y., Fuse H., Nakamura, T. and Fukumoto S; “EFFECTS OF MECHANICAL UNLOADING AND RELOADING ON PERIOSTEAL BONE FORMATION AND GENE EXPRESSION IN TAIL- SUSPENDED RAPIDLY GROWING RATS”; *Bone* 22, 89S-93S,1998.
- 46 -Vanderby R.Jr, Vailas A.C., Graf B.K., Thielke R.J., Ulm M.J., Kohles S.S. and Kunz D.N.; “ACUTE MODIFICATION OF BIOMECHANICAL PROPERTIES OF THE BONE-LIGAMENT INSERTION TO RAT LIMB UNWEIGHTING”; *FASEB J.*4, 2499-2505, 1990.
- 47 -Basso N., Bellows CG., Heersche J.N. Effect of simulated weightlessness on osteoprogenitor cell number and proliferation in young and adult rats. *Bone* 36:173- 183,2005.
- 48 -Heer M., Baecker N., Mika C., Boese A., Gerzer R; “IMMOBILIZATION INDUCES A VERY RAPID INCRESA IN OSTEOCLAST ACTIVITY”; *Acta Astronaut* 57: 31-36, 2005.
- 49 -Guidagnon A., Vico L., Alexandre C and Lafage-Proust MH; “SHAPE CHANGES OF OSTEOBLASTIC CELLS UNDER GRAVITATIONAL VARIATIONS DURING PARABOLIC FLIGHT-RELATIONSHIP WITH PGE2 SYNTHESIS”; *Cell Struct Funct* 20: 369-375, 1995.

- 50 -*Sakar D., Nagaya T., Koga K., Nomura Y., Gruener R., Seo H;* “CULTURE IN VECTOR-AVERAGED GRAVITY UNDER CLINOSTAT ROTATION RESULTS IN APOPTOSIS OF OSTEOLASTIC ROS 17/2.8 CELLS”; *J Bone Miner Res* 15: 489-498, 2000.
- 51 -*Ontiveros C., McCabe LR;* “SIMULATED MICROGRAVITY SUPPRESSES OSTEOLAST PHENOTYPE, RUNX2 LEVELS AND AP-1 TRANSACTIVATION”; *J Cell Biochem* 88: 427-437, 2003.
- 52 -*Meyers VE., Zayzafoon M., Douglas JT., McDonald JM;* “RHOA AND CYTOSKELETAL DISRUPTION MEDIATE REDUCED OSTEOLASTOGENESIS AND ANHANCED ADIPOGENESIS OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS IN MODELED MICROGRAVITY”; *J Bone Miner Res* 20: 1858-1866, 2005.
- 53 -*Franceschi C.;* “CELL PROLIFERATION AND CELL DEATH IN THE AGING PROCESS.”; *Aging ClinExp. Res.*; 1: 3-13, 1989.
- 54 -*Franceschi C, Monti D, Barbieri D, Grassilli E, Troiano L.;* “IMMUNOSENESCENCE IN HUMANS: DETERIORATION OR REMODELLING?”; *Intern Rev Immunol.*; 12:57-74, 1995b.
- 55 -*Franceschi C, Valensin S, Bonafè M, Paolisso G, Yashin;* “THE NETWORK AND THE REMODELLING THEORIES OF AGING: HISTORICAL BACKGROUND AND NEW PERSPECTIVES”; *Exp Gerontol.*; 35: 879-896, 2000b.
- 56 -*Franceschi C, Monti D, Barbieri D, Grassilli E, Troiano L et al;* ”IMMUNOSENESCENCE IN HUMANS: DETERIORATION OR REMODELLING?”; *Intern. Rev. Immunol.*, 1995; 12: 57-74.

- 57 -Pawelec G, Medi A, Arnika R, Karin H, Wolfgang W, Andrea E.; "IN VITRO SENESCENCE ODELS FOR HUMAN T LYMPHOCYTES"; Vaccine, 2000; 1666-74.
- 58 -Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE.; "INVOLUTION OF THE MAMMALIAN THYMUS, ONE OF THE LEADING REGULATORS OF AGING"; In vivo, 11(5): 421-40, 1997 Sep-Oct.
- 59 -Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A et al.; "T CELLS AND AGEING"; Frontiers in Biosciences, 7 d1056-1183, 2002 (May).
- 60 -Gerli R, Paganelli R, Cossarizza A, Muscat C, Piccolo G, Barbieri D, Mariotti S, Monti D, Bistoni O, Raiola E, Venanzi FM, Bertotto A, Franceschi C.; "LONG-TERM IMMUNOLOGIC EFFECTS OF THYMECTOMY IN PATIENTS WITH MYASTHENIA GRAVIS"; J Allergy Clin Immunol. 103(5 Pt 1):865-72, 1999 May.
- 61 -Effros RB; "AGEING AN THE IMMUNE SYSTEM"; Review. Novartis Found Symp., 2 35: 130-9; discussion 139-45, 146-9, 2001.
- 62 -Fagnoni FF, Vescovini R, Mazzola M, Bologna G, Nigro E et al.; "EXPANSION OF CYTOTOXIC CD8+ CD28+ T CELLS IN HEALTHY AGED PEOPLE AND CENTENARIANS"; Immunology,; 88: 501-7, 1996.
- 63 -Miller RA, Jacobson B, Weil G, Simons ER ; " DIMINISHED CALCIUM INFLUX IN LECTIN STIMULATED T CELLS FROM OLD MICE"; J. Cell Physiol., 132 (2):337-42, 1987.

- 64-*Miller RA.*; “EFFECT OF AGING ON T LYMPHOCYTE ACTIVATION”; *Review. Vaccine*, 18 (16):1654-60, 2000.
- 65-*Whisler RL, Newhouse YG, Bagenstose SE*; “AGE-RELATED REDUCTIONS IN THE ACTIVATION OF MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES P44MAPK/ERK1 AND P42MAPK/ERK2 IN HUMAN T CELLS STIMULATED VIA LIGATION OF THE T CELL RECEPTOR COMPLEX”; *Cell Immunol.*, 168 (2):201-10, 1996.
- 66-*Liu B, Carle KW, Whisler RL.*; “REDUCTIONS IN THE ACTIVATION OF ERK AND JNK ARE ASSOCIATED WITH DECREASED IL-2 PRODUCTION IN T CELLS FROM ELDERLY HUMAN STIMULATED BY THE TCR/CD3 COMPLEX AND COSTIMULATORY SIGNALS”; *Cell. Immunol*, 182 (2): 79-88, 1997.
- 67-*Proust JJ, Kittur DS, Buchholz MA, Nordin AA.* ; “RESTRICTED EXPRESSION OF MITOGEN-INDUCED HIGH AFFINITY IL-2 RECEPTORS IN AGING MICE”; *J Immunol.* ; 141(12):4209-16, Dec. 15, 1998.
- 68-*Nagel JE, Chopra RK, Chrest FJ, McCoy MT, Schneider EL, Holbrook NJ, Adler WH*; “DECREASED PROLIFERATION, INTERLEUKIN 2 SYNTHESIS, AND INTERLEUKIN 2 RECEPTOR EXPRESSION ARE ACCOMPANIED BY DECREASED MRNA EXPRESSION IN PHYTOHEMAGGLUTININ-STIMULATED CELLS FROM ELDERLY DONORS”; *J Clin. Invest.*, 81(4): 1096-102, Apr. 1988.

- 69-Damjanovich S, Gaspar R Jr, Bene L, Jenei A, Matyus L.;
“SIGNAL TRANSDUCTION IN TLYMPHOCYTES AND AGING”;
Review. Exp. Gerontol., 38 (3): 231-6, 2003
- 70-Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA.; “REACTIVE OXYGEN
INTERMEDIATES AS APPARENTLY WIDELY USED MESSENGERS IN
THE ACTIVATION OF THE NF-KAPPA B TRANSCRIPTION FACTOR
AND HIV-1”; Embo J, 10 (8): 2247-58, 1991.
- 71-Trebilcock GU, Ponnappan U.; “EVIDENCE FOR LOWERED
INDUCTION OF NUCLEAR FACTOR KAPPA B IN ACTIVATED HUMAN
T LYMPHOCYTES DURING AGING”; Gerontology, 42 (3): 137-46,
1996.
- 72-Effros RB.; “LONG-TERM IMMUNOLOGICAL MEMORY AGAINST
VIRUSES”; Review. Mech Ageing Dev. 121(1-3):161-71, Dec.
20, 2000.
- 73-Kourilsky P. and Truffa-Bachi Paolo; “CYTOKINE FIELDS AND
THE POLARIZATION OF THE IMMUNE RESPONSE”; Trends in
Immunology, 22:502-9, 2001.
- 74-Franceschi C, Monti D, Barbieri D, Grassilli E, Troiano L et
al; ”IMMUNOSENESCENCE IN HUMANS: DETERIORATION OR
REMODELLING?”; Intern. Rev. Immunol., 12: 57-74, 1995.
- 75-Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M et
al.; “INFLAMM-AGING. AN EVOLUTIONARY PERSPECTIVE ON

IMMUNOSENESCENCE”; *Annals N Y Acad. Sci.*, 908:208-18, 2000c.

76-*Caruso C, Lio D, Cavallone L, Franceschi C*; “AGING, LONGEVITY, INFLAMMATION, AND CANCER”; Review. *Annals N Y Acad. Sci.*, 1028: 1-13, Dec. 2004.

77-*Carrieri G, Marzi E, Olivieri F, Marchegiani F, Cavallone L, Cardelli M, Giovagnetti S, Stecconi R, Molendini C, Trapassi C De Benedictis G, Kletsas D, Franceschi C.*; “ THE G/C915 POLYMORPHISM OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA1 IS ASSOCIATED WITH HUMAN LONGEVITY: A STUDY IN ITALIAN CENTENARIANS”; *Aging Cell.*, 3 (6): 443-8, Dec. 2004.

78-*Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, Cevenini E, Castellani GC, Salvioli S.*; “INFLAMMAGING AND ANTI-INFLAMMAGING: A SYSTEMIC PERSPECTIVE ON AGING AND LONGEVITY EMERGED FROM STUDIES IN HUMANS”; Review. *Mech Ageing Dev.*, 128(1): 92-105, Jan. 2007.

79-*Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, Tsuji T, Yachie A, Yonehara S, Taniguchi N.*; “DIFFERENTIAL EXPRESSION OF APOPTOSIS RELATED FAS ANTIGEN ON LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD”; *J. Immunol.*, 149 (11): 3753-8, 1992.

- 80 -*Aggarwal S, Gupta S.*; “INCREASED APOPTOSIS OF T CELL SUBSETS IN AGING HUMANS: ALTERED EXPRESSION OF FAS (CD95), FAS LIGAND, BCL-2, AND BAX”; *J. Immunol.*, 160 (4): 1267-37, 1998.
- 81 -*Herndon FJ, Hsu HC, Mountz JD.*; “INCREASED APOPTOSIS OF CD45RO- T CELLS WITH AGEING”; *Mech. Ageing Dev.*, 94 (1-3): 123-34, 1997.
- 82 -*Aspinall R, Carroll J, Jiang S.*; “AGE-RELATED CHANGES IN THE ABSOLUTE NUMBER OF CD95 POSITIVE CELLS IN T CELL SUBSETS IN THE BLOOD”; *Exp. Gerontol.*, 33 (6): 581-91, 1998.
- 83 -*Proust JJ, Filburn CR, Harrison SA, Buchholz MA, Nordin A A.*; “AGE-RELATED DEFECT IN SIGNAL TRANSDUCTION DURING LECTIN ACTIVATION OF MURINE T LYMPHOCYTES”; *J. Immunol.*, 139 (5): 1472-8, 1987.
- 84 -*Quadri RA, Plastre O, Phelouzat MA, Arbogast A, Proust JJ.*; “AGE-RELATED TYROSINE SPECIFIC PROTEIN PHOSPHORYLATION DEFECT IN HUMAN T LYMPHOCYTES ACTIVATED THROUGH CD3, CD4, CD8 OR THE IL-2 RECEPTOR”; *Mech. Ageing Dev.*, 88 (3): 125-38, 1996.
- 85 -*Gamble DA, Schwab R, Weksler ME, Szabo P.*; “DECREASED STEADY STATE C-MYC MRNA IN ACTIVATED T CELL CULTURES FROM OLD HUMANS IS CAUSED BY A SMALLER PROPORTION OF T CELLS THAT TRANSCRIBE THE C-MYC GENE”; *J. Immunol.*, 144 (9): 3569-73, 1990.

- 86 -*Pieri C, Recchioni R, Moroni F, Marcheselli F, Lipponi G.*; “Phytohemagglutinin induced changes of membrane lipid packing, c-myc and c-myb encoded protein expression in human lymphocytes during aging”; *Mech. Ageing Dev.*, 64 (1-2): 177-87, 1992.
- 87 -*Whisler RL, Beiqing L, Chen M.*; “AGE-RELATED DECREASES IL-2 PRODUCTION BY HUMAN T CELLS ARE ASSOCIATED WITH IMPAIRED ACTIVATION OF NUCLEAR TRANSCRIPTIONAL FACTORS AP-1 AND NF-AT”; *Cell Immunol.*, 169 (2): 185-95, 1996.
- 88 -*Proust JJ, Kittur DS, Buchholz MA, Nordin AA.*; “RESTRICTED EXPRESSION OF MITOGEN-INDUCED HIGH AFFINITY IL-2 RECEPTORS IN AGING MICE”; *J Immunol.* 15, 141(12): 4209-16, Dec. 1998.
- 89 -*Nagel JE, Chopra RK, Chrest FJ, McCoy MT, Schneider EL, Holbrook NJ, Adler WH.*; “DECREASED PROLIFERATION, INTERLEUKIN 2 SYNTHESIS, AND ILNTERLEUKIN 2 RECEPTOR EXPRESSION ARE ACCOMPANIED BY DECREASED MRNA EXPRESSION IN PHYTOHEMAGGLUTININ-STIMULATED CELLS FROM ELDERLY DONORS”; *J. Clin. Invest.*, 81 (4): 1096-102, 1988.
- 90 -*Weng NP, Levine BL, June CH, Hodes RJ.*; “HUMAN NAÏVE AND MEMORY T LYMPHOCYTES DIFFER IN TELOMERIC LENGTH AND REPLICATIVE POTENTIAL”; *Proc. Natl. Ac ad. sci. USA*, 92 (24): 11091-4, 1995.

- 91 -*Abbas A., Lichtman A., Pober J.*; “IMMUNOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE”; Ed. PICCIN, 2002.
- 92 -*Wyllie A.H., J.F. Kerr & A.R. Currie*; “CELL DEATH: THE SIGNIFICANCE OF APOPTOSIS”; *Int Rev Cytol* 68, 251-306, 1980
- 93 -*Savill J., V. Fadok, P. Henson & C. Haslett*; “PHAGOCYTE RECOGNITION OF CELLS UNDERGOING APOPTOSIS”. *Immunol Today* 14, 131-136, 1993
- 94 -*Fadok V.A., D.L. Bratton, A. Konowal, P.W. Freed, J.Y. Westcott & P.M. Henson*; “MACROPHAGES THAT HAVE INGESTED APOPTOTIC CELLS IN VITRO INHIBIT PROINFLAMMATORY CYTOKINE PRODUCTION THROUGH AUTOCRINE/PARACRINE MECHANISMS INVOLVING TGF-BETA, PGE2, AND PAF”; *J Clin Invest* 101, 890-898; 17. Uchimura E., T. Kodaira, 1998.
- 95 -*Fadok V.A., D.R. Voelker, P.A. Campbell, J.J. Cohen, D.L. Bratton & P.M. Henson*; “EXPOSURE OF PHOSPHATIDYLSERINE ON THE SURFACE OF APOPTOTIC LYMPHOCYTES TRIGGERS SPECIFIC RECOGNITION AND REMOVAL BY MACROPHAGES”; *J Immunol* 148, 2207-2216, 1992.
- 96 -*Fadok V.A., A. de Cathelineau, D.L. Daleke, P.M. Henson & D.L. Bratton*; “LOSS OF PHOSPHOLIPID ASYMMETRY AND SURFACE EXPOSURE OF PHOSPHATIDYLSERINE IS REQUIRED FOR PHAGOCYTOSIS OF APOPTOTIC CELLS BY MACROPHAGES AND FIBROBLASTS”; *J Biol Chem* 276, 1071-1077, 2001.

- 97 -Hall S.E., J.S. Savill, P.M. Henson & C. Haslett; “APOPTOTIC NEUTROPHILS ARE PHAGOCYTOSED BY FIBROBLASTS WITH PARTICIPATION OF THE FIBROBLAST VITRONECTIN RECEPTOR AND INVOLVEMENT OF A MANNOSE/FUCOSE-SPECIFIC LECTIN”; *J Immunol* 153, 3218-3227, 1994.
- 98 -Dini L., F. Autuori, A. Lentini, S. Oliverio & M.Piacentini; “THE CLEARANCE OF APOPTOTIC CELLS IN THE LIVER IS MEDIATED BY THE ASIALOGLYCOPROTEIN RECEPTOR”; *FEBS Lett* 296, 174-178, 1992.
- 99 -Duvall E., A.H. Wyllie & R.G. Morris; “MACROPHAGE RECOGNITION OF CELLS UNDERGOING PROGRAMMED CELL DEATH (APOPTOSIS)” *Immunology* 56, 351-358, 1985.
- 100-Spano A., Sciola L., Monaco G., Barni S.; “RELATIONSHIP BETWEEN ACTIN MICROFILAMENTO AND PLASMA MEMBRANE CHANGES DURING APOPTOSIS OF NEOPLASTIC CELL LINES IN DIFFERENT CULTURE CONDITIONS” *Eur. J Histochem*, 44 (3): 255-67, 2000.
- 101-Hoffmann, P.R. et al.; “PHOSPHATIDYLSERINE (PS) INDUCES PS RECEPTOR-MEDIATED MACROPINOCYTOSIS AND PROMOTES CLEARANCE OF APOPTOTIC CELLS”; *J. Cell Biol.* 155, 649–659, 2001.

- 102-*Giancotti, F.G. and Ruoslahti, E*; “INTEGRIN SIGNALING”; Science 285, 1028–1032, 1999.
- 103-*Savill J., N. Hogg, Y. Ren & C. Haslett*; “THROMBOSPONDIN COOPERATES WITH CD36 AND THE VITRONECTIN RECEPTOR IN MACROPHAGE RECOGNITION OF NEUTROPHILS UNDERGOING APOPTOSIS”; J Clin Invest 90, 1513- 1522., 1992.
- 104 -*Stern M., J. Savill & C. Haslett*; “HUMAN MONOCYTE DERIVED MACROPHAGE PHAGOCYTOSIS OF SENESCENT EOSINOPHILS UNDERGOING APOPTOSIS. MEDIATION BY ALPHA V BETA 3/CD36/THROMBOSPONDIN RECOGNITION MECHANISM AND LACK OF PHLOGISTIC RESPONSE”; Am J Pathol 149, 911-921, 1996.
- 105-*Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C.*; “Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis”; Clin Invest, 90- 1513-22, 1992.
- 106-*Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C*; “Vitronectin receptor mediated phagocytosis of cell undergoing apoptosis”; Nature, 343: 170-3, 1990.
- 107-*Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA*; “CD36 is a receptor for oxidised low density lipoprotein”; Biol Chem, 268: 11811-6, 1993.

- 108-*Maniatopoulos C., Sodek J. and Melcher A.H.*; “BONE FORMATION IN VITRO BY STROMAL CELLS OBTAINED FROM BONE MARROW OF YOUNG ADULT RATS”; *Cell Tissue Res.* 254, 3177330, 1988.
- 109-*George R. Beck, Jr*, Brad Zerler, and Elizabeth Moran*; “PHOSPHATE IS A SPECIFIC SIGNAL FOR INDUCTION OF OSTEOPONTIN GENE EXPRESSION” *PNAS.*97:8352–8357, 125, 2000.
- 110-*Ligthart GJ, Corberand JX, Hart R, Galanaud P, Hijmans W, Kennes B, Muller-Hermelink HK, Steinmann GG.*; “ADMISSION CRITERIA FOR IMMUNOGERONTOLOGICAL STUDIES IN MAN: THE SENIEUR PROTOCOL”; *Mech Ageing Dev.*, 28:47-55, 1984.
- 111-*Ligthart GJ, Corberand JX, Geertzen HGM, Meinders AE, Knook DL, Hijmans W.*; “NECESSITY OF THE ASSESSMENT OF HEALTH STATUS IN HUMAN IMMUNOGERONTOLOGICAL STUDIES: EVALUATION OF THE SENIEUR PROTOCOL”; *Mech Ageing Dev.* 55:89-105, 1990.
- 112-*Boyum A.*; “ISOLATION OF LYMPHOCYTES, GRANULOCYTES AND MACROPHAGES”, *Scand. J. Immunol.*, Vol. 5, 9-15, 1976.
- 113-*Boyum A.*; “ISOLATION OF LEUKOCYTES FROM HUMAN BLOOD. FURTHER OBSERVATIONS”; *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21 (suppl. 97). 31-50, 1968.

114-L. B. Buravkova, Y. A. Romanov: The role of cytoskeleton in cell changes under condition of simulated microgravity. *Acta Astronaut.* 2001, 48: 647-650.

115-M.A. Meloni, G. Galleri, P. Pippia, M. Cogoli-Greuter; "CYTOSKELETON CHANGES AND IMPAIRED MOTILITY OF MONOCYTES AT MODELLED LOW GRAVITY." *Protoplasma*, 229: 243-249, 2006.