

XIV SESSIONE COMUNICAZIONI - FISILOGIA E BIOLOGIA CELLULARE

SALA MONASTERIO

Martedì, 9 Ottobre 2007 - ore 16.00-17.30

SILENZIAMENTO DELLA REGULATOR G PROTEIN SIGNALING (RGS)-2 E SIGNALING DELL'ANGIOTENSINA II NELL'UOMO. IMPLICAZIONI PER L'IPERTENSIONE ARTERIOSACalò LA, Pagnin E, Ceolotto G, Schiavo S, Semplicini A, Pessina AC
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Clinica Medica 4, Università di Padova, Padova

Introduzione. Il ruolo di Regulator of G protein signaling-2 (RGS²) è centrale per la regolazione del signaling di Angiotensina II (Ang II) e dell'attività vasodilatante di NO. Nella sindrome di Bartter/Gitelman (BS/GS) abbiamo dimostrato una riduzione del signaling di Ang II che contribuisce alle anomalie del tono vascolare e del rimodellamento cardiovascolare di questi pazienti (normo/ipotensione e riduzione delle resistenze periferiche nonostante elevata Ang II e attivazione del sistema RAA) evidenziato dai livelli aumentati di RGS² e di NO, ridotta espressione genica e proteica della subunità della proteina G_q, ridotto rilascio intracellulare di IP₃ e Ca²⁺, ridotta attività di protein chinasi C, ridotta espressione genica di p22phox e TGF- β , ridotta suscettibilità delle LDL all'ossidazione (J Hypertens 1998, Kidney Int 2001, NDT 2003, JCEM 2004, Kidney Int 2006).

Scopi. Questo studio valuta l'effetto del silenziamento di RGS2 sulla mobilizzazione intracellulare di Ca²⁺ (Ca²⁺) mediata da Ang II.

Metodi. In fibroblasti ottenuti da biopsie cutanee di 6 pazienti con BS/GS (un modello umano di alterata regolazione del tono vascolare ed aumentati livelli di RGS²) RGS² è stata silenziata con siRNA per l'esone 5 di RGS2. Lipofectamina 2000 (agente trasfettante) e GAPDH siRNA sono stati usati come controlli positivi. L'efficienza del silenziamento è stata monitorata con western blot, la concentrazione di Ca²⁺ indotta dall'Ang II misurata con Fura-2 AM e paragonata con quella delle cellule non silenziate e con quella di 6 controlli sani.

Risultati. L'efficienza del silenziamento di RGS2 era pari al 42% ed il silenziamento di RGS2 in BS/GS era ottenuto a livello dell'espressione basale di RGS2 dei controlli (0.2±0.01 d.u. vs 0.19±0.01, p=n.s.). Il rilascio di Ca²⁺ indotto da Ang II era ridotto nelle cellule non silenziate di BS/GS rispetto ai controlli: 112.16±13.2 mmol/l vs 130.33±13.64, p=0.011. Il silenziamento di RGS2 in BS/GS aumentava il Ca²⁺ indotto da Ang II vs le cellule non silenziate: 59.3±10.8 nM (picco-basale) vs 40.5±14.1, p=0.017, mentre non era differente rispetto ai controlli: 60.1±4.3. L'integrazione della risposta del Ca²⁺ con il tempo mostrava per le cellule silenziate per RGS2 di BS/GS un'ASC di Ca²⁺ aumentata [3417.15±1275.06 vs 2236.39±804.65 delle cellule non silenziate p=0.013].

Conclusioni. Questi risultati confermano nell'uomo il ruolo centrale di RGS2 come regolatore del signaling dell'Ang II. Questo è il primo studio di silenziamento di RGS2 in una condizione clinica umana caratterizzata da alterata regolazione del tono vascolare. Poiché BS/GS sono l'immagine speculare delle anomalie presenti nell'ipertensione arteriosa, i nostri dati forniscono chiarimenti sui meccanismi coinvolti nella fisiopatologia dell'ipertensione arteriosa e confermano BS/GS come utile modello umano per lo studio di meccanismi cellulari coinvolti nel signaling di Ang II, nella fisiopatologia dell'ipertensione e del rimodellamento cardiovascolare.

1

ADATTAMENTI NELLA REGOLAZIONE DI TONICITÀ MIDOLLARE RENALE NELLA FASE PREIPERTENSIVA DEL MODELLO SPERIMENTALE SHR

Allegri L, Carnevali L, Cabassi A, Mattei S, Bovino A, Pattoneri P, Lagrasta C, Graiani G, Alinovi R, Dancelli S, De Angelis E, Borghetti P, Borghetti A

Dipartimento di Clinica Medica e Nefrologia, ²Sezione di Anatomia Patologica Dipartimento di Medicina di Laboratorio, ³Sezione di Patologia Generale, Dipartimento di Salute Animale, Università di Parma, Parma

Introduzione. Recenti rilievi, nella fase pre-ipertensiva del modello sperimentale SHR, di una significativa iperattivazione del sistema vasopressina-acquaporina, inducono allo studio di componenti coinvolte nella regolazione della tonicità cellulare pertinenti al tratto spesso ascendente dell'ansa di Henle (TAHL) dei nefroni iuxtamidollari (midollare esterna). A tale livello il sistema di co-trasporto luminale-cellulare (Na⁺-K⁺-2Cl⁻) sfrutta un favorevole gradiente per il sodio (bassa concentrazione ed elettronegatività endocellulari) portando: dal lato dei fluidi endotubulari, alla formazione di acqua libera per ridotta permeabilità idrica luminale e dal lato basale cellulare all'innesco, Na⁺-K⁺ ATPasi mediato, del gradiente osmotico e degli effetti moltiplicativi di concentrazione in controcorrente.

Scopi. Studiare l'intervento di regolatori specifici della tonicità della cellula tubulare relativa al TAHL come il fattore trascrizionale TonEBP (Tonocyt enhancer binding protein) e di sistemi effettori che intervengono nel trasporto extra-intracellulare di osmoli compatibili, tra questi il BGT1 (Betaine/GABA transporter).

Materiali. La ricerca è stata condotta su tre distinte colonie di ratti SHR in fase pre-ipertensiva (5 settimane di età) confrontati con ratti di controllo WKY (n = 6 per ogni gruppo).

Risultati e metodi. Tra i rilievi funzionali a confronto ed a parità di apporto calorico ed idrosalino non sono state rilevate modificazioni significative della clearance creatinica e della quantità di sodio urinario eliminata; mentre è stata rilevata negli SHR: una significativa riduzione (p<0.05) del volume urinario associata ad un aumento della concentrazione sodica (p<0.05) e della osmolarità urinaria (p<0.05).

I rilievi tissutali *ex vivo*, ottenuti con riferimento alla individuazione topografico-istochimica del TAHL (Tamm Horsfall lumenale positivo, acquaporina 2 basale negativo) hanno messo in evidenza e a confronto: a) non significative differenze (p>0.05) fra SHR e WKY per quanto riguarda l'espressione genica (mRNA) di TonEBP e BGT1 valutata mediante RT-PCR; b) specifica localizzazione della proteina BGT1 sul lato basale della cellula ed un suo significativo aumento negli SHR (p<0.05) come espressione di incrementata stabilizzazione post-traduzionale (rilievi con immunofluorescenza indiretta e quantificazione per area) rapportabile ad un incrementato uptake di osmoli compatibili; c) aumento significativo, negli SHR (p<0.05) dell'attività tirosino-idrossilasica (HPLC e rilevazione elettrochimica); d) non variazione della NOS3 costitutiva e del perossinitrito (3 nitrotirosina); e) non variazione della Na⁺-K⁺-ATPasi.

(segue)

PROTEOMICA E METABONOMICA URINARIA DELLA SINDROME DI FANCONIVilasi A^{1,2}, Cutillas PR³, Maher AD⁴, Nicholson JK⁴, Unwin RJ⁵, Capasso G¹Dipartimento di Nefrologia, Seconda Università degli studi di Napoli, Napoli; ²Centro di Spettrometria di Massa Proteomica e Biomolecolare, ISA-CNR, Avellino; ³Ludwig Institute for Cancer Research and Department of Biochemistry & Molecular Biology, London, UK; ⁴Department of Biomolecular Medicine, Faculty of Medicine, Imperial College, London, UK; ⁵Centre for Nephrology & Department of Physiology, University College, London, UK

Introduzione. La Sindrome di Fanconi (FS) è un danno della funzione tubulare prossimale, finora caratterizzata dall'incapacità di riassorbire alcune sostanze filtrate. Dent (D) e Lowe (L) sono 2 forme genetiche di FS, legate al cromosoma X, ma esiste anche una forma autosomica dominante (ADIF), fenotipicamente simile a Dent, di cui non è nota la mutazione genetica. Inoltre è stata descritta una FS acquisita dopo trattamento con ifosfamide (IF).

Scopo. 1. Identificare biomarkers urinari caratteristici delle varie forme di FS; 2. Verificare se i prodotti dei geni mutati in L, D e ADIF, siano coinvolti nello stesso meccanismo di riassorbimento di proteine e metaboliti. A questo scopo è stato confrontato il proteoma-metabonoma urinario delle 4 diverse forme di FS con quello di controlli (C), utilizzando sia la spettrometria di massa che ¹H NMR.

Materiali e metodi. 10 pazienti per ciascuna forma di FS e C, sono stati analizzati. Le proteine urinarie sono state separate per 1D-SDS-PAGE. I peptidi ottenuti da digestione proteica con tripsina, sequenziati mediante LC-ESI-MS/MS. Le proteine sono state quantificate utilizzando il metodo PEAS. **Metabonomica:** I campioni di urine, desalificati, sono stati analizzati mediante ¹H NMR, a 600 MHz.

Risultati. L'analisi comparativa dei pattern proteici urinari delle 4 diverse forme di FS ha mostrato che il proteoma di FS è qualitativamente molto diverso da C, (es. l'uromodulina è più espressa in C mentre albumina, immunoglobuline, angiotensinogeno, proteine di trasporto del retinolo o della vitamina D, in FS). In accordo con la proteomica, la metabonomica ha evidenziato differenze qualitative tra FS e C, dovute ad una maggiore concentrazione di alanina, glicina, lisina e valina. Sono state inoltre evidenziate differenze tra le diverse forme di FS: lisina e lattato più espressi in L, glucosio in ADIF, acido ippurico e creatinina in D. L'analisi di clustering dei dati ha raggruppato per maggiore similitudine, L-D e ADIF-TP.

Conclusioni. In questo studio è stata utilizzata una strategia di analisi combinata e innovativa, di proteomica e metabonomica, per caratterizzare la composizione urinaria di pazienti affetti da FS. I risultati hanno confermato le enormi potenzialità di questa strategia nella determinazione di potenziali biomarkers urinari. È stato infatti dimostrato, che esiste un fingerprint proteico-metabolico caratteristico di FS, caratterizzato da un aumento di proteine plasmatiche e di aminoacidi alanina, glicina e lisina. La sensibilità degli strumenti utilizzati, ha inoltre consentito di determinare markers specifici per ciascuna delle 3 forme genetiche di FS: lisina per L; acido ippurico per D e glucosio per ADIF. Inoltre i metodi di analisi di clustering dei dati sia di proteomica che di metabonomica, hanno raggruppato L-D e ADIF-TP, suggerendo che i geni mutati in L e D, a differenza del gene mutato in ADIF, prendano parte allo stesso meccanismo di riassorbimento tubulare.

2

Le relazioni tra rilievi tissutali ed indici funzionali renali ottenuti con valutazione associata di entrambi i gruppi (SHR e WKY) hanno messo in evidenza: correlazioni positive tra BGT1 vs concentrazione sodica urinaria (coefficiente di correlazione r =0.75), correlazione positiva tra BGT1 ed osmolarità urinaria (r =0.59), correlazione negativa (coefficiente di correlazione r = -0.49) fra BGT1 e volume urinario.

Conclusioni. L'aumento della proteina BGT1 a livello delle cellule tubulari del tratto ascendente dell'ansa di Henle rilevata nei ratti SHR può essere così ricondotto ad una differenziale risposta cellulare riguardante i fattori di regolazione del trasporto di "osmoli compatibili" inseriti nella espressione precoce del "risparmio di acqua".

3

EFFETTI DEI MEZZI DI CONTRASTO SUI "SIGNALING PATHWAYS" INTRACELLULARI (AKT, MTOR E NF-KB) IN CELLULE RENALI TUBULARI PROSSIMALI UMANE

Andreucci M¹, Fuiano G¹, Presta P¹, Esposito P², Faga T¹, Bisesti E², Procino A², Altieri V³, Tozzo C¹, Memoli B², Michael A^{1,2}

¹Cattedra di Nefrologia, Università "Magna Graecia", Catanzaro; ²Cattedra di Nefrologia, Università "Federico II", Napoli; ³Cattedra di Urologia, Università "Federico II", Napoli

Introduzione e scopo dello studio. La nefrotossicità indotta dai mezzi di contrasto (mdc) è ancora oggi una delle principali problematiche cliniche: ciò comporta un grande interesse nel tentare di ridurre l'incidenza dell'insufficienza renale acuta causata dal frequente utilizzo dei mdc. Tra i principali meccanismi sono stati suggeriti sia una riduzione del flusso ematico renale, sia un effetto tossico diretto sulle cellule tubulari renali, anche se purtroppo molto poco si conosce riguardo ai meccanismi molecolari con cui i mdc causerebbero il danno cellulare tubulare. La conoscenza di questi meccanismi potrebbe rendere possibile lo sviluppo di terapie farmacologiche in grado di prevenire la loro nefrotossicità.

Metodi. Cellule tubulari prossimali renali umane (HRTPCs) sono state incubate fino a due ore con diversi tipi (monomeri ionici: "a"; monomeri non ionici: "b") di mdc [75 mg I/ml]: sodio diatrizoato (NaD; "a"), iopromide (IOP; "b") e iomeprolo (IOM; "b"). Le cellule sono state quindi lisate e si è proceduto all'estrazione delle proteine al fine di poter eseguire Western Blots con lo scopo di determinare lo stato di fosforilazione di varie chinasi che fanno parte di importanti "signaling pathways" intracellulari. La sopravvivenza cellulare è stata valutata mediante l'"MTT assay".

Risultati. L'incubazione delle HRTPCs con NaD, IOM e IOP era in grado di causare una marcata defosforilazione della chinasi Akt/PKB [in Ser 473, sito associato con la sua attivazione] entro 5 minuti di incubazione. I mdc causavano anche una riduzione della sopravvivenza cellulare che migliorava significativamente in seguito alla transfezione delle cellule con la forma costitutivamente attiva di Akt [CA-Akt]. Ulteriori "target a valle" di Akt, che includono i fattori di trascrizione FKHR e FKHR1 della famiglia "Forkhead", venivano anch'essi defosforilati [in Thr 24 ed in Thr 32 rispettivamente] da tutti i tipi di mdc. Anche la chinasi p70S6 veniva defosforilata in Thr 389 ed in Ser 371 dai mdc. Tuttavia si verificava una più drammatica riduzione, causata da NaD [rispetto a IOP], dei livelli di fosforilazione del "mammalian target of rapamycin" [mTOR] e dell'"extracellular-signal regulated kinases [ERK] 1/2". NaD era in grado di indurre la fosforilazione del fattore trascrizionale NF-kB [in Ser 276], al contrario di quanto osservato con IOP o IOM. Altri dati interessanti ottenuti sono i seguenti: (1) la caspasi 3 non era clivata; (2) l'aggiunta di adenosina incrementava la fosforilazione sia di Akt [in Ser 473] che delle proteine FKHR e FKHR1 in seguito ad esposizione con mdc; fosforilazione che era annullata dall'aggiunta di LY294002, un inibitore specifico di PI 3-kinasi. Inoltre il mamilolo [utilizzato come controllo per valutare l'eventuale effetto dell'osmolarità dei mdc] non causava gli stessi effetti su Akt.

Conclusioni. Questi risultati dimostrano che: (1) tutti i mdc provocano la defosforilazione [e quindi inattivazione] di Akt, una chinasi che è considerata coinvolta nella sopravvivenza cellulare; (2) la transfezione con CA-Akt protegge parzialmente [ma significativamente] le HRTPCs dal danno cellulare indotto dalla loro incubazione con i mdc; (3) i diversi mdc causano diversi effetti su altri "pathways intracellulari" [mTOR, ERKs, NF-kB]. Questi risultati permettono di comprendere almeno una parte dei meccanismi di tossicità diretta dei mdc e potrebbero consentire lo sviluppo di strategie terapeutiche utili a risolvere l'importante problematica legata alla nefrotossicità dei mdc.

4

SPECIFICI CLUSTER GENICI SONO ALLA BASE DELLA DIVERSA RISPOSTA IMMUNOLOGICA NEI PAZIENTI CON UREMIA TERMINALE IN TRATTAMENTO DIALITICO SOSTITUTIVO RISPETTO A QUELLI IN TERAPIA CONSERVATIVA

Zaza G¹, Granata S¹, Verrietti R¹, Pontrelli P², Porreca S¹, Gesualdo L², Carella M³, Grandaliano G¹, Schena FP¹, Pertosa G¹

¹Unità di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Dipartimento dell'Emergenza e dei Trapianti di Organo, Università di Bari, Bari; ²Unità di Nefrologia e Dialisi, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Foggia, Foggia; ³U.O. Genetica Medica, Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Foggia

Introduzione. La malattia renale in stadio terminale (ESRD) è caratterizzata da uno stato clinico di immunodeficienza con conseguente maggiore incidenza di mortalità associata a complicanze infettive. Allo stato attuale resta da individuare il ruolo delle interazioni poligeniche nella determinazione della risposta immunologica nei pazienti con grave danno renale.

Scopi. Lo scopo del nostro studio è stato quello di individuare, mediante un approccio di analisi microarray, un set di geni coinvolti nella risposta immunitaria, in grado di discriminare pazienti in ESRD da quelli in trattamento sostitutivo emodialitico (ED) e peritoneo dialitico (PD) e di identificare pathway cellulari alla base della differente risposta immunologica.

Pazienti e metodi. Sono stati arruolati n=6 pazienti con ESRD e n=12 pazienti in trattamento dialitico stabile (n=6 in PD e n=6 ED). L'RNA totale, estratto da linfomonociti periferici (PBMC) dei pazienti inseriti nello studio è stato utilizzato per misurare il livello di espressione di 763 probe set genici coinvolti nella risposta immunitaria attraverso ibridazione alla piattaforma microarray HG-U133A (Affymetrix). Tre algoritmi statistici (ANOVA, Kruskal-Wallis test e distinction calculation) e la stima del false discovery rate (FDR) sono stati applicati per l'individuazione dei geni maggiormente discriminanti i tre gruppi di pazienti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il software R-project 2.0.1. Inoltre, è stato utilizzato il software Ingenuity Pathways Analysis per la definizione di network funzionali.

Risultati. Dopo analisi statistica, sono stati selezionati n=126 probe set genici (102 geni) in grado di discriminare i tre gruppi di pazienti (p<0.005, FDR<5%). Il 2-D supervised hierarchical clustering e la principal component analysis (PCA) confermavano i risultati ottenuti dall'analisi dei dati numerici. Lo studio dei cluster genici individuava 4 gruppi distinti (n=8 probe set, Cluster A; n=13 probe set, Cluster B; n=62 probe set, Cluster C e n=41 probe set, Cluster D). I cluster C e D includevano rispettivamente i geni iper- e sotto-espressi nei pazienti in trattamento dialitico rispetto a quelli in ESRD. Nel Cluster C rientravano geni coinvolti nella risposta infiammatoria (PTX3, ITGB2 e S100A8) e nell'apoptosi (GRP65 e LY86). Nel Cluster D vi erano geni codificanti per molecole di istocompatibilità (HLA-A e B) e per proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare (IL1A, BCL2 e IFITM1). Lo studio di PTX3 mediante RT-PCR e tecnica ELISA, in un campione indipendente di pazienti, confermava i risultati ottenuti con l'analisi dei microarray.

Conclusioni. Il risultato di questa analisi ci ha permesso di individuare un set di geni in grado di discriminare i pazienti con uremia terminale in trattamento conservativo da quelli in dialisi e di poter compiere un passo in avanti nella comprensione della regolazione dei meccanismi della risposta immune in pazienti con danno renale cronico.

6

L'ALBUMINA RIDUCE LA FUNZIONE DI TRASPORTO TUBULARE MEDIATO DALLA GLICOPROTEINA P

Tramonti G¹, Romiti N², Chieli E^{1,2}

¹Dipartimento di Medicina Interna-Sezione di Nefrologia; ²Dipartimento di Patologia Sperimentale, Università di Pisa, Pisa

Introduzione. È stato da tempo dimostrato che la proteinuria rappresenta un fattore di rischio indipendente nella progressione delle malattie renali. I meccanismi di nefrotossicità della proteinuria sono multifattoriali e dipendono da complesse interazioni tra diversi pathway. Cellule tubulari sottoposte *in vitro* ad un carico di albumina modificano il profilo di espressione dei geni di codifica di alcuni trasportatori di membrana. La glicoproteina P (Pgp) è un trasportatore di membrana conosciuta per la sua capacità di conferire chemio-resistenza alle cellule neoplastiche. Nel rene la Pgp è localizzata prevalentemente sull'orlo a spazzola delle cellule del tubulo prossimale dove agisce come trasportatore di membrana di numerosi farmaci e xenobiotici. Lo scopo di questo studio era valutare gli effetti dell'esposizione di cellule tubulari HK-2 ad alte dosi di albumina sull'espressione e sullo stato funzionale della Pgp ed i possibili meccanismi responsabili.

Materiale e metodi. Le cellule tubulari umane HK-2 sono state coltivate in presenza di albumina alla concentrazione di 20 mg/dL per 72 ore. L'espressione della proteina è stata valutata nelle membrane isolate mediante Western Blot (WB, anticorpo mdr Ab-1). L'espressione del gene di codifica ABCB1 è stata determinata mediante RT-PCR semiquantitativa impiegando la GAPDH come standard interno. Lo stato funzionale del trasporto è stato valutato mediante il test di accumulo della Rodamina-123. La vitalità delle cellule esposte all'albumina è stata determinata mediante il WST-1 test. Per l'analisi statistica è stato impiegato il test t per dati appaiati. P<0.05 è stata considerata statisticamente significativa.

Risultati. Il WB ha dimostrato una riduzione della espressione della Pgp al 39.9% rispetto ai controlli (p<0.001). L'espressione del gene ABCB1 è risultata ridotta al 66.9% (p<0.01). La aggiunta di TNF-α (500 U/mL, eseguito in doppio) determinava un incremento della espressione della Pgp valutata mediante WB rispetto al controllo (116.0%) che si riduceva in presenza di albumina ma in misura inferiore (63.5%). La fluorescenza dovuta a ritenzione intracellulare di Rodamina-123 è risultata aumentata di 2.7 volte rispetto ai controlli (p<0.02). La vitalità cellulare non era modificata dall'esposizione all'albumina.

Conclusioni. Questi risultati dimostrano che in presenza di albumina le cellule tubulari presentano una evidente riduzione della espressione della Pgp con conseguente alterazione della funzione di trasporto. Il TNF-α riduce l'effetto della albumina sulle cellule HK-2. Dal momento che la Pgp rappresenta il meccanismo di trasporto transmembrana di numerosi farmaci e xenobiotici, in presenza di proteinuria possono accumularsi nelle cellule tubulari diverse sostanze potenzialmente nefrotossiche. La riduzione dell'esposizione delle cellule tubulari a substrati tossici conseguente al deficit del meccanismo di trasporto Pgp-mediato rappresenta un ulteriore meccanismo di intervento sul danno tubulare indotto dalla proteinuria.

5

EFFETTO PRO-ATEROGENO DEL GLOBULO ROSSO UREMICO: RUOLO DELLA FOSFATIDILSERINA

Sirilli V¹, Di Pietro N^{2,3}, Giardinelli A^{2,3}, Amoroso L¹, Cappelli P¹, Muscianese P¹, Mammarella I¹, Monaco MP¹, Di Silvestre S², Di Tomo P^{2,3}, Pandolfi A^{2,3}, Bonomini M¹

¹Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento; ²Dipartimento di Biomorfologia, Università "G. d'Annunzio"; ³Fondazione "Università G. d'Annunzio", CE.S.I., Chieti, Pescara

Introduzione. I pazienti affetti da insufficienza renale cronica terminale (ESRD) hanno una tendenza accelerata allo sviluppo di aterosclerosi. L'aumentata interazione eritrociti-cellule endoteliali potrebbe contribuire al danno vascolare nell'uremia. Recentemente abbiamo dimostrato come nei pazienti con ESRD l'aumentata esposizione di fosfatidilserina (PS) sulla superficie eritrocitaria aumenti l'adesione dei globuli rossi (GR) alle cellule endoteliali in cultura di vena ombelicale (HUVEC), causi una diminuzione dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) ed un aumento dell'espressione delle molecole di adesione VCAM-1 e ICAM-1.

Scopi. Poiché si è già dimostrato che la PS esposta sui GR aderisce al complesso di matrice trombospondina mantenuta in una conformazione adesiva dall'interazione con l'integrina endoteliale αvβ3, abbiamo valutato gli effetti dell'adesione GR uremici-HUVEC utilizzando anticorpi contro molecole che agiscono come recettori per la PS eritrocitaria (trombospondina, αvβ3).

Pazienti e metodi. Inoltre, poiché le molecole di adesione VCAM-1 e ICAM-1 modulano l'adesione monocitaria e la tras migrazione endoteliale, primo passo nella formazione del processo aterosclerotico, abbiamo anche esaminato l'adesione delle HUVEC alle cellule umane monolitiche (linea U937) a seguito dell'incubazione GR uremici-HUVEC.

Risultati. Quando i GR uremici sono stati posti a contatto con HUVEC preincubate con un anticorpo monoclonale contro la trombospondina-1 (TSP-1), la quantità di mRNA di VCAM-1 e ICAM-1 si è ridotta significativamente del 48% e del 53% rispetto alle HUVEC non preincubate. Una diminuzione sostanzialmente simile si è osservata anche quando le HUVEC erano preincubate con un anticorpo anti-αvβ3. L'utilizzo di entrambi gli anticorpi non induceva una ulteriore riduzione. In accordo con i dati sull'aumentata espressione di VCAM-1, il trattamento delle HUVEC con GR uremici per 16 ore produceva un significativo incremento nell'adesione alle cellule U937 (incremento medio di 8±0.07 volte rispetto ai GR di controllo, p<0.001).

La preincubazione dei GR con Annessina V (che maschera la PS) annullava gli effetti proadesivi dei GR uremici.

L'adesione dei monociti indotta dai GR uremici era soppressa (80%) dal pretrattamento delle HUVEC con anticorpi monoclonali anti VCAM-1 (p<0.001).

Conclusioni. I nostri dati mostrano che l'incubazione delle HUVEC con GR uremici aumenta significativamente l'adesione di monociti umani alle cellule endoteliali, un effetto correlato all'incremento di VCAM-1. L'aumentata adesione dei GR uremici all'endotelio può modulare nuove vie di traduzione del segnale mediate dal complesso TSP-αvβ3. Questo innovativo aspetto meccanicistico del danno vascolare uremico potrebbe portare a nuove strategie terapeutiche.

7