

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**



**DOTTORATO DI RICERCA IN
MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE**
CURRICULUM IN SCIENZE CARDIOVASCOLARI

XXXV Ciclo
(Anni 2019-2022)

Coordinatore: Prof. Francesco Beguinot

TESI DI DOTTORATO

**La vitamina D inibisce l'attività pro aterotrombotica
dell'IL-6 in cellule endoteliali umane. Un possibile
meccanismo d'azione contro il COVID 19?**

TUTOR

Chiar.mo

Prof. Plinio Cirillo

CANDIDATA

Dott.ssa Mariarosaria Morello

INDICE

ABSTRACT	1
Introduzione	3
Materiali e metodi	5
<i>Culture cellulari</i>	5
<i>Protocollo sperimentale</i>	5
<i>Livelli genici e proteici del Tissue Factor, traslocazione di superficie e attività funzionale</i>	6
<i>Valutazione dei livelli di mRNA e proteina codificanti per il recettore per ACE2</i>	8
<i>Effetti sull'espressione delle molecole di adesione</i>	9
<i>Effetti della IL-6 sulle HUVEC: meccanismi molecolari</i>	9
<i>Effetti della IL-6 sulle HUVEC: ruolo della proteina NLRP3</i>	10
<i>Analisi statistica</i>	11
Risultati	12
<i>Livelli genici e proteici del Tissue Factor, traslocazione di superficie e attività funzionale</i>	12
<i>Valutazione dei livelli di mRNA e proteina codificanti per il recettore per ACE2</i>	13
<i>Effetti sull'espressione delle molecole di adesione</i>	14
<i>Effetti della IL-6 sulle HUVEC: meccanismi molecolari</i>	14
<i>Effetti della IL-6 sulle HUVEC: ruolo della proteina NLRP3</i>	15
Discussione	16
Conclusione	22
BIBLIOGRAFIA	23
LEGENDE E FIGURE	31
LISTA ABBREVIAZIONI	43

ABSTRACT

Numerose evidenze indicano che l'infiammazione e la trombosi ad essa correlata possano essere alcuni dei meccanismi coinvolti della patogenesi dell'infezione sostenuta dal virus SARS-CoV-2 (COVID 19). In particolare, l'endotelio dei capillari a livello degli alveoli polmonari sarebbe un bersaglio preferenziale per il fenomeno trombo infiammatorio sostenuto da SARS-CoV2. La Interleuchina-6 (IL-6) sembrerebbe essere una delle principali citochine coinvolte nella "tempesta infiammatoria" sostenuta da SARS-CoV-2. Il Tissue Factor (TF) rappresenta il principale iniziatore dei fenomeni trombotici vascolari. Lo studio dei pazienti con SARS-CoV-2 ha evidenziato che la vitamina D (VitD) eserciterebbe un ruolo protettivo nei pazienti SARS-CoV-2 ma i meccanismi molecolari potenzialmente coinvolti in tali effetti non sono ancora completamente definiti in dettaglio. Pertanto, partendo da questo background, nel nostro studio, è stato studiato l'effetto della VitD sul TF e sulle molecole di adesione (CAMs) in cellule endoteliali (HUVEC) in coltura stimulate con IL-6. Inoltre, sono stati studiati alcuni dei potenziali meccanismi molecolari coinvolti nella modulazione di questi fenomeni. Le HUVEC coltivate in terreno arricchito di VitD sono state stimulate con IL-6. Sono stati quindi misurati i livelli del gene per il TF (RT-PCR), i livelli di espressione proteica del TF (Western blot), l'espressione di superficie (FACS) e l'attività pro-coagulante (saggio di generazione di FXa). Nello stesso set sperimentale sono stati misurati i livelli solubili di CAMs (ELISA). Infine, sono stati valutati gli effetti dell'IL-6 sull'

espressione del gene e della proteina codificanti per ACE2r (RT-PCR e Western blot), principale recettore cellulare per il SARSCoV-2. La modulazione di NF- κ B e STAT3 (Western blot) è stata valutata come meccanismo molecolare potenzialmente coinvolto. La VitD ha ridotto significativamente l'espressione del TF sia a livello genico che proteico, nonché l'attività TF-procoagulante nelle HUVEC trattate con IL-6. Effetti simili sono stati osservati per le CAMs e l'espressione di ACE2r. L'IL-6 modula questi effetti regolando le vie NF- κ B e STAT3. In conclusione, l'IL-6, una delle principali citochine coinvolte nella infezione sostenuta da SARS-CoV-2, induce un fenotipo proaterotrombotico nelle cellule endoteliali favorendo l'espressione del TF e delle CAMs. Questa citochina sembrerebbe sostenere l'infezione da SARS-CoV-2 attraverso l'upregolazione di ACE2r. Questi effetti dell'IL-6 sulle cellule endoteliali sono significativamente ridotti dal trattamento con la VitD. I risultati di questo studio, con tutti i limiti derivati da uno studio in vitro, consentono di speculare che questo potrebbe essere uno dei potenziali meccanismi attraverso i quali la VitD eserciterebbe gli effetti benefici osservati nei pazienti con infezione da SARS-CoV-2.

Introduzione

L'infiammazione associata alla comparsa della trombosi, nota come "tromboinfiammazione", è un fenomeno coinvolto nella fisiopatologia di numerose patologie. Una caratteristica importante della trombo-infiammazione è rappresentata dalla perdita delle fisiologiche proprietà antitrombotiche e antiaterosclerotiche normalmente riscontrabili nelle cellule endoteliali [1,2]. Questa trasformazione delle cellule endoteliali si manifesta con l'espressione di molecole di adesione cellulare vascolare e intercellulare, rispettivamente VCAM ed ICAM [3,4], attivamente coinvolte nella fisiopatologia dell'aterosclerosi e del Tissue Factor (TF), l'iniziatore chiave della cascata della coagulazione [5]. La trombo-infiammazione sembra essere coinvolta anche nella fisiopatologia dell'infezione sostenuta dal virus SARS-CoV-2 nota anche come COVID-19. È oramai noto che questo virus, responsabile di gravi manifestazioni respiratorie, si associa anche a serie complicanze cardiovascolari [6,7]. SARS-CoV-2 infetta l'ospite legandosi al recettore dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2r). Questo recettore è ampiamente espresso nel polmone, che rappresenta il principale bersaglio del virus, ma è stato isolato anche nel cuore, nel rene e nell'intestino [8,9]. Nei pazienti con infezione da SARS-CoV-2 è stata osservata una risposta infiammatoria incontrollata con rilascio di diverse citochine [10]. In questa tempesta di citochine, l'interleuchina6 (IL-6) sembra svolgere un ruolo cardine,

testimoniato anche dalla relazione tra livelli più elevati di IL-6, danno alveolare, lesioni extra-polmonari e aumento della mortalità osservato nei pazienti che hanno contratto l'infezione.

Numerose evidenze cliniche derivate da studi condotti durante l'emergenza pandemica hanno sottolineato che la supplementazione di Vitamina D (Vit D) nella dieta dei pazienti con infezione da SARS-CoV-2 si associava al miglioramento dell'outcome clinico (15,16). Tuttavia, i meccanismi coinvolti nel modulare questi effetti non sono stati ancora completamente definiti in dettaglio.

Partendo da queste premesse fisiopatologiche ed osservazionali di studi clinici in questo studio abbiamo:

- ✦ Valutato gli effetti della IL-6, una delle principali citochine coinvolte nella infiammazione dopo infezione da SARS-CoV-2, sull'espressione del TF e delle molecole VCAM ed ICAM in cellule endoteliali umane in coltura.
- ✦ Investigato alcuni dei meccanismi molecolari potenzialmente coinvolti in tale fenomeno.
- ✦ Studiato il ruolo della VitD nella modulazione degli effetti esercitati dalla IL-6 sulle cellule endoteliali.

Materiali e metodi

Colture cellulari

Le cellule endoteliali umane (HUVEC) sono state coltivate in terreno EGM 2 con il 10% di FBS e sono state utilizzate ai passaggi da 2 a 5. Sono state raccolte enzimaticamente, contate in un emocitometro e subcoltivate in piastre da 24 pozzetti a una densità iniziale di circa 5×10^4 cellule/pozzetto o in piastre da 100 mm alla densità di circa 2×10^6 cellule per piastra secondo il protocollo sperimentale. Giunte a confluenza, le cellule sono state messe in quiescenza in terreno privo di siero per 24 ore e poi utilizzate per le diverse serie di esperimenti. Tutti i reagenti, i terreni e l'acqua utilizzati per gli esperimenti sono stati testati per verificare l'eventuale contaminazione da endotossine mediante il Limulus assay. È stato riscontrato un livello di endotossine $<0,125$ EU/mL.

Protocollo sperimentale

Giunte a confluenza, le cellule sono state poste in quiescenza in terreno privo di siero per 24 ore arricchito con VitD (1 α ,25-diidrossivitamina D3), alla concentrazione finale di 10 nM per 1 h, come già riportato [18,19], e poi incubate con IL-6 (0,5 ng/mL). Le cellule stimulate con LPS (50 μ g/mL) sono servite come controllo positivo e quelle non trattate con VitD come controllo negativo.

L'espressione del TF è stata valutata, come precedentemente riportato [19], a 1 e 2 ore per i livelli genici e a 6 e 12 ore per quelli proteici.

L'espressione e l'attività di superficie sono state valutate a 6 ore. Analogamente, sono state valutate le espressioni di ACE2r, Caspasi-1 (come parte principale dell'Inflammasoma) e CAMs. Infine, per verificare l'effettivo coinvolgimento del recettore della VitD (VDR) nel meccanismo d'azione della VitD, le HUVEC sono state trattate anche con l'antagonista del VDR ZK159222. Questo antagonista del VDR è stato utilizzato alla stessa concentrazione della VitD (10 nM), come già riportato [19]. Sono state valutate l'espressione del mRNA-TF e l'attività procoagulante.

Livelli genici e proteici del Tissue Factor, traslocazione di superficie e attività funzionale.

I livelli genici del TF sono stati valutati nelle HUVEC stimulate e sono stati valutati a 1 e 2 ore come precedentemente descritto [19]. Dopo la stimolazione, le cellule sono state lavate con soluzione salina tamponata con fosfato (PBS). L'mRNA totale è stato estratto con il reagente TRIzol, secondo il protocollo standard. La trascrizione inversa è stata eseguita utilizzando SensiFAST cDNA e 100 ng di campioni di RNA da ciascuna condizione di coltura. I campioni sono stati eseguiti in triplicato in reazioni da 20 μ L utilizzando un sistema di rivelazione di sequenza Rotor-Gene Q. I campioni sono stati incubati a 95 °C per 2 minuti e poi sottoposti a 40 cicli a 95 °C per 5 s e a 60 °C per 1 minuto utilizzando la chimica SYBR green. Gli oligonucleotidi specifici per la GAPDH umana ed il TF umano sono stati progettati con il software PRIMER EXPRESS

sulla base delle sequenze pubblicate [19]. I risultati sono stati analizzati con un metodo comparativo e i valori sono stati normalizzati rispetto all'espressione di GAPDH e convertiti in variazione percentuale. Per ogni condizione sperimentale sono stati eseguiti tre diversi esperimenti. I livelli di proteina del TF sono stati eseguiti in lisati cellulari a 6 e 12 ore dalla stimolazione con IL-6. I campioni (30 µg) sono stati trattati con tampone per campioni SDS-PAGE, seguito da riscaldamento, e quindi sottoposti a gel al 10%. Le proteine sono state trasferite su membrane con un sistema di blotting a secco iBLOT2, secondo le istruzioni del produttore. Il TF è stato rilevato con un anticorpo specifico (1:1000, American Diagnostica Inc., Greenwich, CT, USA). Dopo aver rilevato il TF, le membrane sono state "strippate" e quindi trattate per rilevare l'espressione della tubulina come proteina housekeeping. Le intensità delle bande sono state quantificate con il software Image 1 J (unità densitometriche 103) ed espresse graficamente. Sono stati eseguiti sei diversi esperimenti per ogni condizione sperimentale. L'espressione di membrana di TF è stata valutata a 6 ore tramite analisi FACS dopo l'incubazione con IL-6. Per questa analisi, le HUVEC sono state staccate con 10 mmol/L EDTA in PBS (senza tripsina) e colorate con un anticorpo monoclonale marcato con FITC contro il TF, o con l'appropriato isotipo IgG (ficoeritrina o FITC) come controllo. L'intensità della fluorescenza di 9000 cellule per ogni campione è stata quantificata da un analizzatore FACSCalibur. L'attività funzionale del TF indotto dall'IL-6 è stata valutata utilizzando un saggio colorimetrico specifico, basato sulla capacità del TF di promuovere la

generazione di FXa, come precedentemente descritto [19,20]. In breve, dopo la stimolazione con IL-6, le cellule sono state lavate e incubate con 1 nM di FVIIa umano ricombinante, seguito da 100 nM di FXa umano purificato e 5 mM CaCl₂ per 15 minuti a 37 °C. È stato quindi aggiunto un substrato cromogenico specifico per FX e incubato per 30 minuti a 37 °C. La reazione è stata fermata aggiungendo 200 µL/mL di acido acetico (soluzione al 30%) e la variazione della densità ottica a 405 nm è stata quantificata con uno spettrofotometro. La curva standard è stata generata utilizzando FXa purificato a concentrazione nota. Per ogni condizione sperimentale sono stati eseguiti sei diversi esperimenti.

Valutazione dei livelli di mRNA e proteina codificanti per il recettore per ACE2.

L'espressione genica del recettore ACE2 è stata valutata mediante Real Time PCR. Le cellule endoteliali sono state incubate con IL-6 e i livelli di mRNA_{ACE2r} sono stati misurati a 4 ore. Oligonucleotidi specifici per l'ACE2r umano sono stati progettati sulla base di sequenze pubblicate utilizzando il software PRIMER EXPRESS e validati per la loro specificità. I risultati sono stati analizzati con un metodo comparativo e i valori sono stati normalizzati rispetto all'espressione di GAPDH e convertiti in variazione percentuale. Per ogni condizione sperimentale sono stati eseguiti tre diversi esperimenti. I livelli di proteina ACE2r sono stati misurati nelle HUVEC stimulate con IL-6 mediante

analisi Western Blot secondo il protocollo standard, come indicato. L'ACE2r è stato rilevato a 8 ore dalla stimolazione con un anticorpo monoclonale specifico (Invitrogen MA5-26629). Dopo aver rilevato l'ACE2r, le membrane sono state strippate e poi trattate per rilevare l'espressione della tubulina come proteina housekeeping. Le intensità delle bande sono state quantificate con il software Image 1 J (unità densimetriche 103) ed espresse graficamente. Per ogni condizione sperimentale sono stati eseguiti sei diversi esperimenti.

Effetti sull'espressione delle molecole di adesione.

I livelli di ICAM-1 e VCAM-1 solubili sono stati misurati nelle HUVEC a 12 ore dalla stimolazione con IL-6 utilizzando specifici saggi ELISA (BMS201 e KHT0601). Entrambi i test sono stati eseguiti secondo le istruzioni del produttore. Per ogni condizione sperimentale sono stati eseguiti sei diversi esperimenti [19].

Effetti della IL-6 sulle HUVEC: meccanismi molecolari.

È stato riportato che l'IL-6 attiva diverse vie intracellulari, come NF- κ B e STAT3 [21] e che queste vie regolano l'espressione di TF e CAMs. Pertanto, il potenziale coinvolgimento di queste vie intracellulari è stato studiato nel nostro protocollo sperimentale. A questo scopo, le HUVEC sono state incubate con

IL-6 come sopra per 4 ore e poi la traslocazione di NF- κ B è stata valutata utilizzando un metodo sensibile e non radioattivo per rilevare l'attività di legame al DNA del fattore di trascrizione specifico (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). I livelli di STAT3 sono stati misurati con un kit ELISA EKC2516. In parallelo, i livelli di proteina I κ B sono stati valutati mediante analisi Western blot utilizzando un anticorpo anti-I κ B (diluizione 1:1000). Per ogni condizione sperimentale sono stati eseguiti tre diversi esperimenti.

Effetti della IL-6 sulle HUVEC: ruolo della proteina NLRP3.

Alcune prove hanno dimostrato che la tempesta di citochine con livelli elevati di IL-1 e IL-6 osservata nei pazienti affetti da SARS-CoV-2 è dovuta all'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 [22,23]. Pertanto, in un'ulteriore serie di esperimenti abbiamo studiato l'effetto della VitD sulla Caspasi-1, un componente dell'inflammasoma attivo. Le HUVEC sono state trattate come sopra. I livelli di Caspasi-1 sono stati misurati a 6 ore mediante Western blot utilizzando l'anticorpo Caspasi-1 p20 orb221355. Dopo aver rilevato la Caspasi1, le membrane sono state strippate e poi trattate per rilevare l'espressione della tubulina come proteina housekeeping. Le intensità delle bande sono state quantificate con il software Image 1 J (unità densitometriche 103) ed espresse graficamente. Per ogni condizione sperimentale sono stati eseguiti sei diversi esperimenti.

Analisi statistica

I dati sono presentati come $\text{media} \pm \text{SD}$. Le differenze tra i gruppi sono state determinate mediante un'ANOVA a una via, seguita da un test *t Student* con correzione di Bonferroni. Un *p* value < 0,05 è stato considerato statisticamente significativo. Per tutte le analisi statistiche è stato utilizzato il programma SPSS 22.0 Statistical Package Program for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, US).

Risultati

Livelli genici e proteici del Tissue Factor, traslocazione di superficie e attività funzionale.

In linea con quanto riportato in studi precedenti [19,20], i livelli del gene del TF erano quasi impercettibili nelle cellule endoteliali non stimolate. L'incubazione con IL-6 ha causato un aumento significativo dei livelli di mRNA-TF, in modo dipendente dal tempo, rispetto alle cellule non stimolate (Figura 1A). È mostrato anche l'aumento dell'effetto dell'LPS come controllo positivo. Questi effetti mediati dall'IL-6 sono stati significativamente ridotti nelle HUVEC incubate con VitD (Figura 1A). Inoltre, l'incubazione con un antagonista specifico del VDR (ZK15) ha abolito completamente la riduzione dei livelli genici del TF esercitata dalla VitD (Figura 1A). Allo stesso modo, i livelli di proteina TF, valutati mediante Western blot, erano quasi irrilevabili nelle HUVEC non stimolate. L'incubazione con IL-6 ha indotto l'espressione della proteina TF in modo tempo-dipendente, che è stata significativamente ridotta nelle cellule preincubate con VitD (Figura 1B). L'espressione del Fattore Tissutale sulla superficie cellulare è stata misurata mediante analisi FACS. Il TF era quasi irrilevabile sulle HUVEC non stimolate, sia al basale che nelle cellule stimolate con la sola VitD. L'incubazione con IL-6 ha causato un aumento significativo dell'espressione di TF sulla superficie delle HUVEC (Figura 2A, B). Analogamente, l'attività procoagulante del TF, determinata mediante un saggio colorimetrico a due fasi, basato sulla capacità del TF di

promuovere la generazione di FXa della coagulazione, era quasi irrilevabile al basale e sulle cellule stimulate con VitD. L'attività procoagulante è aumentata dopo la stimolazione con IL-6 (Figura 2C). La VitD ha impedito gli effetti esercitati dall'IL-6 sull'espressione e sull'attività di TF (Figura 2). Inoltre, in presenza di ZK15, l'attività procoagulante del TF era paragonabile all'effetto dell'IL-6 (Figura 2C).

Valutazione dei livelli di mRNA e proteina codificanti per il recettore per ACE2.

I livelli di mRNA per l'ACE2r sono stati esaminati mediante PCR in tempo reale. Nelle cellule non stimulate, i livelli di mRNA-ACE2r erano molto bassi. L'incubazione con la sola VitD non ha causato alcuna variazione nei livelli del gene. Al contrario, la stimolazione con IL-6 ha determinato una significativa induzione dei livelli di mRNA-ACE2r rispetto alle cellule non stimulate. Questi effetti dell'IL-6 sui livelli di mRNA sono stati significativamente ridotti nelle HUVEC incubate con VitD. (Figura 3A). Allo stesso modo, sono stati rilevati livelli molto bassi di proteine nelle cellule non stimulate e nelle HUVEC coltivate con VitD (Figura 3B). I livelli di proteina ACE2r sono aumentati significativamente nelle cellule stimulate con IL-6. Questi effetti sono stati significativamente ridotti nelle HUVEC coltivate con VitD.

Effetti sull'espressione delle molecole di adesione.

Le CAM solubili sono state valutate nei surnatanti cellulari mediante specifici kit ELISA. Nelle cellule non stimolate e in quelle stimolate con la sola VitD sono stati misurati livelli basali molto bassi di ICAM-1 e VCAM-1 solubili. Al contrario, l'incubazione con IL-6 è stata associata con un aumento significativo dei livelli di CAM solubili nei surnatanti cellulari. La preincubazione con VitD ha impedito in modo significativo l'espressione di ICAM-1 e VCAM-1 in misura simile (Figura 4A, B).

Effetti della IL-6 sulle HUVEC: meccanismi molecolari.

La traslocazione nucleare di NF- κ B è stata valutata con un metodo sensibile e non radioattivo per rilevare l'attività di legame al DNA del fattore di trascrizione specifico. La traslocazione di NF- κ B non è stata osservata nelle cellule non stimolate e in quelle stimolate con la sola VitD. Nelle cellule preincubate con VitD prima di essere stimolate con IL-6, la traslocazione di NF- κ B dal citosol al nucleo è stata significativamente ridotta (Figura 5A). Come previsto e in linea con i risultati della traslocazione di NF- κ B, i livelli citoplasmatici di I κ B valutati mediante Western blot sono stati ridotti nelle HUVEC stimolate con IL-6 e normalizzati nelle cellule preincubate con VitD

(Figura 5B). Nelle cellule trattate con IL-6 è stata osservata l'attivazione di STAT3. Questo fenomeno è stato significativamente ridotto nelle cellule incubate con VitD (Figura 5C).

Effetti della IL-6 sulle HUVEC: ruolo della proteina NLRP3.

Per valutare l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3, l'espressione della caspasi-1 è stata valutata mediante Western blot. La caspasi-1 non era quasi rilevabile nelle cellule non stimolate e in quelle stimolate con VitD. L'IL-6 ha causato un aumento significativo dell'espressione della caspasi-1. Il pretrattamento con VitD ha ridotto significativamente gli effetti dell'IL-6 (Figura 6).

Discussione

I risultati più importanti del presente studio sono: (1) l'IL-6 esercita effetti pro aterotrombotici sulle cellule endoteliali umane attraverso l'espressione del TF e delle molecole di adesione VCAM-1/ICAM-1; (2) questi effetti appaiono modulati dall'attivazione di NF- κ B e STAT; (3) questa citochina modula l'attivazione dell'inflammasoma regolando l'espressione di NLRP3, e determina incremento dell'espressione del recettore per il SARS-CoV-2, ACE2r; (4) la VitD riduce significativamente gli effetti della IL-6 su TF e CAMs attraverso la modulazione dell'attivazione di NF- κ B, STAT3, della proteina NLRP3 e del recettore ACE.

Numerose evidenze hanno dimostrato la stretta relazione tra infiammazione e trombosi in diverse malattie [1]. Ad esempio, la fisiopatologia dell'aterosclerosi e delle sue complicanze trombotiche riconosce un ruolo importante all'immunoinfiammazione [24]. Inoltre, l'infiammazione sembra essere associata a eventi trombotici nell'infezione sostenuta da SARS-CoV-2 [6,11,12,25,26]. La disfunzione endoteliale sembra svolgere un ruolo centrale nella fisiopatologia della trombosi associata all'infiammazione [3,27,28]. In particolare, nell'infezione da SARS-CoV-2 l'attacco virale all'ospite causa una risposta immunologica disadattiva che aumenta la permeabilità vascolare, portando infine alla disfunzione endoteliale e all'attivazione della coagulazione [29,30]. In questa risposta dell'ospite, che coinvolge diverse cellule immunologiche e il rilascio di varie citochine, l'infezione da COVID-19 è associata a una tempesta di citochine

in cui i livelli di IL-6 sono fortemente aumentati, soprattutto in quei pazienti critici in cui la trombosi è potenziata [11,31]. Nel nostro studio abbiamo dimostrato che l'IL-6 esercita effetti pro-trombotici sulle cellule endoteliali umane perché promuove l'espressione del gene codificante per il TF, attivatore naturale della cascata della coagulazione. Inoltre, abbiamo dimostrato che l'aumento dell'espressione genica si accompagna all'aumento della trascrizione della proteina ed all'aumento dei suoi livelli di espressione sulla superficie delle cellule stimulate. Infine, dato fisiopatologicamente più importante, il TF neoespresso risulta funzionalmente attivo e quindi in grado di promuovere la coagulazione. Questi risultati suggerirebbero che uno dei meccanismi attraverso cui il SARS-CoV-2 determina trombosi microvascolare potrebbe essere proprio l'attivazione della coagulazione mediata dall'IL-6. Un altro meccanismo di malattia suggerito per l'infezione da SARS-CoV-2 sembra essere la perdita dell'integrità endoteliale associata a cambiamenti nell'espressione di superficie della molecola di adesione intracellulare-1 (ICAM1), della proteina di adesione delle cellule vascolari-1 (VCAM1) e della proteina di impalcatura della giunzione stretta zonula occludens-1 (ZO-1) [32]. In sintonia con queste evidenze, abbiamo dimostrato che l'IL-6 aumenta i livelli solubili delle molecole di adesione, confermando che questo potrebbe essere un altro dei meccanismi di azione che modulano gli effetti endoteliali osservati con COVID-19.

E' noto che il SARS-CoV-2 infetta le sue cellule bersaglio legandosi al recettore dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2r), che è il principale recettore per SARS-CoV2 [33]. Lo stesso ACE2r è stato dimostrato essere la porta d'ingresso per il virus anche nelle cellule endoteliali, portando infine a una compromissione dell'omeostasi endoteliale [8]. Nel nostro studio abbiamo evidenziato che l'IL-6 potrebbe amplificare la risposta al SARS-CoV-2 aumentando l'espressione genica e proteica dell'ACE2r nelle cellule endoteliali, suggerendo che questo potrebbe essere uno degli ipotetici meccanismi con cui il virus amplifica la sua azione sulle cellule endoteliali.

Diversi studi hanno indicato che l'attivazione di NF- κ B è uno dei principali meccanismi molecolari che seguono la tempesta di citochine indotta dal virus SARS-CoV-2 [12,34]. In particolare, il legame di SARS-CoV-2 con ACE2r innesca l'endocitosi del recettore nella cellula ospite. Di conseguenza, si verificano diversi eventi intracellulari che iniziano con l'attivazione dei recettori Toll-like (TLR), proseguono con la traslocazione di NF- κ B nel nucleo e terminano con la trascrizione di diversi geni che codificano per proteine proinfiammatorie, inclusa la IL-6 [12,34]. L'espressione up-regolata del gene dell'IL-6 è seguita da un aumento dei livelli plasmatici di questa citochina che si lega al suo recettore e porta all'attivazione della via STAT3. Questa via, insieme alla via NF- κ B, provoca una sindrome da rilascio di citochine con una complessa risposta multi-infiammatoria [21]. L'attivazione di NF- κ B oltre ad auto

amplificare l'espressione dell'IL-6 potrebbe essere responsabile anche dell'attivazione della trombosi. Infatti, studi precedenti hanno dimostrato che NF- κ B potrebbe essere attivamente coinvolto nella fisiopatologia degli eventi trombotici vascolari, dal momento che i siti di legame per questo fattore di trascrizione sono contenuti nel promotore di TF [19,20,35]. Pertanto, è ipotizzabile che SARS-CoV-2 possa promuovere eventi trombotici attraverso questa via mediata da NF- κ B. A conferma che il fenomeno infiammatorio risulta coinvolto nella patogenesi dell'infezione da SARS-CoV-2 [31], nel nostro studio abbiamo evidenziato che l'IL-6, oltre ad aumentare la traslocazione di NF- κ B nel nucleo e l'attivazione di STAT3, determina anche l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 [36]. È stato riportato che l'attivazione dell'inflammasoma in risposta all'infezione da SARS-CoV-2 sembra essere associato con una prognosi peggiore [36, 37].

La vitamina D è una vitamina liposolubile [38] che sembra avere un ruolo protettivo in diverse malattie e in particolare in quelle cardiovascolari come ipertensione, infarto miocardico, insufficienza cardiaca e ictus [13]. Sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare i potenziali benefici della VitD, come la modulazione di geni coinvolti nella proliferazione e differenziazione cellulare, l'apoptosi, lo stress ossidativo, il trasporto di membrana, l'omeostasi della matrice e l'adesione cellulare [39]. Sul ruolo della VitD nello scenario della pandemia da SARS-CoV2 sono stati pubblicati risultati controversi. Alcuni dati hanno evidenziato che i livelli plasmatici di VitD potrebbero essere strettamente

correlati alla gravità della malattia [17]. Dati recenti provenienti da 20 diversi Paesi europei hanno mostrato una correlazione negativa tra i livelli di VitD e il numero di casi di SARS-CoV-2 per milione di abitanti in ciascun Paese[40]. Un altro rapporto indica che la carenza di VitD è marcatamente associata a un'infezione da SARS-CoV-2 più grave, a una risposta infiammatoria più elevata e a un aumento della morbilità e della mortalità [41]. D'altra parte, una meta-analisi più recente non ha collegato la carenza o l'insufficienza di VitD alla suscettibilità all'infezione da SARS-CoV-2 o alla mortalità [42]. L'ampia eterogeneità degli studi disponibili non sembra consentire di stabilire un rapporto definitivo di causa-effetto [43]. Anche in questo caso, la VitD è stata indicata come un importante regolatore della risposta immunitaria [44,45] in grado di esercitare anche effetti antivirali [46,47]. Ad esempio, nei macrofagi, la VitD ha mostrato un impatto predominante sulla risposta delle citochine oltre alla soppressione virale [45]. Infine, in diversi modelli sperimentali di polmonite e pneumonite, la VitD ha avuto un ruolo consistente nel ridurre la risposta infiammatoria delle citochine agli agenti patogeni [48,49]. Oltre a questi effetti immuno-infiammatori, altri rapporti hanno chiaramente indicato che la VitD è anche coinvolta nella regolazione delle vie trombotiche, dal momento che la sua carenza è stata segnalata come associata a un aumento del rischio di eventi trombotici [50]. Nel presente studio abbiamo dimostrato che la VitD riduce significativamente gli effetti dell'IL-6 sull'espressione genica e proteica della TF. Inoltre, questa

vitamina ha inibito l'attività procoagulante della TF indotta dall'IL-6 sulla superficie cellulare. In linea con un nostro precedente studio [19], l'effetto della VitD sembra essere mediato dal recettore della VitD (VDR), poiché l'uso di ZK15, un antagonista specifico del VDR, ha abolito il potenziale beneficio sull'espressione e sull'attività della TF esercitato dalla VitD.

Conclusione

I risultati del presente studio, con tutte le potenziali limitazioni derivanti da uno studio in vitro, suggeriscono che l'IL-6 potrebbe svolgere un ruolo centrale nel potenziale scenario patofisiologico in cui SARS-CoV-2 causa trombosi. In particolare, abbiamo dimostrato che l'IL-6, uno dei principali mediatori chimici coinvolti nella tempesta di citochine dell'infezione da SARS-CoV-2, induce l'espressione di un fenotipo pro-aterotrombotico in cellule endoteliali umane in coltura aumentando i livelli di TF funzionalmente attivo e delle molecole di adesione solubili ICAM-1 e VCAM-1, marcatori di disfunzione endoteliale.

L'IL-6 sembra esercitare questi effetti modulando le vie NF-kB e STAT3. Inoltre, l'IL-6 regola i livelli di ACE2, il recettore naturale di SARS-CoV-2, amplificando infine gli effetti del virus sulle cellule endoteliali. Di particolare interesse sono i risultati derivati dall' utilizzo della Vitamina D che risulta essere in grado di antagonizzare gli effetti esercitati dall' IL-6 sulle cellule endoteliali. Nel complesso, i dati del presente studio gettano una luce più chiara sulla questione ancora parzialmente irrisolta degli effetti benefici della VitD osservati nei pazienti con infiammazione correlata all'IL-6 come la malattia da COVID-19, suggerendo un possibile meccanismo molecolare attraverso il quale questa vitamina esercita la sua azione. Tuttavia, sono necessari studi clinici rigorosi e ben condotti per affrontare questo problema nello scenario clinico.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Jackson, S.P.; Darbousset, R.; Schoenwaelder, S.M. Thromboinflammation: Challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. *Blood* 2019, 133, 906–918.
2. Ma, R.C.J.; Voetsch, B.; Loscalzo, J. Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function. *Microcirculation* 2005, 12, 247–258.
3. Gimbrone, M.A., Jr.; Garcia-Cardena, G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ. Res.* 2016, 118, 620–636.
4. Galkina, E.; Ley, K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007, 27, 2292–2301.
5. Grover, S.P.; Mackman, N. Tissue Factor: An Essential Mediator of Hemostasis and Trigger of Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2018, 38, 709–725.
6. Labò, N.; Ohnuki, H.; Tosato, G. Vasculopathy and Coagulopathy Associated with SARS-CoV-2 Infection. *Cells* 2020, 9, 1583.
7. Godino, C.; Scotti, A.; Maugeri, N.; Mancini, N.; Fominskiy, E.; Margonato, A.; Landoni, G. Antithrombotic therapy in patients with COVID19? Rationale and Evidence. *Int. J. Cardiol.* 2021, 324, 261–266.

8. Shang, J.; Wan, Y.; Luo, C.; Ye, G.; Geng, Q.; Auerbach, A.; Li, F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2020, 117, 11727–11734.
9. Zhou, P.; Yang, X.-L.; Wang, X.-G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.-R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.-L.; et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020, 579, 270–273.
10. Fajgenbaum, D.C.; June, C.H. Cytokine Storm. *N. Engl. J. Med.* 2020, 383, 2255–2273.
11. Del Valle, D.M.; Kim-Schulze, S.; Huang, H.-H.; Beckmann, N.D.; Nirenberg, S.; Wang, B.; Lavin, Y.; Swartz, T.H.; Madduri, D.; Stock, A.; et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat. Med.* 2020, 26, 1636–1643.
12. Hojyo, S.; Uchida, M.; Tanaka, K.; Hasebe, R.; Tanaka, Y.; Murakami, M.; Hirano, T. How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. *Inflamm. Regen.* 2020, 40, 37.
13. Kouvari, M.; Panagiotakos, D.B. Vitamin D status, gender and cardiovascular diseases: A systematic review of prospective epidemiological studies. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 2019, 17, 545–555.
14. Wimalawansa, S.J. Vitamin D and cardiovascular diseases: Causality. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2018, 175, 29–43.
15. Schwarz, N.; Nicholls, S.J.; Psaltis, P.J. Vitamin D and Cardiovascular Disease. *Heart Lung Circ.* 2018, 27, 903–906.

16. Martineau, A.R.; Jolliffe, D.A.; Hooper, R.L.; Greenberg, L.; Aloia, J.F.; Bergman, P.; Dubnov-Raz, G.; Esposito, S.; Ganmaa, D.; Ginde, A.A.; et al. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: Systematic review and meta-analysis of individual participant data. *BMJ* 2017, 356, i6583.
17. Laird, E.; Rhodes, J.; Kenny, R.A. Vitamin D and Inflammation: Potential Implications for Severity of COVID-19. *Ir. Med. J.* 2020, 113, 81.
18. Martinez-Moreno, J.M.; Herencia, C.; Montes de Oca, A.; MunozCastaneda, J.R.; Rodriguez-Ortiz, M.E.; Diaz-Tocados, J.M.; Peralbo-Santaella, E.; Camargo, A.; Canalejo, A.; Rodriguez, M.; et al. Vitamin D modulates tissue factor and protease-activated receptor 2 expression in vascular smooth muscle cells. *FASEB J.* 2016, 30, 1367–1376.
19. Cimmino, G.; Morello, A.; Conte, S.; Pellegrino, G.; Marra, L.; Golino, P.; Cirillo, P. Vitamin D inhibits Tissue Factor and CAMs expression in oxidized low-density lipoproteins-treated human endothelial cells by modulating NF-kappaB pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 2020, 885, 173422.
20. Cirillo, P.; Conte, S.; Cimmino, G.; Pellegrino, G.; Ziviello, F.; Barra, G.; Sasso, F.C.; Borgia, F.; De Palma, R.; Trimarco, B. Nobiletin inhibits oxidized-LDL mediated expression of Tissue Factor in human endothelial cells through inhibition of NF-kappaB. *Biochem. Pharmacol.* 2017, 128, 26–33.

21. Luo, Y.; Zheng, S.G. Hall of Fame among Pro-inflammatory Cytokines: Interleukin-6 Gene and Its Transcriptional Regulation Mechanisms. *Front. Immunol.* 2016, 7, 604.
22. Freeman, T.L.; Swartz, T.H. Targeting the NLRP3 Inflammasome in Severe COVID-19. *Front. Immunol.* 2020, 11, 1518.
23. Ratajczak, M.Z.; Kucia, M. SARS-CoV-2 infection and overactivation of Nlrp3 inflammasome as a trigger of cytokine “storm” and risk factor for damage of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2020, 34, 1726–1729.
24. Cimmino, G.; Loffredo, F.S.; Morello, A.; D’Elia, S.; De Palma, R.; Cirillo, P.; Golino, P. Immune-Inflammatory Activation in Acute Coronary Syndromes: A Look into the Heart of Unstable Coronary Plaque. *Curr. Cardiol. Rev.* 2017, 13, 110–117.
25. Raggi, P.; Genest, J.; Giles, J.T.; Rayner, K.J.; Dwivedi, G.; Beanlands, R.S.; Gupta, M. Role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis and therapeutic interventions. *Atherosclerosis* 2018, 276, 98–108.
26. Abou-Ismaïl, M.Y.; Diamond, A.; Kapoor, S.; Arafah, Y.; Nayak, L. The hypercoagulable state in COVID-19: Incidence, pathophysiology, and management. *Thromb. Res.* 2020, 194, 101–115.
27. Gladka, M.M.; Maack, C. The endothelium as Achilles’ heel in COVID19 patients. *Cardiovasc. Res.* 2020, 116, e195–e197.

28. Libby, P.; Lüscher, T. COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. *Eur. Heart J.* 2020, 41, 3038–3044.
29. Goeijenbier, M.; van Wissen, M.; van de Weg, C.; Jong, E.; Gerdes, V.E.; Meijers, J.C.; Brandjes, D.P.; van Gorp, E.C. Review: Viral infections and mechanisms of thrombosis and bleeding. *J. Med. Virol.* 2012, 84, 1680–1696.
30. Rajendran, P.; Rengarajan, T.; Thangavel, J.; Nishigaki, Y.; Sakthisekaran, D.; Sethi, G.; Nishigaki, I. The vascular endothelium and human diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 2013, 9, 1057–1069.
31. Giannakodimos, I.; Gkoutana, G.-V.; Lykouras, D.; Karkoulias, K.; Tsakas, S. The role of Interleukin-6 in the pathogenesis, prognosis and treatment of severe COVID-19. *Curr. Med. Chem.* 2021, 28, 5328–5338.
32. Buzhdygan, T.P.; DeOre, B.J.; Baldwin-Leclair, A.; McGary, H.; Razmpour, R.; Galie, P.A.; Potula, R.; Andrews, A.M.; Ramirez, S.H. The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function in 2D static and 3D microfluidic in vitro models of the human blood-brain barrier. *bioRxiv* 2020.
33. Hamming, I.; Timens, W.; Bulthuis, M.L.; Lely, A.T.; Navis, G.; van Goor, H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* 2004, 203, 631–637.
34. Kircheis, R.; Haasbach, E.; Lueftenegger, D.; Heyken, W.T.; Ocker, M.; Planz, O. NF-kappaB Pathway as a Potential Target for Treatment of Critical Stage COVID-19 Patients. *Front. Immunol.* 2020, 11, 598444.

35. Cirillo, P.; Ziviello, F.; Pellegrino, G.; Conte, S.; Cimmino, G.; Giaquinto, A.; Pacifico, F.; Leonardi, A.; Golino, P.; Trimarco, B. The adipokine apelin-13 induces expression of prothrombotic tissue factor. *Thromb. Haemost.* 2015, 113, 363–372.
36. Broz, P.; Dixit, V.M. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2016, 16, 407–420.
37. Rodrigues, T.S.; de Sá, K.S.G.; Ishimoto, A.Y.; Becerra, A.; Oliveira, S.; Almeida, L.; Gonçalves, A.V.; Perucello, D.B.; Andrade, W.A.; Castro, R.; et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J. Exp. Med.* 2021, 218, e20201707.
38. Bikle, D.D. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem. Biol.* 2014, 21, 319–329.
39. Norman, P.E.; Powell, J.T. Vitamin D and cardiovascular disease. *Circ. Res.* 2014, 114, 379–393.
40. Ilie, P.C.; Stefanescu, S.; Smith, L. The role of vitamin D in the prevention of coronavirus disease 2019 infection and mortality. *Aging Clin. Exp. Res.* 2020, 32, 1195–1198.
41. Jain, A.; Chaurasia, R.; Sengar, N.S.; Singh, M.; Mahor, S.; Narain, S. Analysis of vitamin D level among asymptomatic and critically ill COVID-19 patients and its correlation with inflammatory markers. *Sci. Rep.* 2020, 10, 2019.
42. Chen, J.; Mei, K.; Xie, L.; Yuan, P.; Ma, J.; Yu, P.; Zhu, W.; Zheng, C.; Liu, X. Low vitamin D levels do not aggravate COVID-19 risk or death, and vitamin D supplementation does not improve outcomes in hospitalized patients

with COVID-19: A meta-analysis and GRADE assessment of cohort studies and RCTs. *Nutr. J.* 2021, 20, 89.

43. Crafa, A.; Cannarella, R.; Condorelli, R.A.; Mongioì, L.M.; Barbagallo, F.; Aversa, A.; La Vignera, S.; Calogero, A.E. Influence of 25-hydroxycholecalciferol levels on SARS-CoV-2 infection and COVID-19 severity: A systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine* 2021, 37, 100967.

44. Bilezikian, J.P.; Bikle, D.; Hewison, M.; Lazaretti-Castro, M.; Formenti, A.M.; Gupta, A.; Madhavan, M.V.; Nair, N.; Babalyan, V.; Hutchings, N.; et al. Mechanisms in Endocrinology: Vitamin D and COVID-19. *Eur. J. Endocrinol.* 2020, 183, R133–R147.

45. Zdrengea, M.T.; Makrinioti, H.; Bagacean, C.; Bush, A.; Johnston, S.L.; Stanciu, L.A. Vitamin D modulation of innate immune responses to respiratory viral infections. *Rev. Med. Virol.* 2017, 27, e1909.

46. Telcian, A.G.; Zdrengea, M.T.; Edwards, M.R.; Laza-Stanca, V.; Mallia, P.; Johnston, S.L.; Stanciu, L.A. Vitamin D increases the antiviral activity of bronchial epithelial cells in vitro. *Antivir. Res.* 2017, 137, 93–10.

47. Schögler, A.; Muster, R.J.; Kieninger, E.; Casaulta, C.; Tapparel, C.; Jug, A.; Moeller, A.; Geiser, T.; Regamey, N.; Alves, M.P. Vitamin D represses rhinovirus replication in cystic fibrosis cells by inducing LL-37. *Eur. Respir. J.* 2016, 47, 520–530.

48. Zhang, Y.; Leung, D.Y.; Richers, B.N.; Liu, Y.; Remigio, L.K.; Riches, D.W.; Goleva, E. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase 1. *J. Immunol.* 2012, 188, 2127–2135.

49. Tsujino, I.; Ushikoshi-Nakayama, R.; Yamazaki, T.; Matsumoto, N.; Saito, I. Pulmonary activation of vitamin D3 and preventive effect against interstitial pneumonia. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2019, 65, 245–251.
50. Mohammad, S.; Mishra, A.; Ashraf, M.Z. Emerging Role of Vitamin D and its Associated Molecules in Pathways Related to Pathogenesis of Thrombosis. *Biomolecules* 2019, 9, 649.

LEGENDE E FIGURE

Figura 1. (A) Effetti della VitD sulla trascrizione di TF indotta da IL-6 in cellule endoteliali umane, valutati mediante PCR quantitativa in tempo reale. L'mRNA per il TF non era rilevabile al basale (BSL). L'incubazione con IL-6 ha causato un aumento significativo dei livelli di mRNA-TF, rispetto alle cellule non stimulate (CTRL). La pre-incubazione con VitD ha inibito l'effetto dell'IL-6 sull'mRNA-TF. L'uso di ZK15, antagonista del VDR, ha abolito completamente l'effetto. LPS è stato utilizzato come controllo positivo. I dati sono espressi in termini di incremento dell'induzione rispetto al gene di controllo rappresentato da GAPDH. Ogni barra rappresenta la media \pm deviazione standard (SD) di 3 diversi esperimenti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA test a una via con correzione Tukey test (* $p < 0,001$ vs. CTRL; ** $p < 0,001$ vs. IL-6; # $p = \text{NS}$ vs. IL-6). **(B)** Effetti della VitD sulla proteina TF indotta dall'IL-6 valutati mediante analisi Western blot dei lisati cellulari. L'IL-6 ha causato un aumento significativo dei livelli di proteina TF. Questi effetti sono stati prevenuti dal trattamento con VitD. La tubulina è stata utilizzata come controllo di carico. LPS è stato utilizzato come controllo positivo. Ogni barra rappresenta la media \pm SD di 6 diversi esperimenti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA test a una via con correzione Tukey test (* $p < 0,001$ vs. CTRL; ** $p < 0,001$ vs. IL-6). L'inserito mostra i risultati di un esperimento rappresentativo.

Figura 2. (A) L'analisi FACS ha mostrato che l'IL-6 ha indotto l'espressione di TF sulla superficie cellulare. Nei controlli (CTRL) e nelle cellule coltivate con la sola VitD, il TF non era quasi rilevabile sulle membrane (0,1%). La stimolazione con IL-6 ha causato TF+ nel $9,8 \pm 1,8\%$ di cellule. Nelle cellule trattate con IL-6 e pre-incubate con VitD, le cellule TF+ si sono ridotte all' $1,2 \pm 0,8\%$. LPS è servito come controllo positivo. **(B)** Esperimento di analisi FACS. Ogni punto rappresenta la media \pm SD di 6 esperimenti. (fino al 18% di cellule TF+; * $p < 0,001$ rispetto al controllo; ** $p < 0,001$ rispetto a IL-6 con ANOVA test a una via con correzione Tukey test). **(C)** Effetti della VitD sull'attività TF indotta dall'IL-6, valutata con un saggio colorimetrico a due fasi basato sulla capacità del TF/FVIIa di promuovere la generazione di FXa della coagulazione. L'attività del TF indotta dall'IL-6 riflette i risultati osservati per l'espressione del TF, confermando che il TF è funzionalmente attivo. La preincubazione con VitD riduce significativamente l'attività del TF. L'uso di ZK15 ha abolito l'effetto della VitD. LPS è servito come controllo positivo. Ogni colonna rappresenta la media \pm SD di 6 esperimenti in triplicato (* $p < 0,001$ vs. controllo; ** $p < 0,001$ vs. IL-6, # $p = \text{NS}$ vs. IL-6; con ANOVA test a una via con correzione Tukey test).

Figura 3. (A) Effetti della VitD sulla trascrizione dell'ACE2r indotta dall'IL-6 nelle cellule endoteliali umane, valutata mediante PCR quantitativa in tempo reale. L'mRNA codificante per ACE2r non era rilevabile al basale.

L'incubazione con IL-6 ha causato un aumento significativo dei livelli di mRNA di ACE2r, rispetto alle cellule non stimulate. La preincubazione con VitD ha inibito l'effetto dell'IL-6 sull'ACE2r-mRNA. LPS è servito come controllo positivo. I dati sono espressi come induzione in termini di pieghe rispetto al gene di controllo rappresentato da GAPDH. Ogni barra rappresenta la media \pm SD di 3 diversi esperimenti. (* $p < 0,001$ vs. controllo; ** $p < 0,001$ rispetto a IL-6; con ANOVA test a una via con correzione Tukey test). **(B)** Effetti della VitD sulla proteina ACE2r indotta dall'IL-6, valutati mediante analisi Western blot dei lisati cellulari. L'IL-6 ha causato un aumento significativo dei livelli di proteina ACE2r. Questi effetti sono stati prevenuti dal trattamento con VitD. La tubulina è servita come controllo di carico. LPS è servito come controllo positivo. Ogni barra rappresenta la media \pm SD di 6 diversi esperimenti (* $p < 0,001$ vs. controllo; ** $p < 0,001$ vs. IL-6; con ANOVA test a una via con correzione Tukey test). L'inserito mostra i risultati di un esperimento rappresentativo.

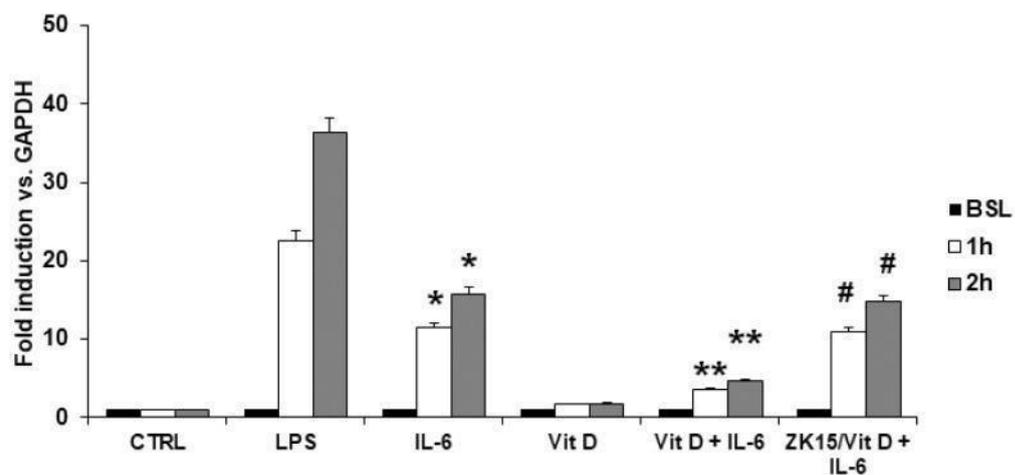
Figura 4. In condizioni basali, sono stati misurati livelli molto bassi di ICAM-1 e VCAM-1 solubili nei surnatanti delle HUVEC. La stimolazione con IL-6 ha aumentato in modo significativo le concentrazioni dei surnatanti: ICAM-1. ((**A**) $33,16 \pm 2,75$ ng/mL, * $p < 0,001$ rispetto al controllo con ANOVA test a una via con correzione Tukey test) e VCAM-1 ((**B**) $25,83 \pm 0,21$ ng/mL, * $p < 0,001$ rispetto al controllo con ANOVA test a una via con correzione Tukey test). La preincubazione con VitD ha prevenuto in modo significativo sia l'ICAM-1 solubile ((**A**) $15,06 \pm 0,7$ ng/mL, ** $p < 0,001$ rispetto alle cellule trattate con IL-6 con ANOVA test a una via con correzione Tukey test) e i livelli di VCAM-1 ((**B**) $11,39 \pm 0,62$ ng/mL, ** $p < 0,001$ rispetto alle cellule trattate con IL-6 con ANOVA test a una via con correzione Tukey test). Ogni colonna rappresenta la media \pm SD di 6 diversi esperimenti.

Figura 5. (A) Nelle HUVEC incubate con IL-6 è stato osservato un aumento significativo dei livelli di NF- κ B. Il pretrattamento delle cellule endoteliali con VitD ha impedito gli effetti di IL-6 su NF- κ B. LPS è servito come controllo positivo. Ogni barra rappresenta la media \pm SD di 3 diversi esperimenti. (* $p < 0,001$ vs. controllo; ** $p < 0,001$ vs. IL-6 con ANOVA test a una via con correzione Tukey test). **(B)** Analisi Western blot. La stimolazione con IL-6 determina una significativa riduzione dei livelli di I κ B. Al contrario, la preincubazione con VitD ripristina i livelli di I κ B. LPS è servito come controllo positivo. Ogni barra rappresenta la media \pm SD di 3 diversi esperimenti. (* $p < 0,001$ rispetto al controllo; ** $p < 0,001$ rispetto a IL-6 con ANOVA test a una via con correzione Tukey test). L'inserito mostra i risultati di un esperimento rappresentativo. **(C)** Nelle HUVEC incubate con IL-6, è stato osservato un aumento significativo dei livelli di STAT3. Il pretrattamento delle cellule endoteliali con VitD ha impedito gli effetti di IL-6 su STAT3. LPS è servito come controllo positivo. Ogni barra rappresenta la media \pm SD di 3 diversi esperimenti. (* $p < 0,001$ rispetto al controllo; ** $p < 0,001$ rispetto a IL-6 con ANOVA test a una via con correzione Tukey test).

Figura 6. L'IL-6 ha causato un aumento significativo dei livelli di proteina Caspasi-1. Questi effetti sono stati prevenuti dal trattamento con VitD. La tubulina è servita come controllo di carico. LPS è servito come controllo positivo. Ogni barra rappresenta la media \pm SD di 6 diversi esperimenti (* $p < 0,001$ vs. controllo; ** $p < 0,001$ vs. IL-6; con ANOVA test a una via con correzione Tukey test). L'insero mostra i risultati di un esperimento rappresentativo.

Figura 1

A



B

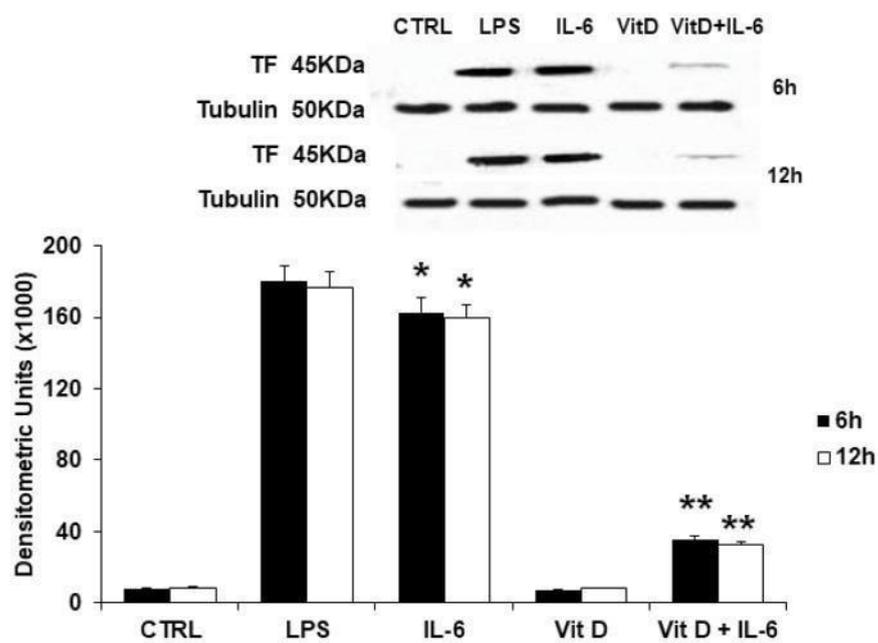


Figura 2

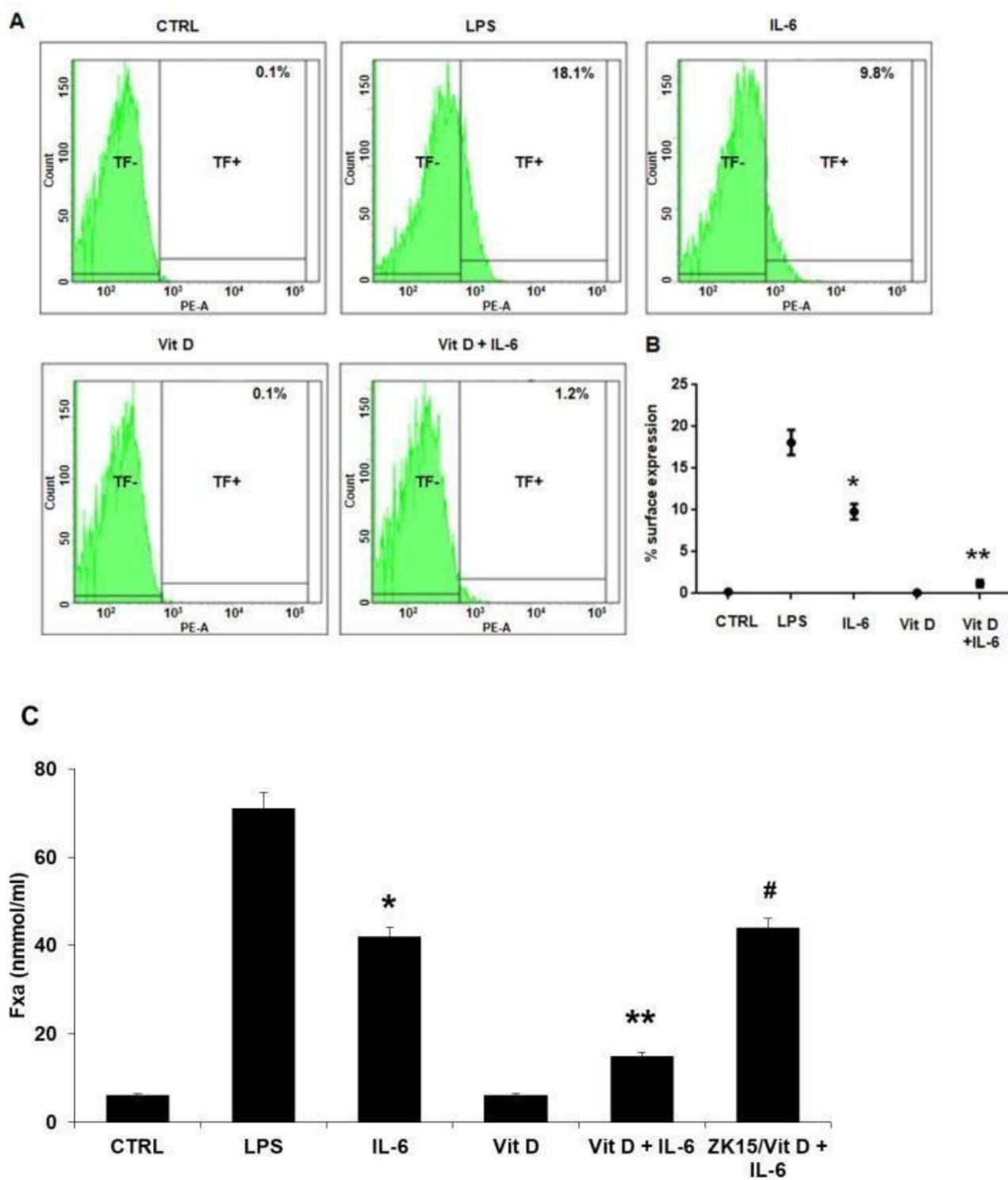
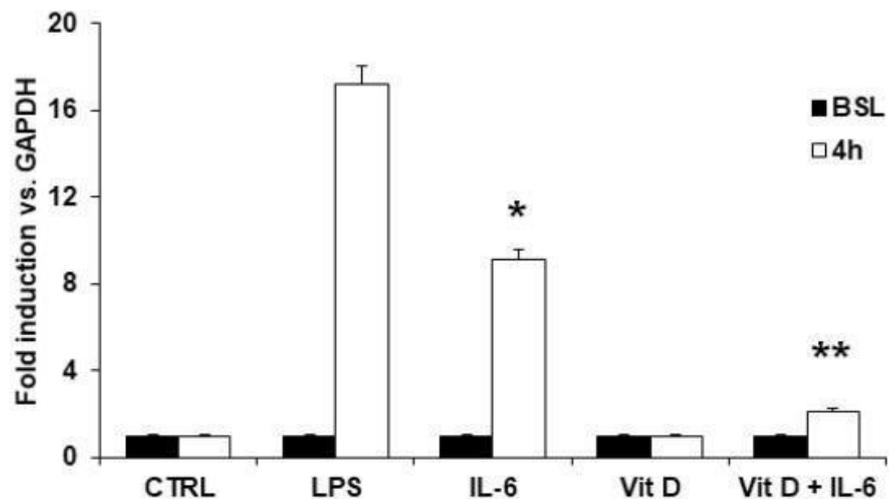


Figura 3

A



B

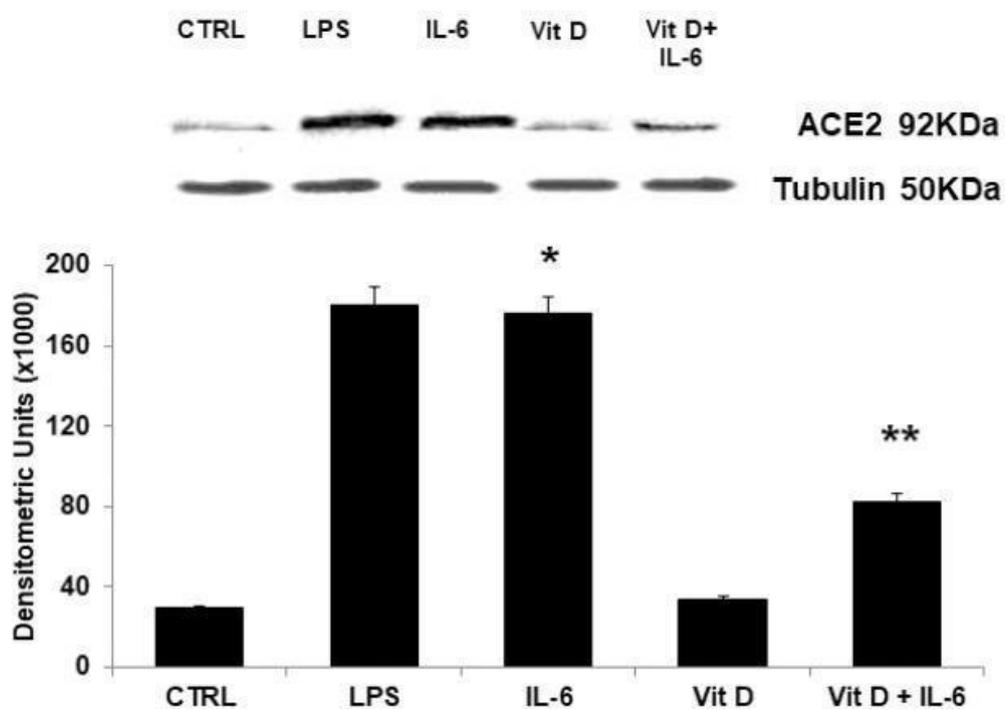
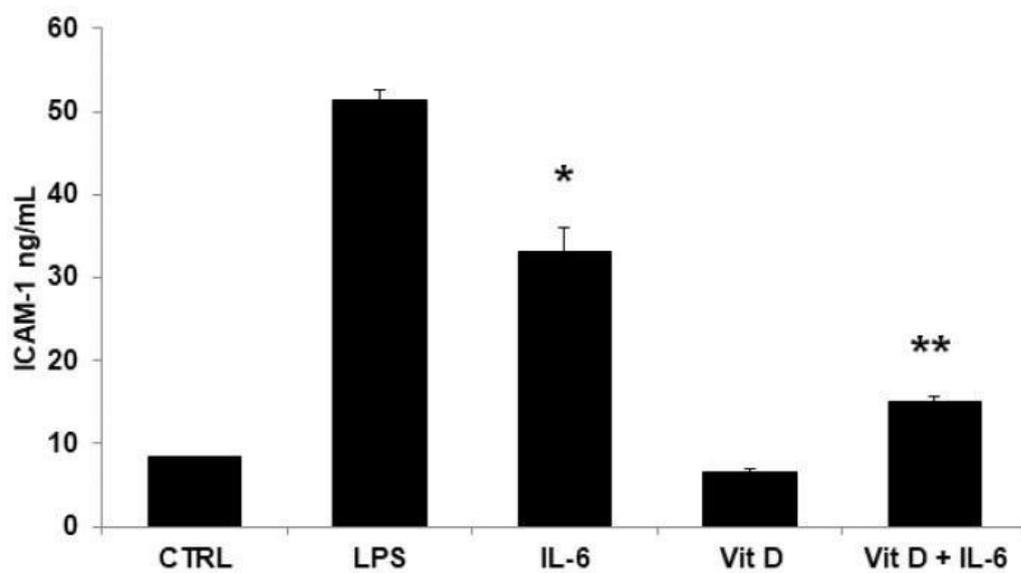


Figura 4

A



B

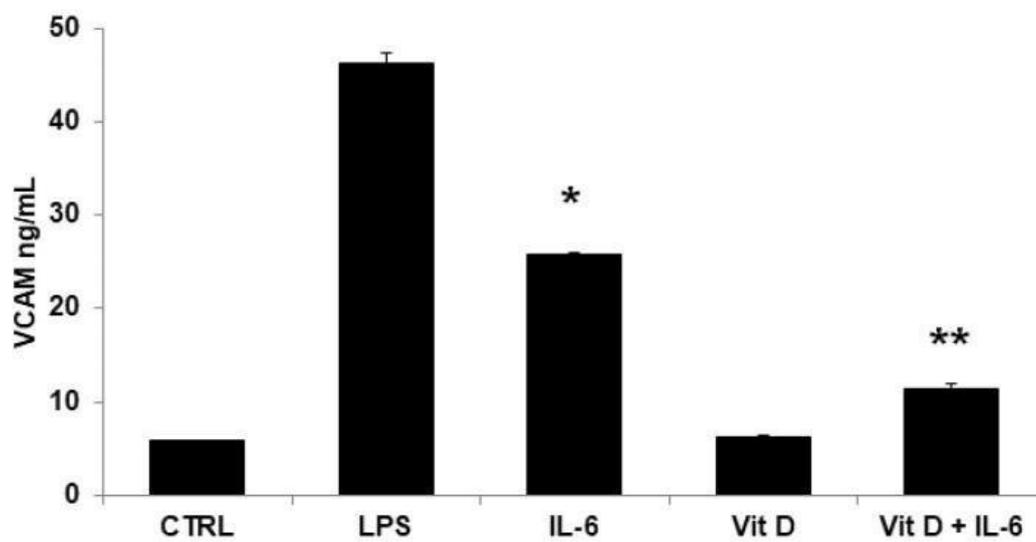


Figura 5

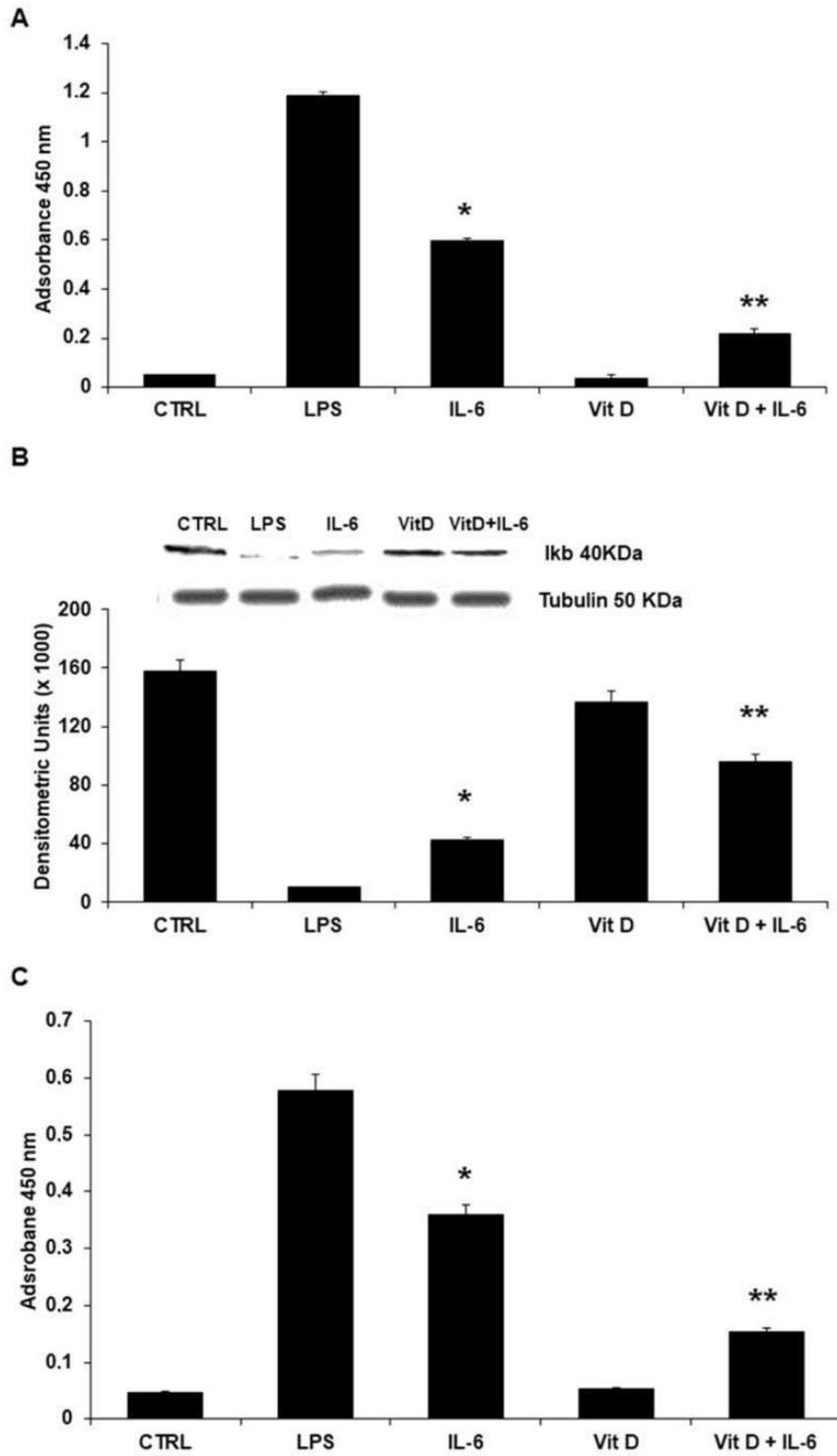
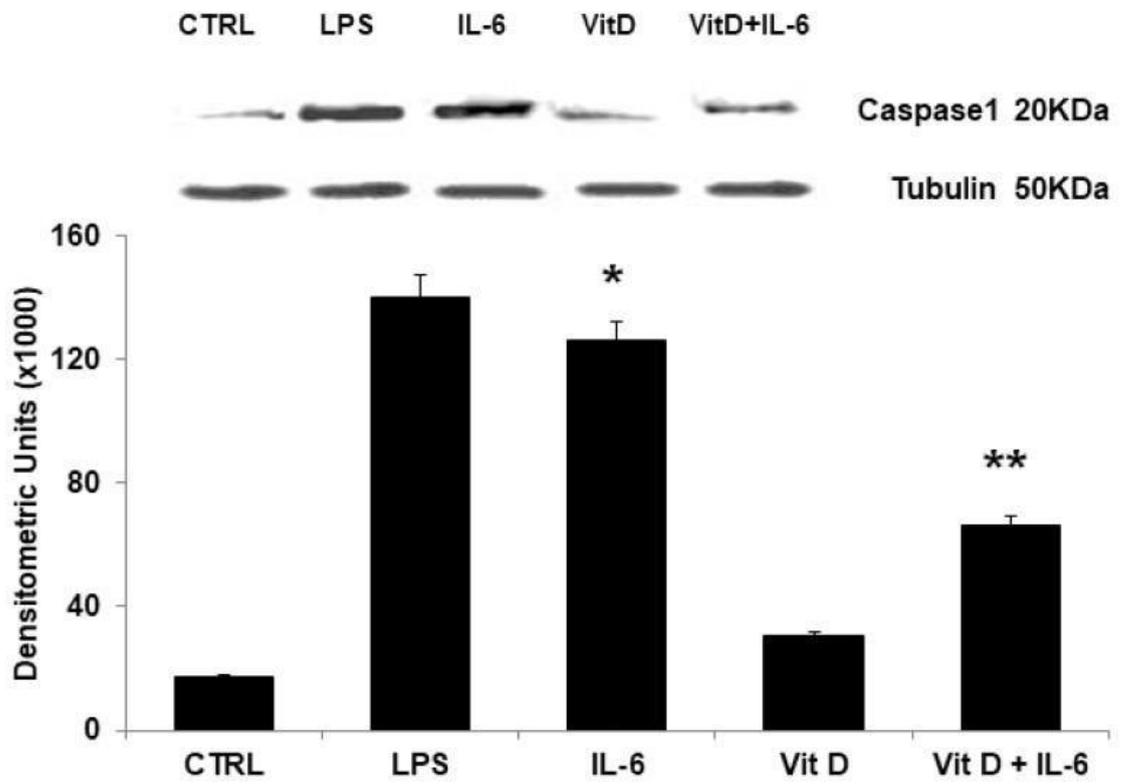


Figura 6



LISTA ABBREVIAZIONI

- ACE2r** Recettore dell'enzima convertitore dell'angiotensina 2
- CAMs** Molecole di adesione cellulare
- EGM2** Endothelial Cell Growth Medium 2
- ELISA** Enzyme-linked immunoassay
- FACS** Fluorescence activated cell sorting
- FBS** Siero fetale bovino
- FITC** fluorescina isotiocianato
- FVIIa** Fattore settimo attivato
- FXa** Fattore X attivato
- GAPDH** gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi
- HUVEC** Cellule endoteliali umane da vena ombelicale
- ICAM** Intercellular Adhesion Molecule
- IL-1** Interleuchina-1
- IL-6** Interleuchina-6
- LPS** Lipopolisaccaride
- NF-kB** Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
- NLRP3** NOD-like receptor PYD domain 3
- RT-PCR** Real time-PCR
- Sars-Cov2** Sindrome respiratoria acuta severa da Coronavirus 2
- STAT3** Signal transducer and activator of transcription 3
- TF** Fattori tissutale
- TLR** Toll-like
- VCAM-1** Vascular cell adhesion molecule
- VDR** Recettore della vitamina D
- VitD** Vitamina D
- ZO-1** zonula occludens-1