

Università degli studi di Pisa

Dipartimento di Oncologia,
dei Trapianti e delle Nuove Tecnologie in Medicina

Dottorato di ricerca in chirurgia, biotecnologie e immunologia
dei trapianti

Presidente del dottorato: Prof. Franco Mosca

a.a. 2007-2008

Titolo:

**Ruolo delle microparticelle (MP) di derivazione
monocitica/macrofagica nell'infiammazione delle vie aeree.**

Candidata:

Dott.ssa Cerri Chiara

Tutor:

Dott.re Alessandro Celi

INDICE

RIASSUNTO	3
SUMMARY	5
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE	6
1.1 LE MICROPARTICELLE	6
1.1.1 Osservazioni storiche	6
1.1.2 Formazione delle MP	7
1.1.3 Composizione delle MP	9
1.1.4 Funzioni delle MP	10
1.2 Epitelio delle vie aeree	11
1.2.1 Cenni di anatomia	12
1.2.2 Funzioni dell'epitelio delle vie aeree	13
1.3: L'inflammatione	15
1.3.1 Caratteristiche generali	15
1.3.2 Le citochine	16
1.3.3 Le Chemochine	17
1.3.4 IL-8 (Interleukine-8)	19
1.3.5 MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1)	20
1.4 Molecole di adesione	22
1.4.1 Integrine	22
1.4.2 Proteine Ig-like	23
1.4.3 Selettine	23
1.4.4 Recettori delle selettine	24
CAPITOLO 2: SCOPO DELLA TESI	25
CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI	26
3.1 Materiali	26
3.1.1 Reagenti e kit	26
3.1.2 Anticorpi, citochine e chemochine	26
3.2 Metodi	27
3.2.1 Culture cellulari	27
3.2.2 Isolamento di monociti e generazione di MP	28
3.2.3 Colorazione della membrana cellulare	29
3.2.4 Analisi tramite la citofluorimetria a flusso (FACS)	29
3.2.5 Attivazione delle cellule epiteliali con MP	30
3.2.6 Elisa per la cattura di chemochine	30
3.2.7 Misurazione dell'espressione di ICAM-1 sulla superficie cellulare	31
3.2.8 Primers e reagenti per RT-PCR	31
3.2.9 Presentazione dei dati ed analisi statistica	33
CAPITOLO 4: RISULTATI	34
4.1 Analisi citofluorimetrica della formazione delle MP indotta dal calcio ionoforo, A23187. ...	34
4.2 Le MP originate dai monociti/macrofagi sovraregolano la secrezione di IL-8 da parte delle cellule epiteliali delle vie aeree.	35
4.3 Effetti delle MP originate dai monociti/macrofagi sull'espressione di altri mediatori delle cellule epiteliali delle vie aeree.	40
4.4 Effetti dell'istamina sulla produzione di MP da parte dei monociti/macrofagi.	41
CAPITOLO 5: DISCUSSIONE	43
BIBLIOGRAFIA	47

RIASSUNTO

Le microparticelle (MP) sono frammenti di membrana che possono essere rilasciati virtualmente da tutte le cellule eucariotiche in seguito ad attivazione o durante il processo di apoptosi e che svolgono un ruolo importante in processi fisiologicamente rilevanti, inclusi la coagulazione e l'infiammazione. In questo studio si è indagato sul ruolo delle microparticelle (MP) di derivazione monocitica/macrofagica nella modulazione e nell'attivazione delle cellule epiteliali umane delle vie aeree.

I monociti/macrofagi sono stati isolati da buffy coats ricavati dal sangue di donatori mediante centrifugazione su gradiente di densità con Ficoll, seguito da una cultura overnight della frazione di cellule mononucleate isolate.

Le cellule che rimangono adese alla piastra da cultura sono lavate e poi incubate con calcio ionoforo, A23187 o con istamina. Le MP contenute nel surnatante sono incubate con la linea di cellule epiteliali bronchiali umane BEAS-2B e la linea di cellule alveolari umane A549.

Infine, in tali cellule, si dosa l'espressione di IL-8, MCP-1, e ICAM-1 con test ELISA e RT-PCR.

Inoltre in alcuni esperimenti i monociti/macrofagi sono marcati con un colorante fluorescente intercalante i lipidi, PKH67, e il surnatante così trattato è analizzato con il FACS.

La stimolazione dei monociti/macrofagi con A23187 causa il rilascio di particelle che trattengono la fluorescenza dei lipidi marcati con il colorante, indicando così che derivano dalle membrane cellulari dei monociti/macrofagi stessi. L'incubazione di queste particelle con le cellule A549 e le BEAS-2B aumenta l'espressione della sintesi di IL-8.

L'ultrafiltrazione e l'ultracentrifugazione di questo materiale (surnatante dei monociti/macrofagi stimolati con A23187) inibisce l'effetto, indicando che ciò dipende dalla presenza nel mezzo di materiale particolato, piuttosto che dalla presenza di molecole solubili.

E' stata dimostrata anche una sovraregolazione di MCP-1 e di ICAM-1 da parte delle cellule A549.

Risultati simili sono stati ottenuti anche stimolando le cellule con l'istamina. I dati ottenuti mostrano che i monociti/macrofagi umani sono in grado di rilasciare MP che sembrano essere coinvolte nei processi infiammatori ed immunitari dell'epitelio delle vie aeree, contribuendo potenzialmente alla patogenesi dei disturbi infiammatori dei polmoni attraverso la sovraregolazione dei mediatori pro-infiammatori.

SUMMARY

Cell derived microparticles are membrane fragments shed by virtually all eukaryotic cells upon activation or during apoptosis that play a significant role in physiologically relevant processes, including coagulation and inflammation. We investigated whether microparticles derived from monocytes/macrophages have the potential to modulate human airway epithelial cell activation.

Monocytes/macrophages were isolated from the buffy coats of blood donors by Ficoll gradient centrifugation followed by overnight culture of the mononuclear cell fraction. Adherent cells were washed and incubated with the calcium ionophore, A23187 or with histamine. The MP-containing supernatant was incubated with cells of the human bronchial epithelial line BEAS-2B and of the human alveolar line A549. IL-8, MCP-1, and ICAM-1 production was assessed by ELISA and by RT-PCR. In some experiments, monocytes/macrophages were stained with the fluorescent lipid intercalating dye PKH67 and the supernatant was analyzed by FACS.

Stimulation of monocytes/macrophages with A23187 caused the release of particles that retain their fluorescent lipid intercalating label, indicating that they are derived from cell membranes. Incubation with A549 and BEAS-2B cells upregulate IL-8 synthesis. Ultrafiltration and ultracentrifugation of the material abolished the effect, indicating that particulate matter, rather than soluble molecules, is responsible for it. Upregulation of MCP-1 and ICAM-1 was also demonstrated in A549 cells. Similar results were obtained with histamine.

Our data show that human monocytes/macrophages release microparticles that have the potential to sustain the innate immunity of the airway epithelium as well as to contribute to the pathogenesis of inflammatory diseases of the lungs through upregulation of proinflammatory mediators.

CAPITOLO 1 INTRODUZIONE

1.1 LE MICROPARTICELLE

1.1.1 Osservazioni storiche

Le Microparticelle (MP) sono state per la prima volta descritte nel 1967 da Wolf come frammenti piastrinici del plasma umano: chiamò questi frammenti "platelet dust" ("polvere piastrinica"). Questa "polvere" conteneva vescicole, più piccole di $0,1 \mu\text{m}$ in diametro, che promuovevano la coagulazione così come fanno le piastrine intatte (VanWijk M. et al., 2003). Negli ultimi anni l'interesse per quelle che oggi sono comunemente chiamate microparticelle è cresciuto supportato da numerose evidenze sperimentali. *Satta* e collaboratori hanno misurato l'attività del fattore tissutale su monociti e sul sovranatante dei monociti sia in condizioni basali, sia in seguito a stimolazione con endotossina batterica (lipopolisaccaride, LPS). Il fattore tissutale, iniziatore della coagulazione, è una proteina di membrana e funziona solo se legato alla membrana cellulare. *Satta* osservò che il sovrinatante dei monociti stimolati conteneva fattore tissutale funzionalmente attivo, e questo significava che il sovrinatante dopo la stimolazione conteneva parti di membrana a cui era legato fattore tissutale funzionalmente attivo (Satta N. et al., 1994).

L'esistenza delle MP finora evidenziata in vitro è stata provata anche in relazione a situazioni patologiche di diversa gravità. Sono stati messi a confronto, infatti, il plasma umano di individui sani con il plasma di individui affetti da angina stabile, angina instabile e di individui colpiti da infarto del miocardio. È stato osservato che MP circolanti sono presenti in quantità maggiore in relazione alla patologia di questi individui (Mallat et al., 2001). *Combes* e collaboratori hanno osservato che nel plasma di pazienti con anticoagulanti del Lupus sono presenti MP circolanti che esprimono marcatori endoteliali. In vitro la presenza delle MP è stata evidenziata marcando le membrane di cellule HUVEC, stimulate da TNF, con un marcatore che si intercala tra i fosfolipidi di membrana. In questo modo si

sono osservati esclusivamente i frammenti di membrana che esprimevano i marcatori endoteliali (Combes et al., 1999). In seguito a queste e ad altre osservazioni, è chiaro che diversi tipi cellulari possono rilasciare MP e che la loro generazione potrebbe non essere l'effetto collaterale della manipolazione cellulare ma che possono essere attivamente coinvolte fisiologicamente e fisiopatologicamente. Recentemente, Morel (Morel et. al., 2008) ha dimostrato che l'attivazione delle cellule endoteliali contribuisce al rilascio di MP procoagulanti durante il rigetto cardiaco acuto. In vitro, il rilascio di MP è stato mostrato derivare da cellule endoteliali, cellule del muscolo vascolare liscio, piastrine, leucociti, linfociti ed eritrociti. Alcune di queste popolazioni di MP si ritrovano nel sangue di individui sani e di pazienti. E' ovvio che il numero, l'origine cellulare e la composizione delle MP cambia come popolazione nelle varie condizioni patologiche. L'impatto di queste variazioni sui suoi effetti in vivo, però, è ancora poco conosciuto.

1.1.2 Formazione delle MP

Ad oggi sono conosciuti due distinti processi cellulari che possono portare alla formazione delle MP: l'attivazione cellulare e l'apoptosi (Fig. 1). Non è noto se l'attivazione cellulare e l'apoptosi portano alla formazione di MP simili in termini di dimensioni, composizione di lipidi e proteine ed effetti fisiopatologici.

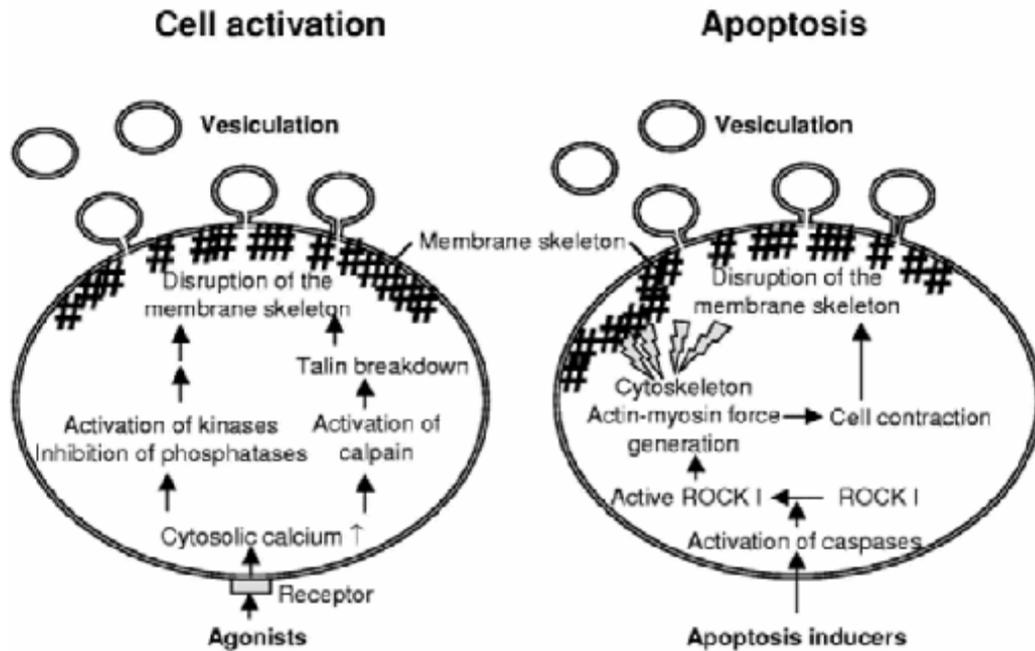


Fig. 1: Rappresentazione schematica dei meccanismi generali in cui è implicata la formazione delle MP: attivazione cellulare (pannello a sinistra) e apoptosi (pannello a destra).

L'attivazione cellulare

Le MP si possono formare durante l'attivazione cellulare attraverso diversi meccanismi innescati da specifici agonisti. Le piastrine, ad esempio, sono attivate da trombina, calcio ionoforo A23187, ADP più collagene, dal complesso terminale del complemento C5b-9 o mediante stress ossidativo. I monociti, le cellule endoteliali, gli epatociti e le cellule muscolari lisce dei vasi rilasciano MP dopo attivazione tramite LPS, citochine (come il TNF- α o IL-1), il complesso C5b-9 o l'idroperossido.

In generale, il rilascio di MP associato all'attivazione di cellule è tempo e calcio dipendente. Il rilascio inizia dopo qualche minuto dall'aggiunta di un agonista. Uno dei primi segnali dell'attivazione cellulare è l'aumento della concentrazione del calcio citosolico, specialmente nel sito della vescicolazione. Subito dopo, l'aumento di calcio citosolico attiva le chinasi, inibisce le fosfatasi ed attiva la calpaina. La chelazione degli ioni Ca^{++} extracellulari tramite EGTA blocca l'incremento del Ca citosolico come anche il rilascio di MP. Quindi, l'aumento di Ca citosolico è importante per il rilascio

di MP. La formazione delle MP richiede l'abbattimento dello scheletro di membrana, il sistema subcellulare che sostiene la membrana cellulare con stabilità strutturale. Questo scheletro di membrana è costituito principalmente da actina, vinculina e talina.

L'esatta interazione tra la membrana cellulare e lo scheletro di membrana, che permette la formazione delle MP, è ancora sconosciuta.

Apoptosi cellulare

L'apoptosi è caratterizzata da una contrazione cellulare, frammentazione del DNA, e blebbing dinamico di membrana. Simili blebs possono differire dalle MP generate per attivazione cellulare, in termini di taglia, composizione di lipidi e proteine ed effetti fisiopatologici. La forza contrattile generata dalle strutture citoscheletriche d'actina-miosina sembra condurre alla formazione dei blebs di membrana. Il blebbing apoptotico di membrana dipende dall'attivazione delle chinasi Rho-associate, ROCK I. Si ritiene che la differenza sostanziale tra le MP generate per attivazione cellulare e le MP generate in seguito al processo apoptotico è che queste ultime possano contenere frammenti di DNA.

1.1.3 Composizione delle MP

Le membrane delle MP consistono prevalentemente di lipidi e proteine. La loro composizione dipende dalla cellula da cui prendono origine e dal processo cellulare che ha portato alla loro formazione. Per quanto riguarda la composizione lipidica, le MP sono circondate da un bilayer fosfolipidico. Nelle cellule a riposo le varie specie di fosfolipidi sono distribuite asimmetricamente nel bilayer. Questa distribuzione asimmetrica di fosfolipidi è generalmente disturbata durante la formazione delle MP, portando all'esposizione di fosfolipidi carichi negativamente sulla superficie delle MP, come la fosfatidilserina e la fosfatidiletanolamina (Fig. 2).

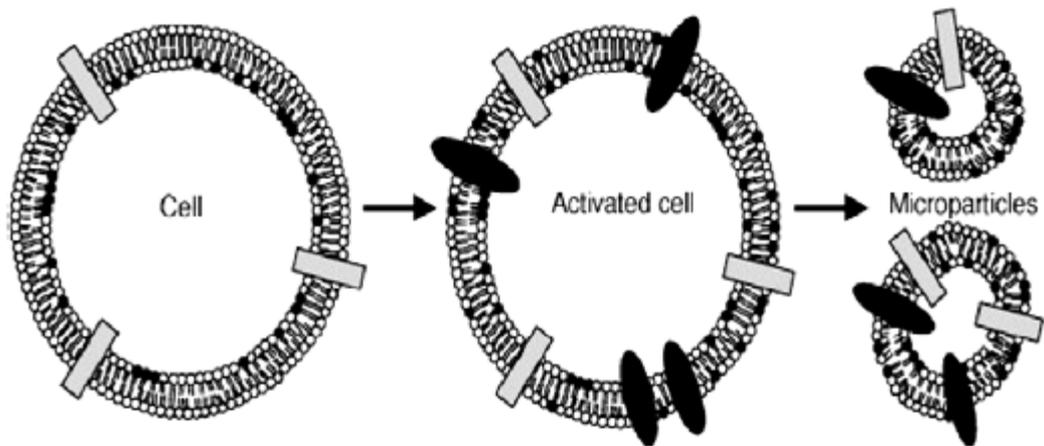


Fig. 2: Rappresentazione schematica della generazione e della composizione delle MP.

Quello che fino ad ora è noto sulla composizione lipidica delle MP è che la percentuale dei fosfolipidi che compongono il doppio strato di membrana è differente in individui sani e nei pazienti; questo può voler significare che le MP nei due casi si siano formate da cellule diverse oppure che stimoli differenti producono MP con una diversa composizione lipidica. Per quanto riguarda la composizione proteica possiamo invece dire che MP di derivazione cellulare differente espongono antigeni di membrana che sono specifici della cellula da cui originano.

1.1.4 Funzioni delle MP

Le MP circolanti derivano principalmente da piastrine, ma anche da eritrociti, leucociti e cellule endoteliali. Per questo motivo si ritiene che le MP possano avere varie funzioni fisio-patologiche dirette o indirette, derivate dalle cellule da cui originano. Alle MP sono state attribuite funzioni nella patogenesi delle malattie cardiovascolari, dall'infiammazione alla coagulazione e alle funzioni vascolari (Ardoin et al.,2007).

Infiammazione

L'adesione dei monociti e dei neutrofili all'endotelio è un evento precoce nelle sindromi infiammatorie e vascolari; questo processo avviene in quanto le cellule endoteliali espongono recettori d'adesione specifici per le varie classi di leucociti in modo da attrarre quest'ultimi alla parete vascolare. I ligandi

specifici per i recettori d'adesione sono esposti sui leucociti, come anche sulle MP derivate dai leucociti stessi, per cui alcuni di questi ligandi sono coinvolti nell'adesione delle MP derivate dai leucociti alle cellule endoteliali.

Coagulazione

Nel processo coagulativo vengono richiesti non solo fattori di coagulazione attivi e ioni calcio, ma anche superfici procoagulanti, ovvero membrane che espongono fosfolipidi carichi negativamente, capaci di facilitare il legame dei fattori di coagulazione alla membrana, attivando i complessi noti con il nome di tenasi e protrombinasi. Ci sono sostanziali evidenze in vitro per l'implicazione delle MP nell'attivazione del sistema di coagulazione.

Funzioni vascolari

Oltre a infiammazione e coagulazione le MP sono coinvolte anche nella modulazione delle funzioni vascolari. E' stato infatti descritto recentemente che le MP da pazienti con infarto acuto diminuiscono il rilassamento endotelio-dipendente nelle arterie isolate; al contrario, MP isolate da soggetti sani non hanno tale effetto. Questa è una prima dimostrazione di un effetto diretto delle MP sulla funzione vascolare.

1.2 Epitelio delle vie aeree

Le vie aeree sono rivestite da una varietà di cellule specializzate con un'ampia gamma di funzioni importanti nel mantenimento dell'omeostasi. Tali funzioni includono la regolazione del bilancio delle secrezioni polmonari, il metabolismo e la clearance delle sostanze inalate, l'attrazione ed attivazione delle cellule infiammatorie in risposta al danno e la regolazione della funzione delle cellule muscolari lisce bronchiali mediante la secrezione di numerosi mediatori. Inoltre, l'epitelio è anche la sede di primo contatto tra l'organismo e tutta una serie di stimoli ambientali. Quindi il danno dell'epitelio può contribuire in modo sostanziale all'infiammazione e alle sue manifestazioni a livello polmonare (Davies, 2001).

1.2.1 Cenni di anatomia

L'epitelio delle vie aeree comprende molti tipi cellulari diversi, che in base a funzione, ultrastruttura e caratteristiche biochimiche, possono essere raggruppate in tre distinte categorie (Spina, 1998):

- cellule basali
- cellule ciliate
- cellule secretorie

In aggiunta alle cellule propriamente epiteliali, altri tipi cellulari possono migrare e rimanere all'interno dell'epitelio o passare nel lume, ad esempio le cellule che prendono parte alla risposta infiammatoria o immunitaria quali i mastociti, le cellule dendritiche, i macrofagi, i linfociti intraepiteliali.

Un altro elemento che si osserva nella struttura epiteliale delle vie aeree sono le terminazioni nervose del sistema sensitivo e colinergico. La fisiologia delle cellule epiteliali è profondamente influenzata dalla composizione biochimica dell'ambiente extracellulare e dalle condizioni delle cellule adiacenti. Anche l'organizzazione tridimensionale delle cellule epiteliali è strettamente dipendente dalle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare (Montefort et al., 1994). L'interazione tra cellula e cellula e cellula e matrice extracellulare è mediata da specifici recettori di superficie denominati integrine. Le integrine sono glicoproteine transmembrana costituite da eterodimeri di due subunità: α e β . Le α hanno la funzione di legare i ligandi specifici, le β hanno una funzione nella trasduzione del segnale (Hynes, 1992; Sheppard, 1996; Sheppard, 1998). Ad oggi si ritiene che le cellule epiteliali esprimano 9 differenti integrine (Sheppard, 1996; Sheppard, 1998), due delle quali ($\alpha3\beta1$ e $\alpha6\beta4$) riconoscono i componenti della membrana basale e fungono da vere e proprie molecole di adesione (Damjanovich et al., 1992). Le rimanenti integrine note riconoscono componenti della matrice extracellulare (extracellular matrix, ECM) che vengono prodotti in risposta al danno e all'infiammazione.

1.2.2 Funzioni dell'epitelio delle vie aeree

La concezione dell'epitelio come barriera passiva inerte è, ad oggi, completamente superata dalla scoperta di una serie di importanti funzioni attive dell'epitelio sia nel mantenimento dell'omeostasi che durante i processi patologici (Holgate, 1998; Holgate et al., 2000; Knight, 2001). La funzione barriera, inizialmente considerata l'unica, è esercitata dall'epitelio grazie alla presenza di una serie di strutture quali tight junctions, che impediscono la diffusione paracellulare passiva di elettroliti ed altre molecole, ma anche di desmosomi e giunzioni gap che contribuiscono al mantenimento dell'integrità della struttura epiteliale. Nelle malattie infiammatorie delle vie aeree si può avere un esteso coinvolgimento dell'epitelio con perdita degli strati cellulari superficiali ed attivazione delle cellule epiteliali superstiti e dei fibroblasti. Quindi, oltre a fungere da barriera agli agenti esterni, la superficie epiteliale dei bronchi regola una serie di reazioni che includono la protezione da agenti chimici e microbiologici, la modulazione del processo di riparazione attraverso la secrezione di proteine della matrice extracellulare e l'interazione con altre cellule coinvolte nello stesso processo, in particolar modo con i fibroblasti interstiziali (Tabella 1.1).

- Protezione dagli agenti esterni
- Regolazione del trasporto di fluidi e ioni tra superficie delle vie aeree ed il lume
- Secrezione mucosa e trasporto ciliare
- Interazione con/e reclutamento di cellule infiammatorie
- Attività antimicrobica
- Protezione da ossidanti e proteasi
- Modulazione del tono della muscolatura liscia delle vie aeree
- Modulazione dei processi di riparazione
- Interazione con le cellule del parenchima polmonare

Tabella 1.1: Funzioni dell'epitelio bronchiale (Robbins et al, 1997; Thompson et al, 1995).

La maggior parte di queste funzioni sono esercitate tramite la produzione di un complesso network di mediatori, fattori di crescita, chemochine e citochine (Tabella 1.2).

Molecola	Stimolo
Mediatori lipidici: PGE2, PGF2, TXB2, Leucotrieni	Leucotrieni, Bradichinine; Allergeni, O ³ PAF ET-1, Istamina
Citochine: IL-1, TNF α , IL-6, IL-11, LIF, IL-10	Virus, IL-1b, TGF β
Chemochine: IL-8, GRO-a, Gro-b, Rantes; MCP-1,4, Eutaxina	TNF- α , IL-1 β , virus, allergeni, rinovirus
Fattori di crescita: TGF β , EGF, PDGF	EGF, IL-1 β , ipossia
Proteine della ECM: Collagene tipo I e IV, FN, LN, acido ialuronico, CD44, MMP-1,2,3, MMP-7,9, TIMP-1,2	EGF, PDGF, TNF- α , PMA, infezioni batteriche, TGF- β
Mediatori peptidici: endotelina	LPS, citochine proinfiammatorie, IL-6, TGF- β
Molecole di adesione: ICAM-1, Ep-CAM, E,N,C-caderine	IL-1 β , TGF- β
Integrine: α -1,2,3,4,5,6,7,8,9 β -1,4,6,8	EGF

Tabella 1.2: Molecole espresse/prodotte dall'epitelio delle vie aeree (Knight et al. 2003)

1.3: L'infiammazione

1.3.1 Caratteristiche generali

L'infiammazione distrugge, diluisce o contiene l'agente nocivo ed allo stesso tempo innesca una serie di eventi che riparano e ricostituiscono il tessuto danneggiato. Una funzione critica dell'infiammazione è il reclutamento nel sito danneggiato delle cellule del sistema immunitario, i leucociti. Questo fenomeno, chiamato chemiotassi, si verifica tramite l'incremento locale del flusso ematico e attraverso mutamenti strutturali dei microvasi. I leucociti ingeriscono gli agenti tossici, uccidono i microorganismi, degradano il tessuto necrotico e gli antigeni estranei. Liberando enzimi, mediatori chimici e radicali dell'ossigeno o dell'azoto, i leucociti sostengono l'infiammazione e, oltre a ricoprire un ruolo effettore protettivo possono, in alcuni casi, indurre danni nei tessuti circostanti. Infatti, nel caso in cui, a causa di un alterato meccanismo regolatorio, lo stato infiammatorio si prolunghi, l'infiammazione può diventare nociva e risultare implicata nella patogenesi di numerose malattie. Più in dettaglio, l'infiammazione può essere definita di tipo acuto o cronico. L'infiammazione acuta rappresenta la risposta immediata ad un agente dannoso, è di durata relativamente breve (va da minuti ad alcuni giorni) ed è principalmente caratterizzata dalla formazione dell'edema e dalla migrazione dei leucociti, in prevalenza granulociti neutrofili.

L'infiammazione cronica, che è generalmente il risultato di stimoli persistenti, è di durata più lunga ed è caratterizzata, dal punto di vista istologico, dalla presenza di altri tipi di cellule leucocitarie (linfociti e macrofagi), dalla proliferazione dei vasi sanguigni e dalla fibrosi o dalla necrosi del tessuto. In alcuni casi l'infiammazione cronica può essere preceduta da una fase iniziale di infiammazione acuta, altre volte inizia in maniera asintomatica e con un'intensità ridotta.

L'infiammazione cronica può verificarsi:

- in seguito ad infezioni persistenti dovute a microorganismi che riescono a sfuggire al controllo del sistema immune, come ad

- esempio il *Mycobacterium tuberculosis* (agente eziologico della tubercolosi) o il *Treponema pallidum* (che causa la sifilide);
- in seguito all'esposizione prolungata ad agenti potenzialmente tossici di origine esogena o endogena;
 - a causa di fenomeni di autoimmunità.

Le cellule coinvolte nell'infiammazione cronica prima vengono reclutate nel sito dell'infiammazione e poi vengono attivate; dopodiché rilasciano innumerevoli fattori solubili che mediano il danno e la fibrosi del tessuto. Tali molecole svolgono un ruolo chiave nell'inizio e nell'esecuzione della risposta infiammatoria e tra le loro funzioni principali vi è l'induzione della dilatazione dei vasi, la chemiotassi, l'adesione e l'attivazione dei leucociti, la tossicità diretta nei confronti del microrganismo invasore, la proliferazione dei fibroblasti, la deposizione del collagene e l'angiogenesi (Larsen et al., 1983, Shanley et al., 1995). Di grande rilevanza fra questi mediatori sono le citochine.

1.3.2 Le citochine

Sono molecole di natura proteica, che agiscono anche a bassissime concentrazioni, interagendo mediante legami ad alta affinità con recettori specifici espressi sulle cellule bersaglio. Le citochine mediano la comunicazione intercellulare intervenendo nell'indirizzo, nella regolazione e nella terminazione dei processi infiammatori. Esse costituiscono una trama complessa di relazioni e, dalla loro reciproca regolazione, dipende l'esito finale dei processi biologici che vengono regolati. Un aspetto importante è legato alle quantità di mediatori solubili che vengono prodotti in risposta ad uno stimolo. Ad esempio, il rilascio extracellulare di bassi livelli di una citochina proinfiammatoria, può aumentare l'espressione di altre citochine e delle molecole di adesione per i leucociti, tutti fattori che amplificano la cascata infiammatoria; al contrario, livelli elevati di essa, possono danneggiare cellule o tessuti.

Per finire, poiché le citochine rappresentano degli strumenti estremamente efficaci nelle risposte immunitarie, che possono rivelarsi anche armi

pericolose, esiste in natura un complesso sistema atto a regolarne finemente l'attività. Le citochine ad esempio, possono essere prodotte in una forma immatura che viene attivata tramite il taglio operato da specifici enzimi rilasciati solo in determinate condizioni; possono esistere dei recettori solubili, oppure delle proteine dalla funzione analoga, che legandosi alla citochina bersaglio, ne neutralizzano l'azione impedendo che si leghi ai recettori di membrana; inoltre possono esistere delle molecole con la funzione di antagonisti recettoriali che, legandosi al recettore specifico, impediscono il legame della citochina e l'insorgere degli eventi biologici che essa influenza.

Queste e molte altre forme di controllo dell'attività di una citochina rappresentano un sistema di sicurezza attraverso il quale l'organismo si tutela dalla possibile azione nociva di queste molecole.

1.3.3 Le Chemochine

Le chemochine sono un sottogruppo di citochine con proprietà chemoattrattanti. Sono piccole proteine basiche (peso molecolare 8-12 kDa) che regolano il trafficking e l'attivazione di cellule di natura leucocitaria e non, in una serie di processi fisiologici e patologici. Tali molecole sono infatti in grado di controllare la migrazione direzionale di un'ampia varietà di tipi cellulari, che include tra gli altri, oltre ai leucociti, cellule endoteliali, fibroblasti e cellule epiteliali (Rollins, 1997).

Le chemochine prodotte durante il processo infiammatorio sono in grado di indurre, in sequenza, il rolling dei leucociti sull'endotelio, la loro adesione all'endotelio stesso, la diapedesi e la chemiotassi verso il sito di danno. Le chemochine, quindi, sono sia tra i principali determinanti della fisiopatologia delle malattie infiammatorie, che le responsabili della mobilitazione delle cellule coinvolte nella risposta immunitaria.

Le chemochine possono essere classificate in vario modo, in base alla loro derivazione cellulare, alla loro funzione o alla loro struttura. La famiglia delle chemochine può essere distinta in quattro sottofamiglie caratterizzate da due

a quattro residui cisteinici altamente conservati nella sequenza della molecola:

- α -chemochine (o CXC-chemochine), che hanno i due residui cisteinici NH₂-terminali tra loro separati da un aminoacido non conservato (X);
- •-chemochine (o CC-chemochine), che presentano due residui cisteinici giustapposti;
- •-chemochine (o C-chemochine), che contengono un solo residuo cisteinico in posizione NH₂-terminale;
- •-chemochine (o CX₃C-chemochine), che mostrano i due residui cisteinici tra loro separati da tre residui aminoacidici.

Le chemochine esercitano il loro effetto tramite il legame con recettori con 7 domini transmembrana, accoppiati a G-proteins. Tali recettori, una volta attivati dal legame con le chemochine, innescano una serie di meccanismi intracellulari che risultano nella formazione di Inositolo-trifosfato (IP₃), liberazione di Calcio e attivazione di Protein kinasi C. Ad oggi sono note 50 diverse chemochine e 19 recettori. Esiste una cosiddetta “promiscuità tra chemochine e recettori”, intesa come la capacità di alcuni recettori di legare più chemochine e di alcune chemochine di riconoscere più di un recettore (Proudfoot, 2002).

Sappiamo che le chemochine e i loro recettori sono espresse da un’ampia varietà di cellule non emopoietiche e la loro funzione va ben oltre la fisiologia dei leucociti.

Negli ultimi 10-15 anni alle chemochine è stato riconosciuto un ruolo in molte patologie tra cui l’aterosclerosi, le malattie autoimmuni, la sclerosi multipla, l’infezione da HIV e il cancro (Gerard et al., 2001; Thelen, 2001).

Molti dei geni che codificano per le chemochine sono stati mappati e raggruppati in specifici loci. Ad esempio, i geni per le chemochine CC si trovano sul cromosoma umano 14q12-21 mentre quelli per le CXC si trovano sul cromosoma umano 17q11.2-12.

Questo suggerisce che le chemochine derivino da una duplicazione e divergenza di un gene primordiale, che presto si è diviso in due loci. Poiché

animali quali il topo hanno un numero di chemochine inferiore rispetto all'uomo, si potrebbe pensare che questo split in due loci differenti sia avvenuto piuttosto recentemente in termini evolutivisti, sebbene nessuno ancora abbia studiato sistematicamente questo aspetto. Un fenomeno simile di clustering è stato descritto anche per i geni che codificano per i recettori delle chemochine (Rollins, 1997).

Chemochine CXC e CC				
Recettore per le chemochine	Ligando CXC per le chemochine	Ligando CC per le chemochine	Cellula bersaglio	Funzioni
CCR-1 CCR-3	-	MCP-2, -3, -4; MIP-1 α , RANTES MCP-3, -4 RANTES, eotaxina-1, -2	Eosinofili	Chemiotassi, attivazione
CCR-1, -2, -5	SDF-1, IL-8, IP-10	MCP-1, -2, -3, -4, -5, RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 α , 1- β , RANTES	Cellule T	Chemiotassi, proliferazione
CCR-5	-	MIP-1 α , RANTES	Mastociti	Chemiotassi, metabolismo
CCR-1 CCR-2 CCR-5 CXCR-4	SDF-1	MCP-3, -4, MIP-1 α , RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 α , 1- β , RANTES	Monociti	Chemiotassi, attivazione
CCR-5 CXCR-4	SDF-1	MIP-1 α , 1- β , RANTES	Cellule B	Chemiotassi, sintesi delle IgE, proliferazione
CCR-1, -8 CXCR-1 CXCR-2	IL-8, GCP-2 IL-8, GCP-2 Gro- α , - β , - γ ENA-78, NAP-2	MIP-1 α , I-309	Neutrofili	Chemiotassi, attivazione
CCR-2, -3	-	MCP-1, -2, -3, -4, RANTES, MIP-1 α	Basofili	-
CCR-2 CCR-5 CXCR-3	-	MCP-1, -2, -3, -4, -5 RANTES; MIP-1 α , 1- β IP-10	Cellule NK	Chemiotassi, attivazione
CCR-1 CCR-2 CCR-3 CCR-4 CCR-5	-	MCP-3, -4, MIP-1 α , RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4, eotaxina, RANTES MIP-1 α , -1 β , RANTES	Cellule dendritiche	-
-	-	I-309, MIP-1 α , MCP-1	Cellule muscolari lisce	Chemiotassi, proliferazione
CXCR-2	IL-8, Gro, ENA-78, GCP-2, PBR, NAP-2	MIP-1 β	Cellule endoteliali	Chemiotassi, proliferazione
CXCR-2	IL-8, Gro- α	MIP-1 α , HCC-1, MRP-2	Cellule staminali	Inibizione

Tabella 1.3: Classificazione delle chemochine

1.3.4 IL-8 (Interleukine-8)

IL-8 appartiene alla famiglia Cys-X-Cys. E' un piccolo polipeptide (P.M. 8kDa) prodotto da numerosi tipi cellulari, quali monociti, cellule epiteliali, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, fibroblasti e cellule nervose; la secrezione di IL-8 avviene attraverso processi di esocitosi. Il recettore di IL-8 appartiene alla famiglia dei recettori di tipo rodopsinico, caratterizzati dall'averne 7 domini transmembrana. IL-8 è un potente chemiotattico ed attivatore dei neutrofili, mentre ha poca attività sui monociti e sugli eosinofili.

Cellule epiteliali delle vie aeree in coltura primaria sintetizzano IL-8 costitutivamente (Mio, 1997); inoltre, i numerosi stimoli sono in grado di attivare la sintesi di questa molecola, tra cui l'infezione con il virus dell'influenza, l'IL-1 e il TNF- α . In questi ultimi anni sono stati effettuati studi sul ruolo della chemochina IL-8 in patologia. Questa molecola risulta coinvolta in processi infiammatori acuti e cronici, a livello dei quali può essere considerata sia un marcatore sia un mediatore. Infatti alte concentrazioni di IL-8 sono state osservate nell'espettorato indotto con inalazione di soluzione salina ipertonica, nei lavaggi broncoalveolari (BAL) e nel siero di soggetti con asma, con fibrosi cistica e con sindrome da distress respiratorio nell'adulto (Fahy, 1995). Inoltre l'infusione intratracheale di IL-8 causa la migrazione di neutrofili verso il tessuto bronchiale e all'interno dello spazio luminale *in vivo* (Jorens et al., 1992).

1.3.5 MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1)

MCP-1 è una chemochina appartenente alla famiglia delle chemochine CC, denominata anche CCL2. È un potente chemoattrattante per i monociti, i linfociti T attivati e le cellule NK (Natural Killer) (Zachariae et al., 1990; Fuentes et al., 1995; Rutledge et al., 1995; Gunn, et al., 1997; Rollins 2000). Gli effetti di MCP-1 sulla migrazione delle cellule mononucleate ne suggeriscono un importante ruolo nei processi infiammatori. Questa supposizione è stata valicata da studi condotti in vivo su modelli animali e studi epidemiologici condotti su popolazioni umane. Uno degli esempi più caratteristici sono le patologie cardiovascolari. Il modello oggi accettato di patogenesi della malattia aterosclerotica e' quello di un quadro infiammatorio in cui le cellule endoteliali soffrono un danno come risultato di persistenti elevati livelli di colesterolo ossidato e di shear-stress derivante dall'ipertensione e dal disordinato flusso ematico (Libby, Ridker et al. 2002).

In risposta a questi fenomeni i monociti circolanti vengono attratti nel subendotelio dove si differenziano in macrofagi nel tentativo di riparare il

danno. Tuttavia la persistente ipercolesterolemia porta ad un uptake di colesterolo da parte dei macrofagi che rimangono bloccati nella parete del vaso arterioso. L'attivazione costante dei macrofagi conduce inoltre alla secrezione di chemoattrattanti e fattori di crescita per le cellule muscolari lisce. Il risultato di questi fenomeni è la formazione della placca aterosclerotica matura. MCP-1 prodotto dalle cellule endoteliali danneggiate è stato fin dall'inizio considerato il principale candidato per il reclutamento dei monociti nella placca. Questa ipotesi è stata confermata dall'analisi di topi knockout per MCP-1 e CCR2 (recettore per MCP-1). In diversi modelli di aterosclerosi è stato dimostrato una consistente riduzione della deposizione lipidica sulla parete vascolare ed una riduzione in numero ed estensione delle placche aterosclerotiche.

In tutti i casi il miglioramento della malattia si associava ad un ridotto numero di macrofagi nelle lesioni, in accordo con un modello in cui MCP-1 sia il principale responsabile del reclutamento monocitario nel subendotelio (Boring et al., 1998; Gu et al., 1998; Dawson et al., 1999; Gosling et al., 1999).

Per quanto riguarda la patologia infiammatoria umana, esistono alcuni studi di genetica di popolazione che cominciano a fornire una visione più specifica del ruolo di MCP-1 e CCR2. Ad esempio, è stata dimostrata una significativa associazione tra un polimorfismo del promotore del gene per MCP-1 e l'aumentato rischio di malattia coronarica (Szalai et al., 2001). Questo polimorfismo si è dimostrato responsabile di un'aumentata trascrizione di MCP-1 in vitro, fornendo così una possibile spiegazione dell'effetto osservato (Rovin et al., 1999). È inoltre stato dimostrato un effetto protettivo verso la malattia coronarica di un polimorfismo del recettore di MCP-1, CCR2, che dà luogo alla sintesi di una forma meno responsiva del recettore, rinforzando l'ipotesi che alti livelli di MCP-1 possano influire sul rischio coronarico (Valdes et al., 2002).

1.4 Molecole di adesione

L'infiammazione è una risposta protettiva locale indotta da danni a cellule e tessuti. Il processo infiammatorio riconosce fra i suoi maggiori protagonisti i leucociti circolanti. Le cause dell'infiammazione possono essere varie e molteplici e comprendono fenomeni diversi quali le infezioni, la risposta immunitaria e allergica, il danno meccanico, tossico e così via. Stimoli diversi possono causare l'intervento di cellule effettrici diverse. A seconda del pattern di citochine e chemochine prodotte dal tessuto danneggiato si potrà avere il reclutamento di tipi cellulari particolari.

Tra i regolatori della migrazione cellulare si riconoscono molte molecole, alcune delle quali hanno il preciso compito di determinare un rallentamento dei leucociti circolanti in prossimità della sede di danno, la loro adesione all'endotelio vascolare e la loro migrazione attraverso la parete dei vasi per raggiungere il luogo dove andranno a svolgere la loro funzione di effettori della risposta dell'ospite.

Si capisce quindi come per l'adeguato funzionamento di questi meccanismi di difesa sia essenziale l'abilità delle cellule infiammatorie di aderire e di migrare attraverso la barriera formata dall'endotelio vascolare.

Le molecole responsabili di questi fenomeni prendono il nome di **molecole di adesione**.

Sulla base dell'omologia strutturale sono state identificate quattro superfamiglie di molecole di adesione coinvolte nel reclutamento dei leucociti circolanti nelle sedi di flogosi:

1. le integrine;
2. le proteine immunoglobulin-like (Ig);
3. le selettine;
4. i recettori leganti le selettine.

1.4.1 Integrine

Le integrine sono proteine eterodimeriche costituite da subunità α e β associate in modo non covalente. Differenti subunità α e β si combinano tra loro per formare un'unica molecola (Celi et al., 1997). I leucociti esprimono

costitutivamente tre differenti tipi di integrine che condividono la subunità $\beta 2$ (CD18) e la subunità α distinte: LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18), e glicoproteine (gp) 150, 95 (CD11c/CD18) (3). LFA-1 funziona come recettore per la molecola Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1); anche Mac-1 lega ICAM-1, benché attraverso differenti regioni della molecola. I ligandi cellulari per gp 150,95 non sono stati ben caratterizzati. Le integrine sono costitutivamente espresse ma necessitano di attivazione mediante modificazione conformazionale che può essere indotta, ad esempio, da chemochine, quali MCP-1, o peptidi di origine batterica come f-MLP.

1.4.2 Proteine Ig-like

Le proteine Ig-like possono servire come recettore per le integrine. Sono caratterizzate dalla presenza di moduli simili a quelli presenti nella regione variabile delle Ig. La famiglia delle molecole di adesione Ig-like comprende 5 membri, denominati ICAM-1-5.

ICAM-1 è costitutivamente espressa dalle cellule endoteliali e la sua sintesi è aumentata da diversi agonisti tra cui l'interleuchina-1 (IL-1), il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α) e l'endotossina batterica (lipopolisaccaride, LPS) (Dustin et al., 1986; Springer, 1990). ICAM-1 è espressa costitutivamente anche dalla maggior parte delle cellule epiteliali.

ICAM-1 interagisce sia con LFA-1 che con Mac-1 sui leucociti (Dustin et al., 1986; Makgoba et al., 1988) e l'interazione coinvolge regioni distinte della molecola.

Un altro membro di questa famiglia è denominato VCAM-1. Sebbene la presenza di VCAM-1 sull'epitelio delle vie aeree sia stata descritta da alcuni Autori (Atsuta et al., 1999), questa osservazione non è stata, ad oggi, confermata.

1.4.3 Selettine

Alla famiglia delle selettine appartengono tre membri: P-selettina, E-selettina ed L-selettina.

L-selettina è espressa esclusivamente dai leucociti circolanti, mentre E-selettina è espressa dall'endotelio vascolare e P-selettina è espressa da

endotelio e piastrine. Nessun membro della famiglia delle selettine è espresso dall'epitelio delle vie aeree.

1.4.4 Recettori delle selettine

A questa famiglia appartiene la molecola denominata PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) che deve il proprio nome al fatto di essere stato originariamente identificato come un recettore di P-selettina, ma che in realtà serve da recettore anche per gli altri membri della famiglia delle selettine (Celi et al., 1997).

Altri membri della famiglia sono ad oggi meno caratterizzati.

Le selettine ed i loro recettori mediano il cosiddetto "rolling", (lett. "rotolamento") dei leucociti sull'endotelio durante le fasi iniziali della loro interazione con l'endotelio. Successivamente, se il fenomeno infiammatorio persiste, l'espressione di chemochine da parte delle cellule endoteliali determina l'attivazione delle integrine leucocitarie che interagiscono con ICAM-1 sulla superficie delle cellule endoteliali, con l'instaurazione di un'adesione stabile e conseguente passaggio nella regione extravascolare per diapedesi.

Per quanto riguarda l'infiammazione delle vie aeree, ad oggi le uniche molecole per le quali sia stato chiaramente individuato un ruolo in questo processo sono ICAM-1 ed ICAM-2 espresse dall'epitelio bronchiale ed alveolare ed i loro recettori integrinici leucocitari (Bloemen et al., 1993). E' stata dimostrata la presenza di altre molecole di adesione di origine epiteliale diverse da quelle descritte nei paragrafi precedenti che però ad oggi non sono state caratterizzate a livello biochimico (Celi et al., 1999; Tosi et al., 1994; Tosi et al., 1992).

CAPITOLO 2: SCOPO DELLA TESI

Il punto di partenza di questa tesi è stato un lavoro di Satta (Satta et al., 1994), in cui la generazione di MP era indotta con l'uso di calcio ionoforo (A23187). In tali esperimenti i monociti a riposo erano trattati con A23187 $3\mu\text{M}$ e analizzati al FACS dove si osservava la comparsa di una regione R2, formata da particelle più piccole. In altre parole era chiaramente visibile un aumento di MP con un FSC (*l'intensità del forward scatter dipende dalla dimensione, forma e omogeneità ottica della cellula*) più piccolo della popolazione di partenza.

Inoltre, già da tempo in un lavoro di Mesri e Altieri (Mesri et al., 1998) era stato riconosciuto che le MP derivanti dai neutrofili svolgevano il ruolo di mediatori dell'infiammazione attivando le cellule endoteliali in vitro, con conseguente rilascio di citochine e chemochine, mentre in un lavoro di Celi (Celi et al., 2004) si osservava che le MP derivate da monociti erano implicate nell'emostasi.

Alla luce di queste osservazioni sperimentali, lo scopo iniziale di questa tesi è stato la messa a punto di un metodo per generare MP e visualizzarle al FACS, solo successivamente l'attenzione è stata posta sulla valutazione degli effetti che tali MP possono avere sulla modulazione di chemochine pro-infiammatorie (IL-8 e MCP-1) e di molecole di adesione (ICAM-1) da parte di cellule dell'epitelio delle vie aeree.

CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

3.1 Materiali

3.1.1 Reagenti e kit

Sono stati acquistati presso SIGMA-Aldrich s.r.l. (Milano, Italia) i seguenti reagenti:

- Terreno di coltura RPMI 1640;
- Penicillina, streptomina, L-glutamina, tripsina, inibitore della tripsina;
- Albumina bovina (Bovin Serum Albumine: BSA);
- Trypan blue;
- Formaldeide;
- O-phenylendiamine;
- PBS;
- Ficoll/Hypaque;
- Destrano;
- Calcio ionoforo A23187;
- FBS
- Istamina (Histamine Base C₅H₉N₃)
- Etidio bromidico
- Colorante PKH67

Sono stati acquistati presso:

- Cambrex (Caravaggio, BG, Italia) il terreno BEGM Bullet Kit.
- Biosource International Inc. (Camarillo, CA, USA) il kit elisa IL-8 flexa;
- Bender MedSystems (San Bruno, CA, USA) il kit Elisa per MCP-1 umano;
- Calbiochem (San Diego, CA, USA) il substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina.

Gli altri reagenti chimici e l'antistaminico (Farganesse) sono stati ottenuti dalla farmacia dell'ospedale di Cisanello, Pisa.

3.1.2 Anticorpi, citochine e chemochine

Sono stati acquistati presso:

- Ancell (Bayport, Mn, USA), l'anticorpo monoclonale (clone 15.2) di topo anti-human-ICAM-1
- Sigma (Milano, Italia) l'anti-mouse IgG (γ -chain specific) coniugato alla perossidasi e IFN- γ
- Alexis Italia (Vinci, Firenze, Italia) il TNF- α ricombinante umano.
- Inalco (Milano, Italia) MCP-1 umano usato come campione di riferimento standard per il test Elisa.

3.2 Metodi

3.2.1 Culture cellulari

Le cellule neoplastiche in coltura continua, **A549** (American Type Culture Collection, ATCC, CCL-195), ottenute da un paziente affetto da carcinoma bronchiolo-alveolare ci sono state gentilmente fornite dal dott. Romano Danesi, del Dip. di Farmacologia dell'Università di Pisa. Sebbene si tratti di cellule maligne, e come tali non direttamente equiparabili a cellule umane normali, esse hanno la caratteristica di essere le uniche cellule in coltura che mantengono un fenotipo alveolare umano.

Le cellule A549 sono mantenute in terreno RPMI con l'aggiunta di: 10% (vol/vol) di FBS, 100U/mL di penicillina e 100 μ g/mL di streptomina, in un incubatore umidificato al 95%, con CO₂ al 5% e alla temperatura di 37°C.

Le cellule epiteliali bronchiali immortalizzate, **BEAS-2B** (ATCC, CRL-9609), sono state gentilmente fornite dal dott. Carnevali, dell'università di Modena, Italia. Le cellule BEAS-2B sono mantenute in un terreno di coltura costituito dal 50% di RPMI 1640 e dal 50% di BEGM, in un incubatore umidificato al 95%, con CO₂ al 5% e alla temperatura di 37°C.

3.2.2 Isolamento di monociti e generazione di MP

I monociti sono stati isolati sia da buffy coats freschi ottenuti dal centro trasfusionale dell'ospedale di Cisanello, Pisa, sia dal sangue periferico di normali donatori volontari.

In breve, il Buffy coats è diluito 1:1 con PBS-EDTA (2mM), mescolato gentilmente con 0.25 vol di Dextrano T500 al 4% ed è lasciato per 30 minuti per la sedimentazione degli eritrociti. Il surnatante ricco di leucociti è raccolto in una falcon da 50mL, alla quale si aggiunge un volume pari di PBS-EDTA e si centrifuga per 10 minuti a 200 × g. Il pellet ottenuto è risospeso in 30mL di PBS-EDTA, stratificato su 15mL di Ficoll-Hypaque e centrifugato per 30 minuti esatti a 400 × g a temperatura ambiente.

Dopo questa operazione si forma per gradiente un anellino ricco di linfomonociti che viene recuperato in una falcon da 50mL e lavato due volte in PBS-EDTA. Dopodiché le cellule mononucleate sono risospese in RPMI/10% FBS e lasciate aderire per 18 ore a 37°C in piastre da 24 pozzetti (10⁶ cellule per pozzetto). Il giorno dopo le cellule vengono lavate tre volte con RPMI serum-free pre-riscaldato allo scopo di eliminare i linfociti in sospensione dai monociti che si sono attaccati alla piastra.

Per generare le MP, si aggiunge il calcio ionoforo A23187 (12μM) diluito in RPMI serum-free a ciascun pozzetto contenente i monociti; dopo 10 minuti a 37°C viene raccolto il surnatante si centrifuga a 14,00 × g per 5 minuti a temperatura ambiente per rimuovere le cellule morte e i grossi frammenti cellulari che si possono essere staccati durante la stimolazione, e poi è subito utilizzato per ulteriori esperimenti.

In esperimenti paralleli, le cellule trattate, come descritto sopra, sono state staccate dal pozzetto con l'aggiunta di tripsina/EDTA, messe in un vetrino utilizzando una citocentrifuga, e colorati con Diff-Quick. Dalla sua osservazione risulta che generalmente, circa il 75-80% delle cellule sono monociti/macrofagi, con dei contaminanti che principalmente sono linfociti.

In alcuni esperimenti, l'istamina (30μM) è stata usata al posto del calcio ionoforo A23187 per stimolare i monociti/macrofagi all'induzione di MP.

3.2.3 Colorazione della membrana cellulare

Per colorare le membrane cellulari delle MP, per l'analisi al FACS, è stato utilizzato il colorante *amphiphilic cell linker*, PKH67, secondo le istruzioni indicate dalla casa produttrice.

In breve, i leucociti, preparati come descritto precedentemente, sono staccati con lo 0.25% di tripsina, lavati una volta con RPMI/10% FBS, e risospesi alla concentrazione di 2×10^7 /mL in diluent C. La sospensione viene mescolata con 1mL di diluent C/dye solution (colorante diluito 1/200) per 2 o 5 minuti a temperatura ambiente, con una gentile agitazione. La reazione di colorazione viene bloccata aggiungendo un volume uguale (2mL) di RPMI 1640 con BSA 1% per 1 minuto a 22°C. il campione viene diluito con un uguale volume di RPMI e sottoposto a centrifugazione per 10 minuti a $400 \times g$ per rimuovere la soluzione di colorazione. Le cellule sono ulteriormente lavate per tre volte e diluite in 1 mL di RPMI. A questo punto le cellule sono sottoposte all'incubazione con A23187 come descritto precedentemente, per la produzione di MP.

3.2.4 Analisi tramite la citofluorimetria a flusso (FACS)

Il citometro a flusso (FCM) permette la misurazione rapida della luce deviata e della fluorescenza emessa da cellule opportunamente illuminate.

Le cellule, o le particelle, sono sospese in un mezzo liquido e producono segnali quando attraversano un fascio di luce. La luce diffusa e la fluorescenza emessa da ciascuna particella sono raccolte da specifici dispositivi opto-elettronici, che le convertono in segnali analogico-digitali, e le inviano ad un computer, ove la distribuzione del segnale viene rappresentata con istogrammi di frequenza o citogrammi.

La luce diffusa nella stessa direzione della luce incidente fornisce informazioni relative alla dimensione della cellula (Forward Scatter, FSC), mentre la luce diffusa con un angolo di 90° fornisce informazioni relative alla complessità strutturale della particella (Side Scatter, SSC).

Le MP contenute nel surnatante dei monociti/macrofagi stimolati con A23187, sono analizzate usando un FACScan flow cytometer (Becton Dicosokinson, San Jose, CA).

Il liquido di trascinamento era la soluzione elettrolitica bilanciata Isoton II (Coulter, Krefeld, Germany).

Il light scatter è stato settato con una scala logaritmica, mentre il settaggio del forward light scatter è stato E-01, con un una soglia di 16. Sono stati analizzati un totale di 10,000 eventi. Basandoci sugli esperimenti in cui le MP venivano filtrate attraverso un filtro da 0.22 μm , è stata definita una regione (R1) sul grafico forward scatter/light scatter che ritenevamo contenesse le MP biologicamente attive (vedi risultati e figura 1).

3.2.5 Attivazione delle cellule epiteliali con MP

I surnatanti derivati da monociti trattati e non, sono incubati con le cellule A549 e BEAS-2B cresciute a confluenza in 200 μL per pozzetto (volume finale) in piastre da 96 pozzetti per 24 ore a 37°C. Dopo un'incubazione di 18 ore, il mezzo condizionato viene raccolto, sottoposto a centrifugazione per 5 minuti a 12000 rpm, e analizzato per il contenuto di IL-8 e MCP-1. Le cellule, invece, sono fissate per l'analisi dell'espressione di superficie di ICAM-1. In alcuni esperimenti, i surnatanti delle cellule mononucleate sono stati filtrati (0.22 μm), ultrafiltrati (con contenitori da centrifuga con filtro, Amicon ultra-4; cut-off del peso molecolare di 100Kd; Millipore, Milano, Italia), o sottoposti a ultracentrifugazione (160,000 x g, per 40 minuti) prima dell'incubazione con le cellule A549 e BEAS-2B.

3.2.6 Elisa per la cattura di chemochine

IL-8 e MCP-1, nei surnatanti delle cellule epiteliali A549 e BEAS-2B, sono stati misurati con i kits a sandwich per ELISA in accordo con le istruzioni della casa produttrice.

3.2.7 Misurazione dell'espressione di ICAM-1 sulla superficie cellulare

L'espressione di ICAM-1 sulle A549 è stata misurata tramite test ELISA diretto sulle cellule, come è stato descritto con qualche modifica (13).

In breve, in piastre da 96 pozzetti sono state piastrate 7.5×10^4 cellule per pozzetto in 0.1mL di terreno. Quando le cellule hanno raggiunto la confluenza, devono essere lavate tre volte con HBSS e fissate con il 3.7% di formaldeide (p/v). Seguono ulteriori lavaggi, ed i siti di legame non specifici dell'anticorpo sono bloccati incubando le cellule con HBSS/2% BSA (p/v) per 2 ore. Le cellule sono quindi incubate con l'anticorpo di topo anti-human ICAM-1 (5 μ g/mL) in HBSS 0.5% BSA (p/v) per due ore a 37°C, infine lavate tre volte con la soluzione di lavaggio.

A questo punto si aggiunge l'anticorpo IgG anti-mouse coniugato alla perossidasi, alla concentrazione consigliata dal produttore, e si fa un'incubazione di 1 ora a 37°C. Dopo successivi lavaggi, il legame dell'enzima viene determinato aggiungendo l'orto-fenilendiaminina, 1 mg/mL in sodio citrato 50mM a pH 4, contenente lo 0.015% di H₂O₂. Dopo aver bloccato la reazione con H₂SO₄, la piastra viene letta con lo spettrofotometro a 492 nm (Lettore Titertek Multiskan MCC ELISA, Flow Laboratories, MacLean, Va).

3.2.8 Primers e reagenti per RT-PCR

Il Kit per l'estrazione dell'RNA è stato acquistato da Qiagen s.p.a. Milano, Italia; L'RNA è stato estratto seguendo le istruzioni riportate dal produttore. La concentrazione ed il grado di purezza dell'RNA è stato determinato con la lettura dello spettrofotometro a 260/280 nm. A questo punto, l'RNA è stato sia retrotrascritto a cDNA, sia stoccato a -80°C per ulteriori usi. Per la retrotrascrizione è stato usato il kit della Invitrogen Sensiscript Reverse Transcriptase First-Strand DNA Synthesis Kit (Quiagen, Milano, Itali), in accordo con le istruzioni riportate dal produttore.

Il cDNA così ottenuto è stato amplificato con la PCR, usando primers specifici per IL-8, MCP-1 e ICAM-1 e GAPDH, oppure è stato stoccato a -20°C per ulteriori esperimenti.

La RedTaq DNA polymerase Superpack e il DNA ladder 100Kb sono stati acquistati da SIGMA-Aldrich s.r.l. Milano, Italia;

I primers sense e antisense per IL-8 e MCP-1 ed ICAM-1, disegnati nel nostro laboratorio sono stati acquistati da Invitrogen Milano, Italia.

Le sequenza dei primers sono le seguenti:

IL-8

Sense, 5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGT-3'

Antisense, 5'-CCTCTTCAAAAATTCTCCACACC-3'

MCP-1

Sense, 5'-GCCTCCAGCATGAAAGTCTC-3'

Antisense 5'-CAGATCTCCTTGGCCACAAT-3'

ICAM-1

Sense, 5'-GGCTGGAGCTGTTTGAGAAC -3'

Antisense, 5'-ACTGTGGGGTTCAACCTCTG -3'

GAPDH

Sense, 5'-CGATGCTGGCGCTGAGTA -3'

Antisense, 5'-CGTTCAGCTCAGGGATGACC -3'

I prodotti amplificati sono fatti correre su un gel di agarosio con etidio bromidico 0.001%, fotografato e analizzato con QuantityOne[®] Software (BioRad, Segrate, Italia).

Le condizioni della PCR sono:

per **IL-8** e **MCP-1** 35 cicli di:

- 94°C per 1 minuto;
- 55°C per 1 minuto;
- 72°C per 1 minuto;

seguito da:

- 72°C per 7 minuti;

- conservazione a 4°C.

per **ICAM-1** 35 cicli di:

- 94°C per 30'';
- 60°C per 30'';
- 72°C per 30'';

seguito da:

- 72°C per 7 minuti;
- conservazione a 4°C.

Per **GAPDH** 35 cicli di:

- 95°C per 5 minuti;
- 94°C per 45'';
- 58°C per 45'';
- 72°C per 45'';

seguito da:

- 72°C per 5 minuti;
- conservazione a 4°C.

3.2.9 Presentazione dei dati ed analisi statistica.

Tutti i dati sono mostrati come media \pm SEM. La comparazione dei diversi gruppi è stata fatta con il test di Friedman per misurazioni ripetute, con l'uso del Software Prism (GraphPad, San Diego, Ca). Valori di $p < 0.005$ sono stati considerati statisticamente significativi.

CAPITOLO 4: RISULTATI

4.1 Analisi citofluorimetrica della formazione delle MP indotta dal calcio ionoforo, A23187.

L'analisi citofluorimetrica del surnatante di monociti/macrofagi non stimolati mostra che non ci sono virtualmente eventi (fig. 3A).

L'incubazione delle cellule in adesione con A23187 (12 μ M, 10 min) causa l'apparizione di eventi in due distinte regioni.

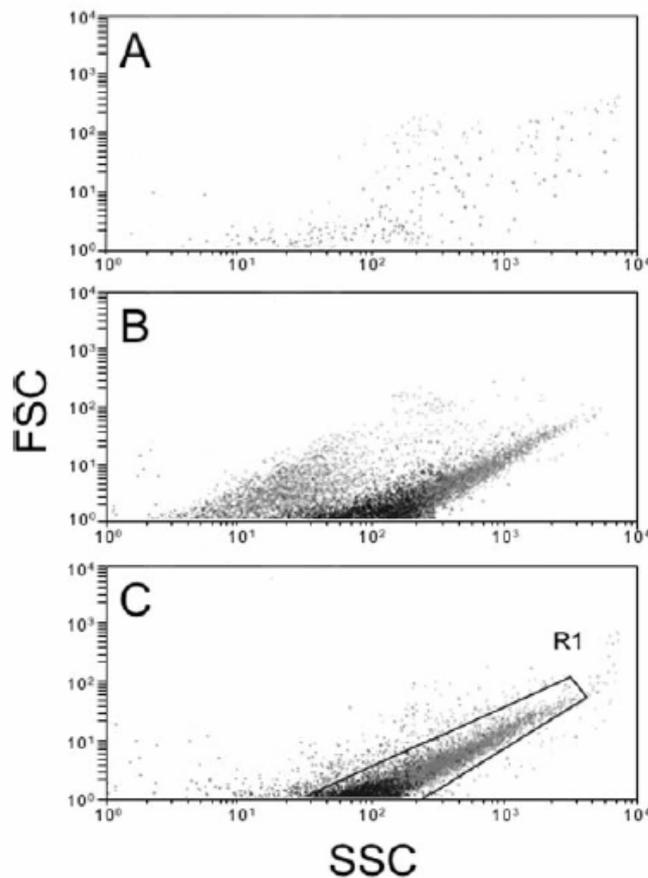


Figura 3. Analisi citofluorimetrica del surnatante di monociti/macrofagi. **A:** cellule non stimolate; **B:** Cellule stimolate con A23187; **C:** Cellule stimolate con A23187 dopo filtrazione con un filtro da 0.22 μ m. I puntini grigi rappresentano gli eventi fluorescenti (verdi nella figura originale), mentre i puntini neri sono negativi-fluorescenti. R1 rappresenta una regione arbitrariamente scelta per rappresentare gli eventi non sono stati influenzati dalla filtrazione con il filtro da 0.22 μ m. Dati di un esperimento rappresentativo di 3. SSC: Side Scatter; FSC: Forward Scatter.

In entrambe le regioni, molti eventi sono fluorescenti (eventi rappresentati in grigio) e ciò suggerisce che derivino dalle membrane cellulari delle cellule stimulate (fig. 3B).

Gli eventi non fluorescenti (neri) potrebbero rappresentare sia frammenti di membrana cellulare che sono troppo piccoli per contenere anche l'intercalante lipidico fluorescente, oppure potrebbero avere una diversa origine.

Dopo filtrazione del surnatante attraverso un filtro da 0.22 μm , una delle regioni virtualmente scompare mentre l'altra rimane praticamente immutata (R1) (fig. 3C).

Inoltre l'effetto di A23187 nella generazione degli eventi in R1 sembra essere dose-dipendente (fig. 4).

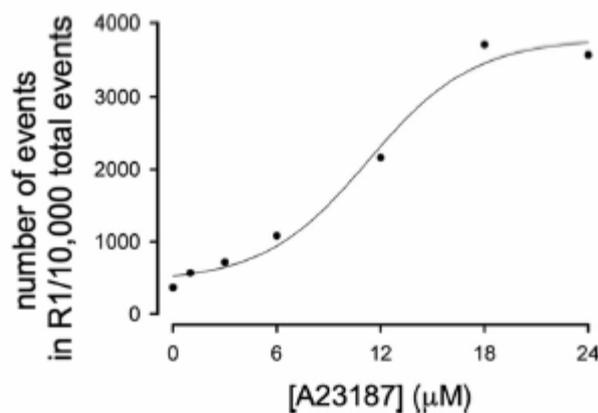


Figura 4. Curva dose risposta della generazione di MP da monociti/macrofagi umani dopo stimolazione con A23187. Il surnatante dei monociti/macrofagi stimolati da A23187 è stato analizzato con il citofluorimetro di flusso come descritto in figura 1. E' stato calcolato il numero di eventi in R1 su 10,000 eventi totali. I puntini neri rappresentano i valori medi di due tubi indipendenti dello stesso esperimento, rappresentativo di due esperimenti eseguiti sotto le medesime condizioni.

4.2 Le MP originate dai monociti/macrofagi sovraregolano la secrezione di IL-8 da parte delle cellule epiteliali delle vie aeree.

Le cellule A549 esprimono costitutivamente una media di 800 pg/mL di IL-8 sotto le proprie condizioni sperimentali.

L'incubazione overnight con il surnatante di monociti/macrofagi non stimolati causa un aumento nell'espressione di IL-8.

Un ulteriore aumento di quattro volte superiore, nell'espressione di IL-8, avviene quando le cellule A549 sono incubate con il surnatante di monociti/macrofagi stimolati con A23187 (fig. 5A).

Per investigare che questa sovraregolazione non dipendesse dal rilascio di mediatori solubili rilasciati dai monociti/macrofagi dopo la stimolazione con il calcio ionoforo, il surnatante contenente le MP è stato filtrato attraverso un filtro da 0.22 μm e attraverso un ultrafiltro con un cut-off nominale del peso molecolare di 100 Kd.

La filtrazione attraverso un filtro da 0.22 μm causa una piccola, non riproducibile riduzione nell'effetto stimolatorio del surnatante che non ha significato statistico dopo 7 esperimenti consecutivi (fig. 5B).

Al contrario, l'ultrafiltrazione abolisce quasi completamente questo effetto (fig. 5B).

Come controllo è stata fatta l'ultrafiltrazione di un molecola solubile che notoriamente è coinvolta nella stimolazione delle cellule A549, TNF- α , ma questo non impedisce il suo effetto stimolatorio (fig. 6).

Per confermare che l'effetto del surnatante richieda la presenza di materiale particellare piuttosto che di molecole solubili grandi non a sufficienza da essere trattenute da un filtro da 100 Kd, il materiale è stato sottoposto ad ultracentrifugazione.

L'ultracentrifugazione abolisce l'effetto stimolatorio del surnatante; inoltre, si può ricostituire questo effetto risospendendo il pellet in un ugual volume di buffer (fig. 5C), questo conferma che in tale processo sono coinvolte microparticelle che derivano da cellule, piuttosto che grandi molecole solubili.

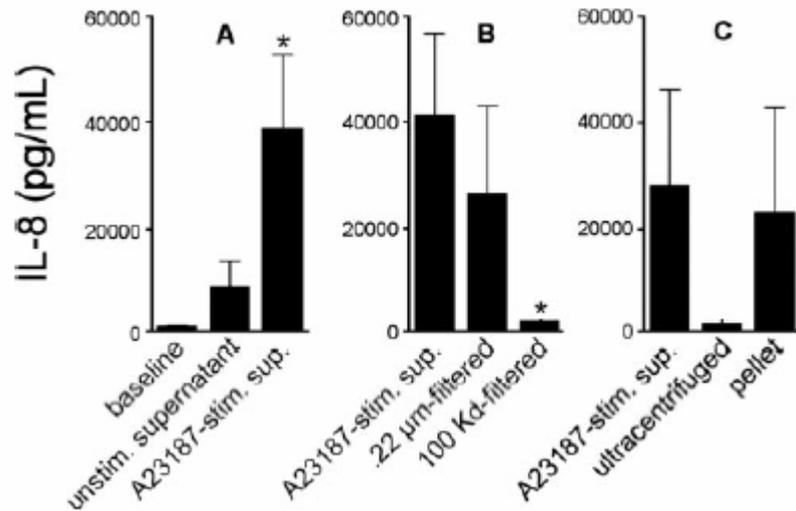


Figura 5: A: Secrezione di IL-8 da cellule A549 in condizioni basali e dopo incubazione overnight con il surnatante di monocit/macrofagi non stimolati o di monocit/macrofagi stimolati con A23187. * $p < 0.05$ comparato al baseline. N=7. B: Secrezione di IL-8 da cellule A549 dopo incubazione overnight con il surnatante di monocit/macrofagi stimolati non filtrato, filtrato attraverso un filtro da 0.22 µm o attraverso un ultrafiltro con un cut-off di 100 Kd. * $p < 0.05$ comparato al surnatante non filtrato. N=7. C: Secrezione di IL-8 da cellule A549 dopo incubazione overnight con il surnatante di monocit/macrofagi stimolati prima e dopo ultracentrifugazione, e con la risospensione del pellet in un uguale volume di buffer; n=3.

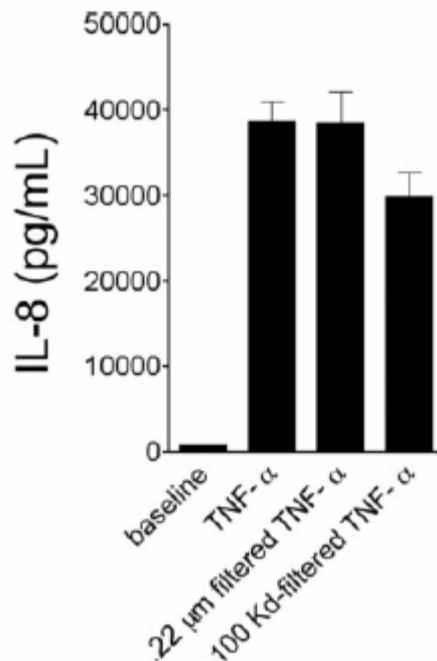


Figura 6: Secrezione di IL-8 da cellule A549 in condizioni basali e dopo incubazione overnight con TNF-α. n=3.

Le variazioni della secrezione di IL-8 sono parallele alle variazioni dell'mRNA di IL-8 (Fig.7A). Sono stati fatti esperimenti di controllo usando A23187 come stimolo diretto sulle cellule A549 per cercare di eliminare l'ipotesi che l'effetto stimolatorio osservato potesse dipendere dall'A23187 che rimane nella sospensione di MP (pellet e residuo filtrato) in virtù della sua solubilità lipidica, piuttosto che dalle MP. La concentrazione di IL-8 nel mezzo condizionato delle cellule A549 va da 4,105 pg/mL nelle condizioni basali a 6,393 pg/mL dopo diretta stimolazione con A23187 12 μ M, a 52,835 pg/mL dopo incubazione con MP derivati da monociti/macrofagi stimolati con A23187 12 μ M (dati di 1 esperimento rappresentativo di 3).

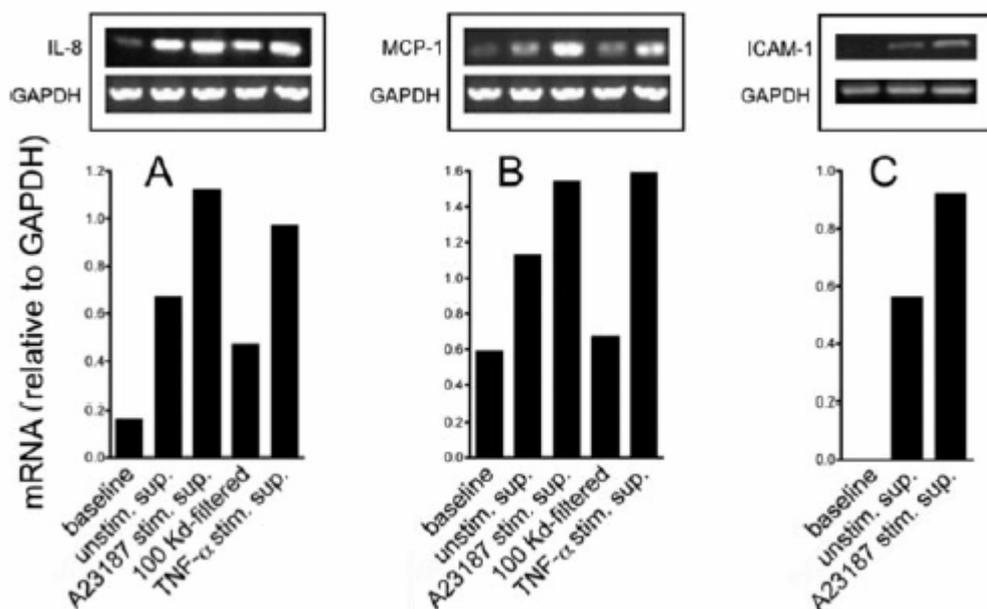


Figura 7: Analisi semiquantitativa, tramite RT-PCR, dei livelli di mRNA delle A549 di IL-8 (A), MCP-1 (B), ICAM-1 (C) nelle diverse condizioni di cultura.

La figura 8 mostra gli effetti delle MP derivate dai monociti/macrofagi sulla secrezione di IL-8 da parte delle cellule epiteliali bronchiali, BEAS -2B. Le MP aumentano significativamente la secrezione di IL-8 da parte delle cellule BEAS-2B in modo molto meno cospicuo delle cellule A549. Ancora, l'ultrafiltrazione inibisce l'effetto stimolatorio.

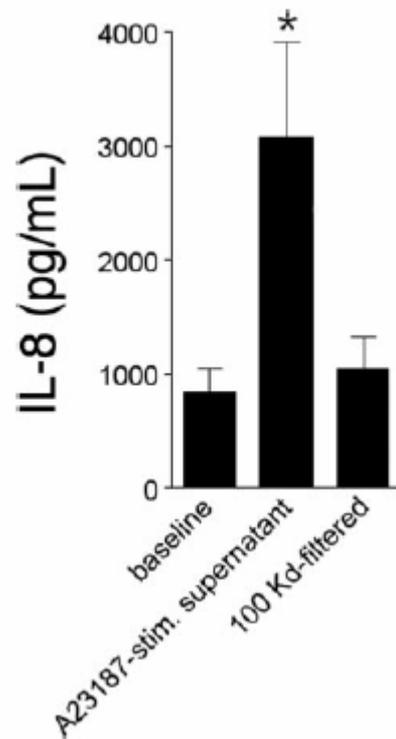


Figura 8: La secrezione di IL-8 da parte delle cellule BEAS-2B in condizioni basali e dopo incubazione overnight con il surnatante di monociti/macrofagi non stimolati o stimolati con A23187. * $p < 0.05$ comparato al basale; $n=3$.

4.3 Effetti delle MP originate dai monociti/macrofagi sull'espressione di altri mediatori delle cellule epiteliali delle vie aeree.

A questo punto si è voluto investigare sul fatto che l'effetto stimolatorio delle MP non fosse ristretto soltanto a IL-8, ma che facesse parte di una più ampia risposta pro-infiammatoria. A questo scopo, abbiamo analizzato l'espressione di MCP-1, un membro della famiglia chemochine CC, e di ICAM-1, un membro della famiglia Ig-like delle molecole di adesione. Fig. 9 mostra che l'espressione di MCP-1 da parte delle cellule A549 è significativamente aumentato dopo incubazione con il surnatante dei monociti/macrofagi stimolati con A23187. L'effetto è inibito con l'ultrafiltrazione (fig.9) e con l'ultracentrifugazione (dati non mostrati). L'RT-PCR mostra in parallelo all'espressione della proteina, l'espressione dell'mRNA (fig. 7B). La stimolazione diretta delle cellule A549 con il calcio ionoforo A23187 non modula l'espressione di MCP-1 (dati non mostrati).

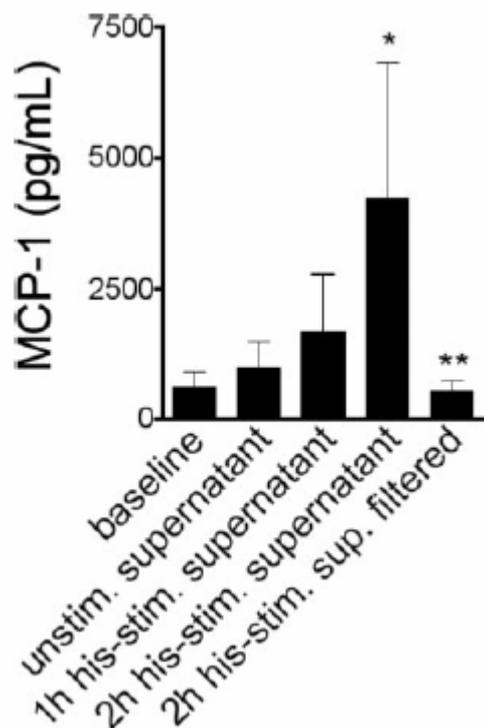


Figura 9: Secrezione di MCP-1 da parte delle cellule A549 nelle condizioni basali e dopo incubazione overnight con il surnatante di monociti/macrofagi non stimolati o stimolati con A23187, o con il surnatante di monociti/macrofagi stimolati con A23187 e filtrato attraverso un ultrafiltro con un cut-off di 100 Kd. * $p < 0.05$ comparato al basale; ** $p < 0.05$ comparato al surnatante ultrafiltrato; $n=4$.

Risultati simili sono stati ottenuti quando abbiamo misurato l'espressione delle molecole di adesione ICAM-1 (fig.10). Ancora, l'RT-PCR mostra un parallelo tra l'espressione della proteina e il suo mRNA (fig. 7C).

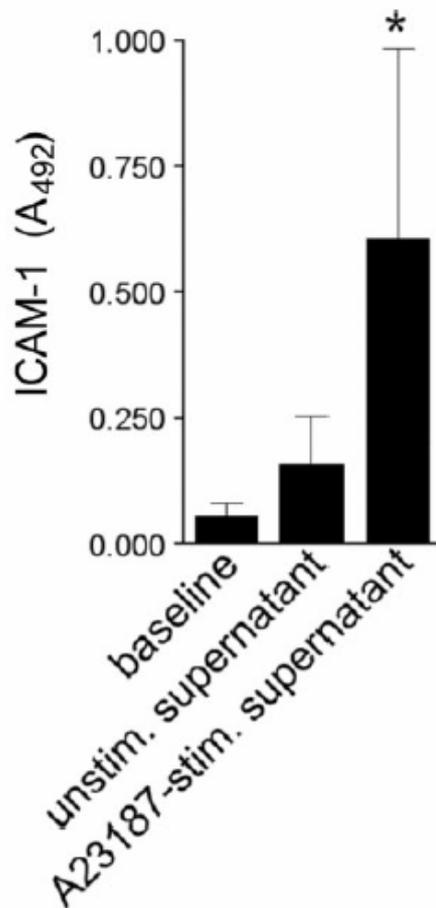


Figura 10: Espressione di ICAM-1 da parte delle cellule A549 in condizioni basali e dopo incubazione overnight con il surnatante di monociti/macrofagi non stimolati e stimolati con A23187. * $p < 0.05$ comparato al basale; n:4.

4.4 Effetti dell'istamina sulla produzione di MP da parte dei monociti/macrofagi.

Per investigare se l'agonista che è conosciuto essere implicato nelle reazioni infiammatorie nell'uomo possa avere una risposta simile a quella evidenziata dall'A23187, abbiamo stimolato i monociti/macrofagi con l'istamina.

La figura 11 mostra che il surnatante di monociti/macrofagi stimolati con istamina sovraregola l'espressione di MCP-1 da parte delle cellule A549. L'effetto è abolito dalla filtrazione. La stimolazione diretta delle cellule A549 con l'istamina non sembra causare nessuna sovraregolazione apprezzabile nell'espressione di MCP-1 (dati non mostrati). Risultati simili sono ottenuti per IL-8, anche se in minor grado rispetto all'effetto del surnatante dei monociti/macrofagi stimolati con A23187.

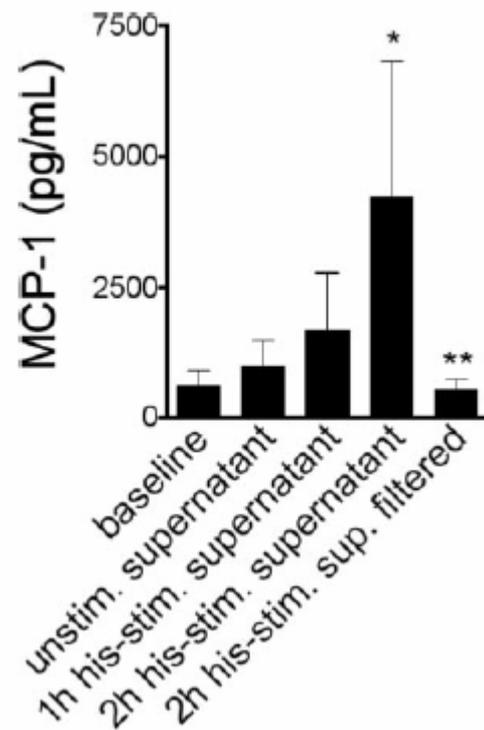


Figura 11: Secrezione di MCP-1 da parte delle cellule A549 in condizioni basali e dopo incubazione overnight con il surnatante dei monociti/macrofagi non stimolati o stimolati con istamina per 1 ora o 2 ore, o con il surnatante di monociti/macrofagi stimolati con istamina per 2 ore e dopo filtrazione con un filtro da .22 μm ; * $p < 0.05$ comparato al basale; ** $p < 0.05$

CAPITOLO 5: DISCUSSIONE

L'epitelio delle vie aeree partecipa attivamente sia nella difesa contro i patogeni aerogeni sia nell'orchestrazione delle reazioni infiammatorie che virtualmente caratterizzano tutte le malattie polmonari.

Il reclutamento dei leucociti portati dal sangue nelle vie aeree rappresenta uno step critico in questi processi e richiede l'azione combinata di chemiochine e molecole di adesione cellula-cellula, incluse IL-8, MCP-1 e ICAM-1.

A tale proposito in questo progetto ho investigato per verificare se le MP derivate dai macrofagi/monociti abbiano il potenziale per contribuire alle innate proprietà immuni dell'epitelio delle vie aeree modulando la sintesi di queste molecole.

I miei dati mostrano che i monociti/macrofagi possono essere indotti a generare MP con un potenziale proinfiammatorio per le vie aeree umane attraverso la loro abilità a sovraregolare la sintesi di IL-8, MCP-1 e ICAM-1 delle cellule epiteliali bronchiali ed alveolari.

L'attivazione con il calcio ionoforo A23187 dei monociti/macrofagi marcati con una sostanza fluorescente induce il rilascio di frammenti che possono essere evidenziati tramite il FACS e che possono trattenere la marcatura dell'intercalante lipidico fluorescente, confermando l'ipotesi che essi derivino da membrane cellulari. L'effetto è dose dipendente. Le analisi al FACS mostrano gli eventi fluorescenti in due distinte regioni. La filtrazione del mezzo attraverso un filtro da $.22\mu\text{m}$ causa la sparizione di una di queste regioni, mentre l'altra (R1) rimane virtualmente non modificata. Il mezzo condizionato delle cellule stimulate con A23187 sovraregola la sintesi dei mediatori proinfiammatori da parte delle cellule epiteliali sia misurando la quantità di proteina sia i livelli di mRNA. L'attività biologica del mezzo non è significativamente influenzata dalla filtrazione. Questa osservazione suggerisce che la maggior parte dell'attività biologica è associata con gli eventi in R1. Al contrario, l'ultrafiltrazione attraverso un filtro con un cut-off di 100 Kd (che non ha nessuna influenza sulla capacità di stimolo della citochina TNF- α , usata come controllo) e l'ultracentrifugazione del materiale

ne abolisce totalmente l'attività biologica; inoltre, in seguito all'ultracentrifugazione, parte dell'attività può essere ricostituita con la risospensione del pellet.

Questi dati confermano che è il materiale particellare, piuttosto che le molecole solubili, il responsabile dell'attività biologica.

Esperimenti di controllo in cui A23187 è aggiunto direttamente alle cellule epiteliali hanno mostrato trascurabili effetti nella produzione di citochine; questo elimina la possibilità che il calcio ionoforo rimasto nella sospensione delle MP, in virtù della sua solubilità lipidica, possa essere il responsabile degli effetti osservati.

Dal momento che A23187 non è un mediatore fisiologico alcuni degli esperimenti sono stati fatti anche con agonisti conosciuti essere coinvolti nelle risposte infiammatorie nell'uomo. La stimolazione dei monociti/macrofagi con l'istamina causa la generazione di materiale particellare capace di modellare l'espressione di IL-8 e di MCP-1 da parte delle cellule epiteliali delle vie aeree. Esperimenti preliminari suggeriscono che l'istamina richiede incubazioni più lunghe in confronto al calcio ionoforo A23187; ulteriori studi saranno richiesti per investigare se a questa incongruenza corrispondono meccanismi di attivazione differenti.

Oramai da diversi anni, numerosi studi hanno confermato che le MP che derivano da cellule diverse esercitano effetti fisiologici rilevanti. È stato dimostrato che i monociti generano MP con un potenziale procoagulante. Questa attività è rappresentata almeno da due componenti:

- 1) I fosfolipidi carichi negativamente, principalmente fosfatidilserina, essenziali per l'assemblamento dei complessi enzimatici della coagulazione del sangue e normalmente limitati allo strato interno della membrana cellulare a riposo, sono esposti nello strato esterno delle membrane che formano le MP.
- 2) Il fattore tissutale (TF), una proteina di membrana integrale che rappresenta il responsabile dell'avvio della via estrinseca della coagulazione del sangue, è trasferito dalle cellule parentali alla membrana delle MP (Satta et al., 1994). Molto recentemente, in esperimenti *in vivo* si è dimostrato che le MP trasportano simultaneamente sulla loro membrana sia il TF sia i recettori di

adesione per la P-selectin, P-selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1) (Falati et al., 2003). E' stato proposto un modello nuovo per l'inizio della coagulazione del sangue in cui le MP circolanti vengono reclutate nel sito del danno vascolare e dell'attivazione piastrinica, dove la P-selectin è sovraespressa, attraverso l'interazione con P-selectin Glycoprotein Ligand 1, e mantengono il potenziale procoagulante di TF e della fosfatidilserina (Celi et al., 2004). Infine, dati *ex vivo* mostrano che le MP che derivano dalle piastrine, dai leucociti e dalle cellule endoteliali sono presenti nel plasma umano e che il loro numero aumenta in condizioni cliniche in cui il sistema di coagulazione è stato attivato.

Diversi autori hanno studiato il potenziale ruolo delle MP derivate dai leucociti nell'immunità innata e nell'infiammazione. Hess e collaboratori (Hess et al., 1999) hanno dimostrato per esempio che i PMN attivati con fMLP rilasciano MP che esprimono un set selezionato di proteine come il recettore 1 del complemento, la mieloperossidasi e l'elastasi e che può quindi rappresentare un'unità funzionale con proprietà anti-microbiche. E' stato dimostrato che le MP derivate dai PMN possiedono proprietà sia pro- sia anti-infiammatorie a seconda del modello sperimentale. Come menzionato prima, le MP derivate dai PMN stimolati con fMLP sovregolano la sintesi di IL-6 e IL-8 da parte delle cellule endoteliali umane (Mesri et al., 1998).

Al contrario, MP ottenute in modo simile diminuiscono l'attivazione cellulare nei macrofagi umani come confermato da una riduzione della sintesi di TNF- α , IL-8 e IL-10 da parte di cellule attivate con zymosan (Gasser et al., 2004). Dati *ex vivo* confermano un potenziale ruolo delle MP nelle malattie infiammatorie nell'uomo. È stato dimostrato che il numero delle MP aumenta nel liquido sinoviale delle articolazioni infiammate di pazienti con l'artrite reumatoide (Berckmans et al., 2002); un collegamento possibile tra la presenza di queste MP e l'infiammazione che rappresenta la caratteristica della malattia è stato fornito dimostrando l'induzione dell'espressione di metalloproteinasi e di citochine nei fibroblasti sinoviali dopo incubazione con MP derivate da cellule T e monociti (Distler et al., 2005) come anche con MP sinoviali autologhe (Berckmans et al., 2005). È ancora non chiaro se le MP si

possono trovare in altri compartimenti del corpo, oltre che nel plasma e nelle articolazioni. Di particolare interesse nel contesto di questo studio sarebbe dimostrare la presenza di MP derivate dai leucociti nel fluido che viene a contatto con le cellule epiteliali delle vie aeree nell'uomo (Hess et al., 1999). In conclusione, si è dimostrato che le MP che derivano dai monociti/macrofagi umani hanno la capacità di sostenere l'immunità innata dell'epitelio delle vie aeree così come di contribuire alla patogenesi delle malattie infiammatorie dei polmoni caratterizzate da un aumento dell'espressione delle chemochine e delle molecole di adesione. Ulteriori studi saranno necessari per indagare se questi potenziali meccanismi sono implicati in un ruolo effettivo in condizioni patologiche nell'uomo.

BIBLIOGRAFIA

Ardoin SP, Shanahan JC, Pisetsky DS. 2007 The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand J Immunol.* 66(2-3):159-65.

Atsuta et al., 1999. Inhibition of VCAM-1 expression in human bronchial epithelial cells by glucocorticoids. *Am J Respir Cell Mol Biol.*;20(4):643-50.

Berckmans, R. J., R. Nieuwland, M. C. Kraan, M. C. Schaap, D. Pots, T. J. Smeets, A. Sturk, and P. P. Tak. 2005. Synovial microparticles from arthritic patients modulate chemokine and cytokine release by synoviocytes. *Arthritis Res. Ther.* 7:R536-544.

Berckmans, R. J., R. Nieuwland, P. P. Tak, A. N. Boing, F. P. Romijn, M. C. Kraan, F. C. Breedveld, C. E. Hack, and A. Sturk. 2002. Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. *Arthritis Rheum.* 46:2857-2866.

Bloemen et al., 1993; Expression and modulation of adhesion molecules on human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.*;9(6):586-93.

Boring, L., J. Gosling, et al. 1998. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394(6696): 894-7.

Celi A., Lorenzet R., Furie B., Furie BC. 1997. Platelet-leukocyte-endothelial cell interaction on the blood vessel wall. *Semin Hematol.*;34(4):327-35.

Celi, A., R. Lorenzet, B. C. Furie, and B. Furie. 2004. Microparticles and a P-selectin-mediated pathway of blood coagulation. *Dis. Markers* 20:347-352.

Celi, A., S. Cianchetti, S. Petruzzelli, S. Carnevali, F. Baliva, and C. Giuntini. 1999. ICAM-1-independent adhesion of neutrophils to phorbol ester-stimulated human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 277:L465-471.

Combes, V., A. Simon et al. 1999. "In vitro generation of endothelial Microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant". *J. Clin. Invest.* 104:93-102.

Damjanovich, L., S. M. Albelda, et al. 1992. "Distribution of integrin cell adhesion receptors in normal and malignant lung tissue". *Am J Respir Cell Mol Biol* 6(2): 197-206.

Davies, D. E. 2001. "The bronchial epithelium: translating gene and environment interactions in asthma". *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1(1): 67-71.

Dawson, T. C., W. A. Kuziel, et al. 1999. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 143(1): 205-11.

Distler, J. H., A. Jungel, L. C. Huber, C. A. Seemayer, C. F. Reich, 3rd, R. E. Gay, B. A. Michel, A. Fontana, S. Gay, D. S. Pisetsky, and O. Distler. 2005. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102:2892-2897.

Dustin M. L. et al., 1986. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol.*;137(1):245-54.

- Fahy, J. V., K. W. Kim, et al. 1995. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 95(4): 843-52.
- Falati, S., Q. Liu, P. Gross, G. Merrill-Skoloff, J. Chou, E. Vandendries, A. Celi, K. Croce, B. C. Furie, and B. Furie. 2003. Accumulation of Tissue Factor into Developing Thrombi In Vivo Is Dependent upon Microparticle P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 and Platelet P-Selectin. *J. Exp. Med.* 197:1585-1598.
- Fuentes, M. E., S. K. Durham, et al. 1995. Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1. *J Immunol* 155(12): 5769-76.
- Gasser, O., and J. A. Schifferli. 2004. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* 104:2543-2548.
- Gerard, C. and B. J. Rollins 2001. "Chemokines and disease". *Nat Immunol* 2(2): 108-15.
- Gilbert, G., P. Sims, T. Wiedmer, B. Furie, B. Furie, and S. Shattil. 1991. Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII. *J. Biol. Chem.* 266:17261-17268.
- Gosling, J., S. Slaymaker, et al. 1999. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* 103(6): 773-8.

Gu, L., Y. Okada, et al. 1998. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 2(2): 275-81.

Gunn, M. D., N. A. Nelken, et al. 1997. Monocyte chemoattractant protein-1 is sufficient for the chemotaxis of monocytes and lymphocytes in transgenic mice but requires an additional stimulus for inflammatory activation. *J Immunol* 158(1): 376-83.

Hess, C., S. Sadallah, A. Hefti, R. Landmann, and J. A. Schifferli. 1999. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J Immunol*. 163:4564-4573.

Holgate, S. T. 1998. The inflammation-repair cycle in asthma: the pivotal role of the airway epithelium. *Clin Exp Allergy* 28 Suppl 5: 97-103.

Holgate, S. T., P. Lackie, et al. 2000. "Bronchial epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodeling in asthma." *Am J Respir Crit Care Med* 162(3 Pt 2): S113-7.

Hynes, R. O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69(1): 11-25.

Jorens, P. G., J. B. Richman-Eisenstat, et al. 1992. Interleukin-8 induces neutrophil accumulation but not protease secretion in the canine trachea. *Am J Physiol* 263(6 Pt 1): L708-13.

Knight, D. 2001. Epithelium-fibroblast interactions in response to airway inflammation. *Immunol Cell Biol* 79(2): 160-4.

Knight, D. A. and S. T. Holgate 2003. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology* 8(4): 432-46.

Larsen G.L., Henson P.M., 1983. Mediators of inflammation. *Annu. Rev. Immunol.*, Volume: 1, pp. 335-359.

Libby, P., P. M. Ridker, et al. 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105(9): 1135-43.

Makgoba et al., 1988. Functional evidence that intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for LFA-1-dependent adhesion in T cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol.*;18(4):637-40.

Mallat, Z., H. Benamer, et al. 2001. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 101(8): 841-3.

Mesri, M., and D. C. Altieri. 1998. Endothelial Cell Activation by Leukocyte Microparticles. *J. Immunol.* 161:4382-4387.

Mio, T., D. J. Romberger, et al. 1997. Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 155(5): 1770-6.

Montefort, S., C. K. Lai, et al. 1994. Circulating adhesion molecules in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 149(5): 1149-52.

Morel O, Ohlmann P, Epailly E, Bakouboula B, Zobairi F, Jesel L, Meyer N, Chenard MP, Freyssinet JM, Bareiss P, Mazzucotelli JP, Toti F. 2008. Endothelial cell activation contributes to the release of procoagulant microparticles during acute cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant*, 27(1):38-45.

- Proudfoot, A. E. 2002. "Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets." *Nat Rev Immunol* 2(2): 106-15.
- Robbins, R. A. and M. B. Grisham 1997. Nitric oxide. *Int J Biochem Cell Biol.* 29(6): 857-60.
- Rollins, B. 2000. MCP-1,-2,-3,-4,-5, in cytokine reference. F. S. Oppenheim JJ, Durum S, Hirano T, Vilcek J, Nicola N. London, *Academic Press*: 1145-60.
- Rollins, B. J. 1997. Chemokines. *Blood* 90(3): 909-28.
- Rovin, B. H., L. Lu, et al. 1999. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 259(2): 344-8.
- Rutledge, B. J., H. Rayburn, et al. 1995. High level monocyte chemoattractant protein-1 expression in transgenic mice increases their susceptibility to intracellular pathogens. *J Immunol* 155(10): 4838-43.
- Satta, N., F. Toti, O. Feugeas, A. Bohbot, J. Dachary-Prigent, V. Eschwege, H. Hedman, and J. Freyssinet. 1994. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 153:3245-3255.
- Shanley T.P., Warner R.L., Ward P.A.,1995. The role of cytokines and adhesion molecules in the development of inflammatory injury. *Mol. Med. Today*, Volume: 1, pp. 40-45.
- Sheppard, D. 1996. Epithelial integrins. *Bioessays* 18(8): 655-60.

Sheppard, D. 1998. Airway epithelial integrins: why so many? *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(3): 349-51.

Spina, D. 1998. Epithelium smooth muscle regulation and interactions. *Am J Respir Crit Care Med* 158(5 Pt 3): S141-5.

Springer T. A. 1990. The sensation and regulation of interactions with the extracellular environment: the cell biology of lymphocyte adhesion receptors. *Annu Rev Cell Bio*; 6:359-402. Review.

Szalai, C., J. Duba, et al. 2001. Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G genotype in CAD patients. *Atherosclerosis* 158(1): 233-9.

Thelen, M. 2001. Dancing to the tune of chemokines." *Nat Immunol* 2(2): 129-34.

Thompson, A. B., R. A. Robbins, et al. 1995. Immunological functions of the pulmonary epithelium. *Eur Respir J* 8(1): 127-49.

Tosi et al., 1992. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)-dependent and ICAM-1-independent adhesive interactions between polymorphonuclear leukocytes and human airway epithelial cells infected with parainfluenza virus type 2. *J Immunol.*;149(10):3345-9.

Tosi et al., 1994; ICAM-1-independent, CD18-dependent adhesion between neutrophils and human airway epithelial cells exposed in vitro to ozone. *J Immunol.*;152(4):1935-42.

Valdes, A. M., M. L. Wolfe, et al. 2002. Val64Ile polymorphism in the C-C chemokine receptor 2 is associated with reduced coronary artery calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(11): 1924-8.

VanWijk, M. J., E. VanBavel, A. Sturk, and R. Nieuwland. 2003. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.* 59:277-287.

Zachariae, C. O., A. O. Anderson, et al. 1990. Properties of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) purified from a human fibrosarcoma cell line. *J Exp Med* 171(6): 2177-82.