

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO
II



**DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA
SPERIMENTALE**

INDIRIZZO IN SCIENZE IMMUNO-REUMATOLOGICHE

XIX Ciclo

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

TESI DI DOTTORATO

**CARATTERIZZAZIONE DI MOLECOLE
PROINFIAMMATORIE NEL LAVAGGIO BRONCHIALE DI
PAZIENTI INTUBATI**

TUTOR

**Chiar.mo
Prof. Gianni Marone**

CANDIDATO

Dott. Donato Triggiani

INTRODUZIONE

pag. 4

MATERIALI E METODI

- *Reagenti e tamponi* pag. 12
- *Lavaggio Bronchiale* pag. 14
- *Isolamento e purificazione dei macrofagi polmonari umani* pag. 16
- *Incubazioni cellulari* pag. 17
- *Dosaggi ELISA di citochine e chemochine* pag. 18
- *Determinazione attività enzimatica delle sPLA₂* pag. 19
- *Analisi statistica* pag. 20

RISULTATI

- *Standardizzazione della procedura del lavaggio bronchiale* pag. 21
- *Livelli di proteine e citochine nel lavaggio broncoalveolare* pag. 22
- *Livelli di sPLA₂ nel lavaggio broncoalveolare* pag. 22
- *Effetto della sPLA₂ sulla produzione di citochine e chemochine nei macrofagi polmonari* pag. 24
- *Attività enzimatica delle sPLA₂ presenti nel lavaggio broncoalveolare* pag. 26
- *Ruolo dell'attività enzimatica della sPLA₂ nella produzione di citochine e chemochine indotta nei macrofagi*

Polmonari

pag. 27

- *Effetto di Me-indoxam sulla produzione di citochine e chemochine indotta dalla sPLA₂ nei macrofagi polmonari*

pag. 29

DISCUSSIONE

pag. 33

BIBLIOGRAFIA

pag. 39

LEGENDA DELLE FIGURE

pag. 51

TABELLE

FIGURE

INTRODUZIONE

Le fosfolipasi A₂ (PLA₂) sono enzimi che catalizzano l'idrolisi dell'acido arachidonico (AA) dai fosfolipidi di membrana, determinando la formazione di acido arachidonico libero e di lisofosfolipidi [1, 2]. L'AA viene successivamente metabolizzato attraverso due vie enzimatiche: la via delle lipossigenasi, che conduce alla sintesi dei leucotrieni e la via delle cicloossigenasi, che determina la formazione di prostaglandine e trombossani [3]. Leucotrieni, prostaglandine e trombossani nel loro insieme costituiscono gli eicosanoidi, una famiglia di molecole con attività proinfiammatoria e regolatrice su molteplici funzioni cellulari e d'organo [4, 5]. Queste molecole intervengono, ad esempio, nella regolazione del tono vascolare, agendo come vasodilatatori (PGI₂) o vasocostrittori (TxA₂), nella modulazione dell'aggregazione piastrinica (PGI₂ come antiaggregante e TxA₂ come proaggregante), nella regolazione del tono bronchiale (PGD₂ e cisteinil-leucotrieni come broncocostrittori e PGE₂ come broncodilatatore) e del flusso ematico renale [4, 5].

Negli ultimi anni molteplici PLA₂ sono state caratterizzate e clonate (**Tabella I**). Le PLA₂ sono classicamente distinte in forme citosoliche (cPLA₂), presenti all'interno della cellula, e secretorie

(sPLA₂), contenute nei granuli intracellulari e secrete nell'ambiente extracellulare in seguito ad attivazione cellulare. Le cPLA₂ sono attivate da concentrazioni micromolari di calcio quali quelle presenti all'interno delle cellule attivate [6].

Le sPLA₂ sono enzimi a basso peso molecolare (12-16 kD) localizzati nei granuli citoplasmatici e secreti, dopo stimolazione cellulare, nell'ambiente extracellulare. Qui le sPLA₂ sono attivate dalla presenza di concentrazioni di calcio millimolari necessarie per la loro attività enzimatica [7]. Secondo la classificazione corrente le sPLA₂ sono identificate da un acronimo formato da una lettera minuscola che rappresenta la specie di provenienza (h: *human*; m: *mouse*) seguita dalla lettera "G" e dal numero romano indicativo del gruppo ed, eventualmente, dal sottogruppo. Ad esempio, la sPLA₂ umana di gruppo IB è indicata dall'acronimo hGIB. Gli isoenzimi delle sPLA₂ sono distinti in gruppi e sottogruppi che differiscono tra loro per sequenza aminoacidica, localizzazione cellulare e concentrazioni di Ca²⁺ necessarie all'attivazione [8].

Numerose cellule infiammatorie umane sono in grado di liberare sPLA₂. Elevati livelli di sPLA₂s sono stati riscontrati sia nei tessuti sede di infiammazione [9]. Queste osservazioni implicano che l'infiammazione sistemica o locale è associata al rilascio di sPLA₂s *in*

vivo e consentono di ipotizzare che le sPLA₂ possano avere un ruolo importante nella flogosi.

L'espressione delle sPLA₂ può variare da tessuto a tessuto e, nello stesso tessuto, può modificarsi a seconda delle condizioni fisiopatologiche [10-12]. Nell'uomo, sia cellule residenti nei tessuti (mastociti, macrofagi, cellule epiteliali, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce) che cellule circolanti (basofili, neutrofilo, eosinofili, monociti, linfociti) possono sintetizzare differenti isoforme di sPLA₂ **(Tabella I).**

Le sPLA₂ sono state inizialmente isolate nelle secrezioni digestive di rettili (gruppo IA, GIA) ed insetti (GIII) e nel secreto pancreatico di mammiferi (GIB) [13, 14]. Oltre alle funzioni digestive, alcuni di questi enzimi esplicano effetti neurotossici (danno neuronale diffuso) e miotossici (necrosi delle fibrocellule muscolari) [15]. Nel 1989 fu isolata e caratterizzata simultaneamente, dalle piastrine umane [16] e dal liquido sinoviale di pazienti affetti da artrite reumatoide [17], una sPLA₂ diversa da quella pancreatico ed identificata come sPLA₂ di gruppo IIA (hGIIA). Studi successivi hanno dimostrato che le sPLA₂ vengono secrete in quantità elevate in numerosi altri fluidi infiammatori [9]. Infatti, le sPLA₂ sono presenti non soltanto a livello sinoviale nei pazienti con artrite reumatoide [17], ma anche nel

plasma di pazienti affetti da patologie infiammatorie a carattere sistemico, quali l'ARDS [18], l'insufficienza multiorgano (MOF) [19], la pancreatite acuta [20], lo shock settico [21] e le ustioni estese [22] (**Tabella II**). I livelli sierici di sPLA₂ in queste patologie sono significativamente correlati con la severità, la prognosi e la mortalità [19-24]. Indagini recenti hanno dimostrato che alcune sPLA₂ sono presenti nel lavaggio broncoalveolare (BAL) sia di individui normali [25] che di pazienti asmatici e nel lavaggio nasale di pazienti con rinite [26-28]. Il test di broncoprovocazione specifico nei pazienti asmatici induce un incremento da 3 a 5 volte dei livelli di sPLA₂ nel BAL [26, 27]. Una ovvia implicazione della presenza di sPLA₂ nelle vie aeree è la possibilità di generare alte concentrazioni di acido arachidonico libero disponibile per la conversione in eicosanoidi da parte delle cellule infiammatorie residenti (mastociti, macrofagi, etc.) o reclutate (eosinofili) nello spazio alveolare dei pazienti con asma. Inoltre, le sPLA₂ secrete nello spazio alveolare dei pazienti asmatici sono in grado di degradare il surfactante e di generare lisofosfolipidi [27, 29], molecole dotate di attività citotossica sulle cellule epiteliali [30] ed in grado di esercitare numerosi effetti sulle cellule infiammatorie interagendo con specifici recettori di membrana [31].

L'osservazione che le sPLA₂ vengono prodotte e secrete in elevate quantità in corso di reazioni infiammatorie ha condotto all'ipotesi che esse possano svolgere un ruolo rilevante nei meccanismi della flogosi. Alcuni studi iniziali condotti in modelli sperimentali animali hanno dimostrato che diverse sPLA₂ (GIA, GIB, GIIA, GIII) sono in grado di attivare alcune funzioni cellulari [8] quali l'esocitosi, la produzione di citochine, di chemochine e di ossido nitrico, l'espressione di molecole di superficie e l'aumento della sopravvivenza delle cellule infiammatorie [32].

Uno dei meccanismi più conosciuti con cui la sPLA₂ partecipa alle reazioni infiammatorie è legato alla sua intrinseca capacità di generare acido arachidonico e lisofosfolipidi disponibili per la sintesi dei mediatori lipidici dell'infiammazione (eicosanoidi e *Platelet-Activating Factor*, PAF). Tuttavia, numerose evidenze sperimentali hanno suggerito che l'attività enzimatica non sia l'unica responsabile del meccanismo proinfiammatorio delle sPLA₂ [33]. In particolare è stato osservato che:

- 1) l'iniezione intraarticolare o intradermica di sPLA₂ enzimaticamente inattive in animali da esperimento riproduce, anche se in maniera attenuata, le reazioni infiammatorie causate dagli isoenzimi attivi [34, 35];

- 2) non tutte le sPLA₂ umane dotate di attività proinfiammatoria sono in grado di mobilizzare l'acido arachidonico dalle cellule intatte (**Tabella I**) [36];
- 3) sPLA₂ prive di attività enzimatica riproducono, *in vitro*, gli stessi effetti delle sPLA₂ cataliticamente attive [37, 38];
- 4) gli inibitori dell'attività enzimatica delle sPLA₂ non aboliscono gli effetti proinfiammatori di queste molecole sia *in vitro* che *in vivo* [33].

Studi condotti nell'ultimo decennio indicano che le sPLA₂ possiedono la capacità di interagire con diverse molecole presenti sulla membrana cellulare. Studi iniziali hanno dimostrato che le sPLA₂ possono indurre diverse risposte biologiche attraverso l'interazione con siti di legame presenti sulle cellule bersaglio [39-41]. È stato dimostrato che alcune sPLA₂ possono legarsi a siti di membrana rappresentati da proteoglicani contenenti eparan-solfato (*Heparan- Sulphate ProteoGlycans*: HSPG) [42] ed alcuni recettori di membrana [43]. È stato quindi ipotizzato che le sPLA₂ possano partecipare al processo infiammatorio interagendo con queste molecole di superficie. In realtà, studi recenti hanno dimostrato che il legame delle sPLA₂ con gli HSPG consente alle sPLA₂ di essere internalizzate in domini ad alto contenuto di acido arachidonico [44,

45]. Pertanto, le sPLA₂ verrebbero veicolate in aree cellulari dove è disponibile una elevata quantità di substrato per la formazione di eicosanoidi. Resta, tuttavia, da stabilire il ruolo dei recettori delle sPLA₂ nelle reazioni infiammatorie.

I macrofagi sono cellule immunitarie ampiamente rappresentate in diversi organi e tessuti umani (ad es. polmone, fegato, midollo, sinovia, etc.) dove svolgono un ruolo fondamentale nella induzione e mantenimento delle risposte infiammatorie ed immuni [46]. In particolare, i macrofagi rappresentano le cellule immunitarie predominanti nelle vie aeree sia degli individui normali che dei soggetti con patologie infiammatorie a carico dell'apparato respiratorio [47]. Pertanto queste cellule sono esposte *in vivo* ad elevate concentrazioni di sPLA₂ secrete nel corso di malattie respiratorie a carattere infiammatorio. Nel polmone i macrofagi svolgono un ruolo predominante in tutte le fasi della risposta immune attraverso la produzione di numerose molecole (preformate o sintetizzate *de novo*) tra le quali enzimi lisosomiali, mediatori lipidici, metalloproteinasi, citochine e chemochine [48].

Gran parte delle malattie associate ad elevati livelli di sPLA₂ hanno, come caratteristica comune, la presenza di elevate concentrazioni di citochine proinfiammatorie quali TNF- α , IL-1 e IL-

6, nel circolo ematico [49]. I macrofagi tissutali costituiscono la principale cellula d'origine di queste citochine. E' stato recentemente dimostrato che la sPLA₂ isolata dal veleno di *Naja mossaambica mossaambica* (svGIA) e la sPLA₂ umana GIIA (hGIIA) stimolano la produzione di IL-6 dai macrofagi polmonari umani attraverso un meccanismo indipendente dalla loro attività enzimatica [50]. Studi condotti in biopsie bronchiali e nei lavaggi broncoalveolari di asmatici hanno dimostrato che, oltre alla GIIA, nel polmone umano sono espresse anche altre sPLA₂ come la GIB, la GV, la GX e la GXII (Tabella I).

L'obiettivo di questo progetto e' stato quello di identificare e caratterizzare la presenza di sPLA₂ e di altri mediatori dell'infiammazione nei lavaggi bronchiali dei pazienti sottoposti ad intubazione tracheale. Mediante l'uso di sPLA₂ ricombinanti umane, abbiamo inoltre valutato gli effetti di diverse isoforme di sPLA₂ sulla sintesi di citochine e chemochine dai macrofagi polmonari umani (HLM).

MATERIALI E METODI

Reagenti e Tamponi

I seguenti materiali sono stati acquistati: il lipopolisaccaride (LPS) da *Escherichia coli* sierotipo 026:B6, l'albumina sierica umana (HSA), l'albumina sierica bovina (BSA), la piperazina-N,N'-bis-2-acido etansulfonico (PIPES), il Percoll[®](densità: 1,077), la L-glutamina, la soluzione antibiotico-antimicotica (10.000 UI/ml penicillina, 10 mg/ml streptomicina e 25 µg/ml amfotericina B) ed il Triton X-100 da Sigma (St. Louis, MO). L'RPMI-1640, il bromofenacilbromide (BPB), il ditiotreitolo (DTT) ed il siero bovino fetale (FCS) da ICN (Costa Mesa, CA). Gli anticorpi di coniglio anti-fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), anti-fosfo-p38 (Thr180/Tyr182), anti-fosfo-IκBα (Ser32), anti-IκB ed il composto PD98059 da Cell Signaling, New England Biolabs (Beverly, MA). L'anticorpo di coniglio anti-ERK2 (C-14), anti-p38 (C-20), l'anticorpo di capra anti-GAPDH (V-18), gli anticorpi secondari coniugati a perossidasi da Santa Cruz (Santa Cruz, CA). Il composto SB203580 da Calbiochem (La Jolla, CA). L' IFN-γ e l'IL-4 da PeproTech (London, UK). Tutti gli altri prodotti sono stati acquistati da Carlo Erba (Milano, Italia).

Le sPLA₂ umane ricombinanti di gruppo IB (hGIB), III (hGIII), V (hGV) e X (hGX), il mutante H48Q della hGIB (hGIB-H48Q) e l'anticorpo anti-recettore di tipo M di coniglio sono stati donati dal Prof. Gerard Lambeau (Istituto di Farmacologia Molecolare e Cellulare, Centro Nazionale di Ricerca Scientifica, Francia). Le sPLA₂ umane di gruppo IIA (hGIIA), XIIA (hGXIIA), l'anticorpo anti-recettore di tipo M di topo e il composto Me-Indoxam, sono stati donati dal Prof. Michael H. Gelb (Dipartimento di Chimica e Biochimica, Università di Washington, Seattle USA). Le sPLA₂ hGIB inattivate con bromofenacilbromide (BPB) o con diitiotreitolo (DTT) sono state preparate come descritto precedentemente [51, 52]. In breve, la sPLA₂ hGIB è stata incubata per 4 ore a 37°C con 1 mM di BPB oppure per 2 ore a 50°C con DTT 10 mM prima dell'aggiunta alle colture di macrofagi.

Il tampone PIPES è composto di 25 mM piperazina-N,N'-bis-2-acido etansulfonico (PIPES), 110 mM NaCl e 5 mM KCl, pH 7,4 [53]. Il tampone PCG è composto da PIPES contenente 1 mM CaCl₂ ed 1 g/l D-glucosio, pH 7,4. Il *buffer* di lisi (LB) per il Western Blot è composto di 20 mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA, 1mM PMSF, 2 mM benzamidina, 10 µg/ml leupeptina, 10 mM NaF, 150 mM NaCl, 1 mM Na₃VO₄, 1% Nonidet P-40 e 5% glicerolo. Il tampone TBST è

composto 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, e 0.1% Tween 20, pH 7.6.

Il tampone PBS è composto da 136 mM NaCl, 373 mM KCl, 681 mM di KH_2PO_4 , 123 mM Na_2HPO_4 , pH 7,3.

Lavaggio Bronchiale

Appena reclutato il paziente, e quando possibile con la sua collaborazione, viene compilata una scheda anamnestica (**Tabella III**). Nel caso in cui il paziente fosse già intubato la scheda viene compilata sulla base della documentazione clinica disponibile. In particolare vengono riportati eventuali segni clinici o reperti di BPCO supportati da Rx, infezioni delle alte o basse vie respiratorie, ARDS, asma ed enfisema polmonare. Una volta terminata la compilazione della scheda si procede al lavaggio bronchiale secondo il protocollo standard. Il lavaggio bronchiale viene eseguito sempre in terapia intensiva (UTI) cardiocirurgica, in pazienti intubati, collegati al respiratore automatico volumetrico in modalità controllata (CMV). La procedura viene effettuata secondo una stessa metodologia valida per tutti i pazienti e consiste nell'utilizzazione di soluzione fisiologica (NaCl 0,5 %) aspirata in una siringa da 20 ml. Contemporaneamente si prepara un sondino di aspirazione sterile, siliconato e quindi molto malleabile, lungo 60 cm con diametro 16 mm \varnothing alla cui estremità

prossimale si trova un contenitore sterile. Il paziente viene temporaneamente scollegato dal respiratore nel punto in cui il tubo oro-tracheale (o naso-tracheale) è connesso al filtro del tubo corrugato e si procede al lavaggio immettendo nel il tubo che va in trachea la soluzione fisiologica contenuta nella siringa; in questo modo il lavaggio raggiunge facilmente bronchi principali e bronchioli. Successivamente si ricollega il paziente al respiratore per 90'', un tempo utile per far si che i muchi più distali si distacchino, ed allo scadere del tempo si disconnette di nuovo il paziente per permettere l'introduzione del sondino sterile, a sua volta connesso al bocchettone del vuoto, per tutta la sua lunghezza (~ 10 cm sono persi nel tubo) e l'aspirazione della fisiologica mista a muchi che procedono direttamente all'interno del contenitore sterile. Al termine si fa riprendere al paziente la respirazione assistita ed il contenitore col lavaggio chiuso e catalogato si trasferisce nei laboratori dell'Allergologia ed Immunologia Clinica.

In laboratorio il lavaggio bronchiale viene centrifugato (8 min., 4°C, 1500 rpm), per permettere la separazione del fluido dal contenuto cellulare. Al termine della centrifugazione il surnatante (fluido bronchiale) viene prelevato e sottoposto a 2 centrifugazioni. Il pellet cellulare viene risospeso in PIPES e sottoposto a ripetuti lavaggi

mediante centrifugazione. Al termine dei lavaggi le cellule vengono contate in camera di Burker e per valutare la percentuale dei diversi tipi cellulari. Le cellule vengono fissate con tecnica di Cytospin, colorate e visualizzate al microscopio. Successivamente nel fluido del lavaggio bronchiale viene valutata la concentrazione di proteine, i livelli di diverse citochine proinfiammatorie e l'attività della fosfolipasi A₂ secretoria (sPLA₂).

Isolamento e purificazione dei Macrofagi Polmonari Umani (HLM)

I macrofagi sono stati isolati dal parenchima polmonare di pazienti sottoposti ad interventi di chirurgia toracica, con una tecnica utilizzata nel nostro laboratorio da molti anni [50]. Il tessuto, macroscopicamente sano è stato tagliato in piccoli frammenti e sottoposto a filtrazione su strato di Nytex (con pori di 120 µm di diametro) mediante ripetuti lavaggi con PIPES. La sospensione cellulare ottenuta è stata centrifugata in gradienti discontinui di Percoll. Le cellule sono state quindi risospese (10⁶/ml) in RPMI contenente 5% di FCS, 2 mM di L-glutamina, e 1% di soluzione antibiotica-antimicotica ed infine incubate in piastre di polietilene a 37°C in un'atmosfera contenente il 5% di CO₂. Dopo 12 ore il mezzo

di coltura è stato rimosso ed i macrofagi aderenti sono stati lavati con RPMI ed utilizzati per gli esperimenti. Con questa procedura più del 98% delle cellule aderenti erano macrofagi come dimostrato dalla positività al test dell' α naftil-acetato esterasi 26 [50].

In esperimenti che utilizzano i macrofagi non aderenti, le cellule sono state centrifugate ripetutamente su gradienti di Percoll fino ad ottenere una purezza >95% come dimostrato dalla doppia positività per CD71/HLA DR valutata mediante citometria a flusso [38].

Incubazioni cellulari

I macrofagi aderenti sono stati incubati (37°C, 2 - 24 ore) in RPMI-1640 contenenti concentrazioni crescenti (0,1 - 10 μ g/ml) di diverse sPLA₂. Tutte le preparazioni di sPLA₂ sono state routinariamente testate per una possibile contaminazione da LPS mediante un test specifico (*Limulus Amebocyte Test*, INC) e scartate se la concentrazione di LPS risultava superiore al limite di rilevazione del saggio (0,125 EU/ml). In esperimenti selezionati, le cellule sono state preincubate (37°C, 1 ora) con o senza IFN- γ (1000 U/ml) e poi incubate (37°C, 24 ore) con concentrazioni ottimali di sPLA₂ (10 μ g/ml), LPS (10 μ g/ml) o IL-4 (50 ng/ml). In altri esperimenti, i macrofagi sono stati incubati con hGIB inattivata con BPB o DTT e

con il mutante H48Q (hGIB-H48Q). In ulteriori esperimenti le sPLA₂ sono state incubate (15 min, 37°C) con varie concentrazioni di Me-indoxam (0,01 - 10 µM), prima della stimolazione delle cellule.

Infine, negli esperimenti con gli inibitori delle chinasi intracellulari i HLM sono stati preincubati (37°C, 1 ora) con diverse concentrazioni di PD98059, SB203580, e poi stimolate (37°C, 6 ore) con la sPLA₂. Al termine delle incubazioni, i sopranatanti sono stati recuperati, centrifugati due volte (1.000 x g, 4°C, 5 min.) e conservati a -80°C per la successiva determinazione di citochine (TNF-α, IL-6, IL-10, IL-12) e chemochine (CCL2, CCL4, CCL22, CXCL8). Le cellule sono state, quindi, lisate con Tryton X-100 0,1% per la successiva determinazione del contenuto totale di proteine [54]. La percentuale di cellule vitali è stata valutata al termine di ogni esperimento mediante la tecnica di esclusione del *trypan blue* [50]. In tutti gli esperimenti la vitalità cellulare è rimasta superiore al 95%.

Dosaggi ELISA di citochine e chemochine

La secrezione di citochine e chemochine nei sopranatanti delle colture di macrofagi è stata misurata usando kit ELISA per TNF-α, IL-6, IL-10, IL-12 e CXCL8 da Euro Clone (Devon, UK) e per CCL2,

CCL4, CCL22 da R&D System (Minneapolis, MN). Il *range* di linearità dei dosaggi era tra 20 e 800 pg/ml per il TNF- α , tra 6 e 200 pg/ml per l'IL-6 e l'IL-12, tra 12 e 400 pg/ml per l'IL-10, tra 15,6 e 1000 pg/ml per la CCL2 e la CCL4, tra 7,8 e 500 pg/ml per la CCL22 e tra 30 e 2000 pg/ml per la CXCL8. I risultati sono stati normalizzati per il contenuto totale di proteine in ciascun campione. La concentrazione di proteine viene valutata utilizzando il metodo di Lowry.

Determinazione attività enzimatica delle sPLA₂

L'attività delle sPLA₂ è stata misurata utilizzando membrane di *Escherichia Coli* marcate con [³H]AA (New England Nuclear, Boston, MA). L'attività delle sPLA₂ è stata determinata in Tris HCl 50 mM (pH 7.4) e CaCl₂ 10 mM in un volume totale di 1,0 ml. La reazione è stata innescata dall'aggiunta di 0,1 μ Ci (97nmol) di membrane di *E.Coli* marcate con [³H]AA. Alla fine dell'incubazione (90 min, 37°C), la reazione è stata fermata mediante estrazione dei lipidi con il metodo di Bligh and Dyer [55]. Gli acidi grassi liberi sono stati isolati dai fosfolipidi mediante cromatografia su strato sottile (Thin Layer Chromatography, TLC) su gel di silice G sviluppato in miscela di esano/etiletere/acido formico (90/60/6, v/v). L' [³H]AA è stato

determinato attraverso l'analisi delle lastre TLC plate con il sistema Bioscan 200 (Canberra Packard, Milan, Italy) e l'area corrispondente è stata isolata e grattata direttamente nelle vials per determinare la radioattività attraverso liquido scintillante. L'attività delle PLA₂ è stata calcolata ed espressa come nmoli di [³H]AA rilasciato/min.

Analisi Statistica

I risultati sono espressi come media \pm ES di un numero variabile da 5 a 8 esperimenti. Il valore di p è stato determinato con il test t di Student per campioni accoppiati [56].

RISULTATI

Standardizzazione delle procedura del lavaggio bronchiale

La prima fase di questo studio ha consentito di standardizzare la procedura e di mettere a punto il protocollo per il lavaggio bronchiale vero e proprio. In questo studio sono stati selezionati tutti i pazienti afferenti al reparto di cardiocirurgia ed incubati per diversi motivi: intubazione pre-operatoria, pazienti cronici già operati o in fase scempenso da operare. I pazienti esaminati sono stati raggruppati in 3 gruppi: pazienti con asma bronchiale (n=14) e pazienti con fibrosi polmonare (n=14). Come gruppo di controllo e' stato utilizzato un gruppo di pazienti con patologie valvolari cardiache sottoposti ad intubazione pre-operatoria (n=19). In tutti i pazienti, al momento del lavaggio bronchiale, non erano evidenti segni clinici, radiografici o di laboratorio indicativi di infezione polmonare. Nei pazienti del gruppo di controllo era presente una ipertensione polmonare secondaria di grado lieve-medio (PAP stimata con metodica ecografica o mediante cateterismo destro compresa tra 40 e 55 mmHg). In ogni caso , in questi pazienti di controllo erano assenti segni d'inflammazione delle vie aeree rilevabili alla citologia del lavaggio. In particolare, non risultavano aumentate le cellule totali del lavaggio e la percentuale di neutrofili, eosinofili e linfociti.

Livelli di proteine e citochine nel lavaggio broncoalveolare

In un primo gruppo di esperimenti è stata valutata la presenza di citochine proinfiammatorie nel fluido del lavaggio broncoalveolare. In una prima fase, mediante il metodo di Lowry, sono stati misurati i valori medi di proteine nei lavaggi (n=10) che sono risultati pari a 125 ± 25 $\mu\text{g/ml}$ (controllo); 138 ± 45 $\mu\text{g/ml}$ (asmatici); 175 ± 45 $\mu\text{g/ml}$ (pazienti con fibrosi). La differenza tra i pazienti non è risultata significativa. Successivamente, con una tecnica ELISA sono stati determinati i livelli di citochine proinfiammatorie (IL-6, TNF α ed IL-8) nel lavaggio bronchiale. Il range di linearità di questi dosaggi era : 12,5-200 pg/ml (IL-6), 25-800 pg/ml (TNF- α) e 125-2000 pg/ml (IL-8). I livelli medi (\pm ESM) riscontrati nei lavaggi bronchiali dei pazienti di controllo sono stati $15,5 \pm 7,3$ pg/ml (IL-6), $32,1 \pm 6,8$ pg/ml (TNF α), 175 ± 22 pg/ml (IL-8). Non sono state rilevate differenze significative nei livelli di IL-6, TNF- α , IL-8 tra pazienti con asma o fibrosi polmonare ed individui di controllo.

Livelli di sPLA₂ nel lavaggio broncoalveolare

In un secondo gruppo di esperimenti è stata valutata l'attività totale della PLA₂ secretoria nei liquidi di lavaggio bronchiale

mediante il dosaggio funzionale su membrane di *E.coli* radiomarcate con acido arachidonico triziato. In particolare, sono stati esaminati 28 campioni di BAL prelevato da pazienti con asma bronchiale (n = 14) o fibrosi polmonare (n = 14). Questi risultati hanno evidenziato che l'attività di sPLA₂ è significativamente aumentata nei pazienti con asma bronchiale (41.5 ± 12.6) e con fibrosi polmonare (44.7 ± 8.0) rispetto al gruppo di controllo (10.8 ± 3.6) (**Figura 1**). I livelli di sPLA₂ sono stati quindi messi in relazione al contenuto totale di proteine nel lavaggio. Questi dati indicano che esiste una correlazione significativa (p<0.01) tra i livelli di sPLA₂ ed il contenuto di proteine nei lavaggi del gruppo di controllo e dei pazienti con fibrosi polmonare (p<0.05). Non esiste invece alcuna correlazione tra i livelli di sPLA₂ e di proteine nei lavaggi di pazienti con asma bronchiale.

Nel loro insieme questi dati indicano che i livelli di sPLA₂ sono significativamente aumentati nelle vie aeree dei pazienti con malattie infiammatorie croniche del polmone quali l'asma e la fibrosi polmonare ma non nei pazienti con ipertensione polmonare secondaria. L'osservazione che i livelli di sPLA₂ non sono correlati ai livelli di proteine nei lavaggi di pazienti con asma suggerisce che in questa patologia vi sia una secrezione attiva di questo enzima nelle vie

aeree, presumibilmente da parte delle cellule infiammatorie reclutate a livello bronchiale.

Isoforme di sPLA₂ nel lavaggio broncoalveolare

Successivamente abbiamo esteso queste osservazioni esaminando le specifiche isoforme di sPLA₂ presenti nei BAL di pazienti con diverse pneumopatie infiammatorie. In questo gruppo di esperimenti sono stati esaminati pazienti con broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), polmonite da ipersensibilità, fibrosi o sarcoidosi. Gli stessi campioni sono stati analizzati mediante western blot con anticorpi specifici diretti contro le varie isoforme umane di sPLA₂. I risultati indicano che le isoforme di sPLA₂ presenti nel BAL sono quelle di gruppo IB, III, V e X (**Figura 2**). Viceversa, non sono state rilevate le isoforme IIA, IID, IIE, IIF, XIIA e XIIB. Questi dati ancora preliminari indicano che le isoforme di sPLA₂ rilevabili nel BAL non sono in relazione al tipo di malattia. Sebbene il numero di campioni limitato non consente ancora una analisi statistica completa, questi dati costituiscono la prima caratterizzazione delle isoforme di sPLA₂ presenti nelle vie aeree dei pazienti con malattie infiammatorie croniche del polmone.

Effetto della sPLA₂ sulla produzione di citochine e chemochine nei macrofagi polmonari

Sulla base dei risultati ottenuti che dimostrano la presenza di livelli elevati di sPLA₂ nel BAL di pazienti affetti da asma bronchiale e fibrosi, abbiamo voluto analizzare gli effetti di queste molecole proinfiammatorie sui macrofagi polmonari che, nelle vie respiratorie, rappresentano le cellule immunocompetenti più numerose. In un primo gruppo di esperimenti abbiamo valutato l'effetto di diverse sPLA₂ ricombinanti umane sulla produzione del TNF- α e della CXCL8/IL-8 dai macrofagi polmonari umani (HLM). Queste molecole rappresentano la principale citochina e chemochina prodotte dai HLM. Le cellule sono state incubate (6 ore, 37°C) con concentrazioni crescenti (0,1 – 10 μ g/ml) di hGIB, hGIIA, hGIII, hGV, hGX e hGXIIA. Le sPLA₂ hGIB, hGIIA, hGV e hGX inducevano la secrezione di TNF- α (**Figura 3**) e CXCL8 (**Figura 4**) in maniera concentrazione dipendente. L'effetto di queste sPLA₂ risulta significativo alla concentrazione di 1 μ g/ml e raggiunge il massimo effetto a 10 μ g/ml. Viceversa, le sPLA₂ hGIII e hGXIIA non inducono la secrezione di TNF- α e CXCL8 anche se la

concentrazione viene aumentata fino a 20 $\mu\text{g/ml}$ o se l'incubazione viene prolungata per 24 ore (dati non mostrati).

In una serie successiva di esperimenti abbiamo esaminato il profilo di citochine e chemochine prodotte dai macrofagi polmonari umani stimolati con la hGX. Questa sPLA₂ è l'isoforma umana più efficace nell'indurre l'attivazione delle cellule infiammatorie. La **Figura 5** mostra l'effetto della hGX sulla secrezione delle più importanti citochine e chemochine prodotte dai macrofagi polmonari umani. La hGX induce la secrezione concentrazione-dipendente di IL-6 e IL-10 dai HLM. In questi esperimenti, la sPLA₂ non induceva la produzione di IL-12 anche quando le cellule venivano preincubate (37°C, 1 ora) con IFN- γ (1000 U/ml). L'IL-12 è efficacemente prodotta dai HLM quando le cellule sono stimolate con LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) dopo preincubazione con IFN- γ (LPS: 122 ± 16 pg/mg di proteine; cellule non stimolate: 22 ± 3 pg/mg di proteine; $p < 0,01$). L'incubazione dei HLM con la hGX determinava anche la produzione di diverse chemochine come MCP-1/CCL2 e MIP-1 β /CCL4 (**Figura 6**). Al contrario, nessun effetto era rilevabile sulla secrezione di MDC/CCL22, sebbene i HLM siano in grado di produrre tale chemochina quando vengono stimolati con 50 ng/ml di IL-4 (IL-4: $7,73 \pm 1,79$ ng/mg di proteine; cellule non stimolate $2,22 \pm 0,54$

ng/mg di proteine; $p < 0,01$). I risultati di questi esperimenti indicano che alcune sPLA₂, ma non tutte, sono in grado di attivare la produzione di diverse citochine (TNF- α > IL-6 > IL-10) e chemochine (CXCL8 >> CCL4 > CCL2) nei HLM.

Attività enzimatica delle sPLA₂ presenti nel lavaggio broncoalveolare

In un altro gruppo di esperimenti abbiamo iniziato a valutare la capacità delle sPLA₂ di mobilizzare l'AA determinando la capacità di quattro sPLA₂ di idrolizzare l'AA da macrofagi polmonari radiomarcati con ³H-AA. Le sPLA₂ di gruppo IA e III, ma non quelle di gruppo IB e IIA, mobilizzano efficacemente l'AA dai macrofagi, nonostante tutte le sPLA₂ utilizzate dimostrino attività enzimatica sovrapponibile nel il test standard che utilizza le membrane di E. Coli radiomarcate come substrato. Questi risultati indicano che alcune ma non tutte le sPLA₂ sono in grado di mobilizzare AA dalle cellule infiammatorie umane.

Ruolo dell'attività enzimatica delle sPLA₂ nella produzione di citochine e chemochine dai macrofagi polmonari

È noto che le sPLA₂ possono indurre effetti biologici sia con meccanismi dipendenti dall'attività enzimatica sia in maniera indipendente da quest'ultima [32, 33]. Per comprendere se la diversa capacità delle sPLA₂ di indurre la produzione delle citochine e chemochine dai macrofagi polmonari fosse correlata all'attività enzimatica della molecola, i macrofagi venivano incubati (6 ore, 37°C) con concentrazioni crescenti di hGIB la cui attività enzimatica era stata inattivata in maniera irreversibile con tre diverse metodiche. In particolare, abbiamo utilizzato: 1) una hGIB inattivata dal trattamento farmacologico con bromofenacilbromide (BPB), un inibitore selettivo del sito catalitico [57]; 2) una hGIB inattivata dal trattamento con ditioneitrato (DTT), che altera la struttura secondaria della sPLA₂ riducendo i ponti disolfuro [58]; 3) una variante della hGIB in cui il residuo di istidina in posizione 48 nel sito catalitico era stato sostituito da un residuo di glutammina (hGIB-H48Q) mediante mutagenesi sito-diretta [59]. A questo proposito, è importante sottolineare che la mutazione H48Q delle sPLA₂ provoca la perdita quasi totale dell'attività enzimatica (~ 0,01% dell'attività enzimatica residua), ma determina solo minime variazioni nella struttura

tridimensionale e nella stabilità e non modifica la capacità di legarsi al recettore di tipo M [37, 59]. Esperimenti di controllo indicavano che le sPLA₂ inattivate con BPB e DTT possedevano rispettivamente soltanto 1,9 e 1,6% dell'attività enzimatica mentre il mutante hGIB-H48Q possedeva meno dell'1% dell'attività enzimatica residua. I HLM stimolati con la sPLA₂ inattivata con BPB o con hGIB-H48Q rilasciavano quantità di TNF- α (**Figura 7**) comparabili a quelle indotte dalle sPLA₂ attive. Viceversa, il trattamento con DTT aboliva completamente la capacità della sPLA₂ di indurre la secrezione di TNF- α . Analoghi risultati sono stati ottenuti quando è stata valutata la capacità delle sPLA₂ enzimaticamente inattive di indurre la secrezione di CXCL8 (dati non mostrati). In queste condizioni sperimentali il DTT non alterava la secrezione di TNF- α e CXCL8 indotta dall'LPS (dati non mostrati), il che dimostra che il DTT non influenza aspecificamente la capacità dei HLM di produrre citochine e chemochine.

Questi risultati indicano che l'inibizione selettiva dell'attività enzimatica (BPB e hGIB-H48Q) non altera gli effetti indotti dalla sPLA₂; viceversa l'alterazione della struttura secondaria (DTT) abolisce la capacità della sPLA₂ di attivare i macrofagi.

Effetto di Me-indoxam sulla produzione di citochine e chemochine indotta dalla sPLA₂ nei macrofagi polmonari

Studi recenti hanno dimostrato che Indoxam ed il composto ad esso correlato Me-indoxam sono le uniche molecole in grado di bloccare simultaneamente l'attività enzimatica delle sPLA₂ [36, 60] e il legame al recettore di tipo M [61, 62]. Infatti, queste molecole sono state inizialmente sintetizzate come inibitori dell'attività enzimatica diretti contro il sito catalitico delle sPLA₂ [60]. Tuttavia, studi di mutagenesi sito-diretta hanno dimostrato che alcuni residui sulla superficie della sPLA₂ situati nelle vicinanze del sito catalitico sono coinvolti nell'interazione con il recettore di tipo M [63]. Poiché la struttura a raggi X del complesso hGX-Me-indoxam mostra che una porzione dell'inibitore legato nel sito attivo della sPLA₂ è esposto sulla superficie dell'enzima [39], è verosimile che il legame di questi inibitori al sito catalitico delle sPLA₂ possa interferire anche con il legame della sPLA₂ al recettore di tipo M.

In un gruppo successivo di esperimenti abbiamo valutato l'effetto di Me-indoxam sulla secrezione di TNF- α e CXCL8 dai HLM. Me-indoxam (0,01 – 10 μ M) non alterava la secrezione basale di TNF- α e di CXCL8 dai HLM (dati non mostrati). La preincubazione (15 min,

37°C) della hGX (1 µg/ml) con concentrazioni crescenti di Me-indoxam, prima dell'aggiunta ai macrofagi, inibiva in maniera dose dipendente la secrezione di CXCL8 (**Figura 8**) e di TNF-α (dati non mostrati). Il valore di IC₅₀ del Me-indoxam era di 320 ± 87 nM. Per esaminare se Me-indoxam bloccasse la produzione di citochine attraverso un meccanismo non correlato al legame con la hGX, abbiamo valutato l'effetto di questo composto sulla secrezione di TNF-α e CXCL8 indotta dall'LPS. Nelle stesse condizioni sperimentali in cui la secrezione di citochine indotta dalla hGX è completamente soppressa, Me-indoxam non modificava la secrezione di TNF-α e CXCL8 indotta dall'LPS (TNF-α: 1 µg/ml LPS, 14,58 ± 3,25 ng/mg di proteine; 10 µM Me-indoxam più 1 µg/ml LPS, 15,13 ± 4,06; CXCL8: 1 µg/ml LPS, 8,54 ± 1,62 ng/mg di proteine; 10 µM Me-indoxam più 1 µg/ml LPS, 7,93 ± 1,86). Pertanto, Me-indoxam blocca la produzione di citochine indotta dalla sPLA₂, ma non quella attivata dall'LPS. Questi risultati suggeriscono, inoltre, che la produzione di citochine indotta dalla hGX non sia dovuta a contaminazione con endotossina eventualmente presente nella proteina ricombinante prodotta in un sistema di espressione batterica.

Come accennato in precedenza, Me-indoxam blocca non solo il legame delle sPLA₂ al recettore tipo M, ma anche l'attività catalitica di tutte le sPLA₂ [36]. Per verificare che l'effetto inibente del Me-indoxam fosse realmente dovuto alla inibizione del legame sPLA₂/recettore di tipo M abbiamo valutato se questo composto fosse in grado di bloccare la produzione di citochine indotta dal mutante hGIB-H48Q che è completamente privo di attività enzimatica [59]. In questi esperimenti la hGIB *wild type* (WT) e la hGIB-H48Q (1 µg/ml) erano preincubate (15 min, 37°C) con una concentrazione ottimale (10 µM) di Me-indoxam e poi utilizzate per la stimolazione dei macrofagi. Me-indoxam bloccava completamente la secrezione di TNF-α indotta dalle due sPLA₂ (**Figura 9**). Risultati analoghi sono stati ottenuti sulla produzione di CXCL8 (dati non mostrati). Pertanto Me-indoxam blocca la produzione di citochine indotta dal mutante hGIB-H48Q cataliticamente inattivo. Queste osservazioni sono compatibili con l'ipotesi che Me-indoxam inibisca la produzione di citochine e di chemochine indotta dalle sPLA₂ bloccando il legame della sPLA₂ al recettore di tipo M.

DISCUSSIONE

L'obiettivo primario di questo studio è stato la messa a punto di una metodica per la determinazione di mediatori proinfiammatori nel BAL di pazienti sottoposto ad intubazione endotracheale. L'intubazione è comunemente utilizzata a scopo terapeutico in pazienti sottoposti ad interventi di chirurgia cardiaca. I nostri risultati dimostrano che con questa metodica è possibile ottenere una quantità di fluido proveniente dalle vie aeree adeguata per studi cellulari e molecolari. Un'osservazione originale scaturita da questo studio è stata l'identificazione di enzimi appartenenti alla classe delle PLA₂ nei BAL di pazienti con diverse patologie croniche dell'apparato respiratorio.

Le PLA₂ sono enzimi chiave per la formazione di mediatori lipidici dell'infiammazione derivati dall'acido arachidonico [1]. La presenza di questi enzimi nel fluido broncoalveolare riveste quindi una notevole importanza per la produzione locale di molecole coinvolte nello sviluppo dell'infiammazione. I nostri risultati indicano che livelli misurabili di PLA₂ sono presenti nel BAL di individui di controllo. Questi livelli sono significativamente aumentati in BAL di pazienti con asma bronchiale o fibrosi polmonare. Nel caso dell'asma,

i livelli di PLA₂ non correlano con i livelli di proteine nel BAL il che suggerisce che vi sia una secrezione *in situ* di questi enzimi verosimilmente da parte di cellule infiammatorie residenti (mastociti, macrofagi, cellule epiteliali, etc.). Esperimenti di western blot dimostrano che l'attività PLA₂ rilevabile nel BAL di pazienti con malattie infiammatorie polmonari è pressoché totalmente dovuta alla presenza di PLA₂ secretorie. Il nostro studio identifica per la prima volta le isoforme di sPLA₂ secrete nelle vie aeree in pazienti con infiammazione polmonare.

I risultati della seconda parte dello studio dimostrano che diverse sPLA₂ umane (GIB, GIIA, GV e GX) determinano la secrezione di TNF- α e CXCL8 dai macrofagi polmonari umani (hGX > hGV > hGIB \geq hGIIA). In particolare, la hGX, l'isoforma umana più attiva sui HLM, induce la produzione di numerose citochine (TNF- α , IL-6 e IL-10) e chemochine (CCL2, CCL4 e CXCL8). L'attivazione dei macrofagi polmonari da parte delle sPLA₂ non è correlata alla loro attività enzimatica ed è verosimilmente mediata dalla interazione con un recettore specifico (recettore M).

Lo spettro di molecole indotte dalle sPLA₂ nei HLM comprende citochine proinfiammatorie (TNF- α e IL-6), immunoregolatorie (IL-10) e chemochine sia di tipo CC (CCL2, CCL4) che di tipo CXC

(CXCL8). Il profilo di citochine e chemochine indotto nei macrofagi polmonari umani indica che le sPLA₂ possono avere un ruolo importante nell'induzione e nella modulazione dell'infiammazione polmonare e sulle risposte immunitarie locali. In particolare, le elevate quantità di TNF- α e CXCL8 secrete dai macrofagi stimolati con le sPLA₂ suggeriscono che questi mediatori possano potenziare le risposte infiammatorie a livello polmonare. L'induzione di CXCL8, CCL2 e CCL4 suggerisce che le sPLA₂ contribuiscano al reclutamento preferenziale di neutrofilo e monociti nei siti dell'infiammazione.

Queste osservazioni ottenute *in vitro* consentono di comprendere i risultati di precedenti esperimenti ottenuti *in vivo* che dimostrano che la somministrazione di sPLA₂ per via intradermica [35], inalatoria [64] od intraarticolare [34] induce un'intensa reazione infiammatoria caratterizzata da una marcata infiltrazione di neutrofilo e di monociti.

È interessante sottolineare che l'effetto della hGX sulla sintesi di citochine e chemochine appare relativamente selettivo. Non tutte le citochine e chemochine prodotte dai macrofagi sono indotte da questa sPLA₂. Ad esempio, la hGX non influenza la produzione di IL-12 e di MDC che sono, invece, indotte rispettivamente dall'LPS e dall'IL-4. Un ulteriore livello di selettività è dimostrato dall'osservazione che non tutte le sPLA₂ sono efficaci nell'indurre la produzione di

citochine. I risultati di esperienze condotte dal nostro gruppo con i macrofagi dimostrano infatti che questa risposta è indotta dalla sPLA₂ hGIB, hGIIA, hGV e hGX, ma non da hGIII e hGXIIA (dati non mostrati). Dal momento che queste sPLA₂ possiedono una attività enzimatica comparabile [36], questo risultato suggerisce che l'attivazione della secrezione di citochine e chemochine non sia una caratteristica comune delle sPLA₂ ma sia limitata solo ad alcune isoforme. Questo risultato suggerisce che l'idrolisi dei fosfolipidi di membrana e la liberazione di AA non sia il meccanismo principale responsabile dell'induzione delle citochine. Altri risultati del nostro studio confermano questa ipotesi. Infatti, due differenti isoforme di GIB (hGIB inattivata da BPB e il mutante H48Q della hGIB), prive dell'attività catalitica, inducono la produzione di citochine e chemochine dai HLM con efficacia sovrapponibile a quella della forma enzimaticamente attiva. D'altro canto se l'attività enzimatica non è coinvolta, i nostri dati dimostrano, tuttavia, che la struttura secondaria e terziaria della sPLA₂ è essenziale per l'attivazione dei macrofagi dal momento che la preincubazione della sPLA₂ con il DTT, un composto che riduce i ponti disolfuro, abolisce completamente la capacità delle sPLA₂ di indurre la secrezione di citochine/chemochine.

Nel loro insieme questi risultati escludono l'ipotesi che l'attività idrolitica sia il meccanismo principale con cui le sPLA₂ inducono la produzione di citochine e chemochine nei macrofagi polmonari umani e costituiscono un'ulteriore prova che le sPLA₂ regolano alcune funzioni cellulari mediante l'interazione con molecole di membrana quali, ad esempio, i recettori di tipo M o di tipo N. L'ipotesi che le sPLA₂ determinino la secrezione di citochine e chemochine nei HLM attraverso l'interazione con il recettore di tipo M, è sostenuta dai risultati ottenuti negli esperimenti con Me-indoxam, l'unico agente farmacologico finora disponibile in grado di bloccare il legame tra le sPLA₂ ed il recettore tipo M [61, 62]. In questo studio abbiamo dimostrato che Me-indoxam blocca la produzione di citochine indotta sia dall'isoforma attiva che dal mutante cataliticamente inattivo della hGIB (hGIB-H48Q). Poiché queste due isoforme di sPLA₂ hanno la stessa capacità di interagire con il recettore di tipo M l'effetto inibente del Me-indoxam è verosimilmente dovuto al blocco del legame della sPLA₂ al recettore di tipo M. Infine, il Me-indoxam non interferisce con la secrezione basale di TNF- α e di CXCL8 dai macrofagi e non funge da inibitore aspecifico della produzione di citochine e chemochine in queste cellule, dal momento che non blocca l'effetto dell'LPS.

In conclusione, i nostri dati dimostrano che le sPLA₂ sono potenti stimoli in grado di indurre la produzione di citochine e chemochine nei macrofagi polmonari attraverso un meccanismo indipendente dall'attività enzimatica.

Implicazioni fisiopatologiche

L'attivazione recettoriale dei macrofagi indotta dalle sPLA₂ potrebbe avere importanti ripercussioni fisiopatologiche in diverse malattie infiammatorie dell'apparato respiratorio sia acute (polmoniti, ARDS) che croniche (ad es. asma, BPCO, fibrosi). In queste patologie la produzione di citochine e chemochine attivate dalle sPLA₂ potrebbe contribuire all'induzione ed al mantenimento della flogosi, a promuovere il reclutamento di cellule infiammatorie e a determinare il rimodellamento tessutale. Le sPLA₂ possono svolgere un ruolo nell'infiammazione attraverso meccanismi multipli che comprendono gli effetti legati alla attività enzimatica (sintesi di mediatori lipidici) e gli effetti mediati dalla interazione con i recettori di membrana (produzione di citochine e chemochine). Questi due meccanismi delle sPLA₂ sono strettamente integrati e contribuiscono in eguale misura al

ruolo proinfiammatorio delle sPLA₂. Per tale motivo è ipotizzabile che farmaci in grado di bloccare gli effetti *in vivo* delle sPLA₂ debbano interferire con entrambe le attività di queste molecole (enzimatica e recettoriale). Questo scenario è confermato dai dati ottenuti *in vivo* sugli inibitori delle sPLA₂ che bloccano esclusivamente l'attività enzimatica della sPLA₂. Pur avendo questi inibitori prodotto dei risultati incoraggianti in diversi modelli sperimentali [65-68], essi si sono rivelati assolutamente inefficaci nei *trials* clinici in pazienti con diverse malattie infiammatorie croniche (artrite reumatoide, asma) [69-71]. Pertanto, appare lecito prospettare che nuove molecole in grado di interferire contemporaneamente con l'attività enzimatica e con quella recettore-mediata delle sPLA₂, potrebbero, in futuro, rappresentare efficaci strumenti terapeutici per il trattamento delle malattie infiammatorie.

BIBLIOGRAFIA

- 1 **Mayer, R. J. and Marshall, L. A.**, New insights on mammalian phospholipase A₂s; comparison of arachidonoyl-selective and -nonselective enzymes. *FASEB J* 1993. **7**: 339-348.
- 2 **Waite, M.**, Biochemistry, molecular biology, and physiology of phospholipase A₂ and its regulatory factors. *Adv Exp Med Biol* 1990. **279**: 1-251.
- 3 **Waku, K.**, Origins and fates of fatty acyl-CoA esters. *Biochim Biophys Acta* 1992. **1124**: 101-111.
- 4 **Marone, G.**, *Human eosinophils*. Karger, Basel: 2000.
- 5 **Marone, G., Lichtenstein, L. M. and Galli, S. J.**, *Mast Cells and Basophils*. Academic Press, San Diego: 2000.
- 6 **Leslie, C. C.**, Properties and regulation of cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1997. **272**: 16709-16712.
- 7 **Murakami, M. and Kudo, I.**, Secretory phospholipase A₂. *Biol Pharm Bull* 2004. **27**: 1158-1164.
- 8 **Kudo, I. and Murakami, M.**, Phospholipase A₂ enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002. **68-69**: 3-58.

- 9 **Uhl, W., Nevalainen, T. J. and Buchler, M. W.,** *Phospholipase A₂. Basic and clinical aspects in inflammatory diseases.* Karger, Basel: 1997.
- 10 **Hamaguchi, K., Kuwata, H., Yoshihara, K., Masuda, S., Shimbara, S., Oh-ishi, S., Murakami, M. and Kudo, I.,** Induction of distinct sets of secretory phospholipase A₂ in rodents during inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2003. **1635:** 37-47.
- 11 **Kudo, I. and Murakami, M.,** Diverse functional coupling of prostanoid biosynthetic enzymes in various cell types. *Adv Exp Med Biol* 1999. **469:** 29-35.
- 12 **Masuda, S., Murakami, M., Ishikawa, Y., Ishii, T. and Kudo, I.,** Diverse cellular localizations of secretory phospholipase A₂ enzymes in several human tissues. *Biochim Biophys Acta* 2005. **1736:** 200-210.
- 13 **Davidson, F. F. and Dennis, E. A.,** Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms. *J Mol Evol* 1990. **31:** 228-238.

- 14 **Verheij, H. M., Slotboom, A. J. and de Haas, G. H.,** Structure and function of phospholipase A₂. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1981. **91**: 91-203.
- 15 **Kini, R. M. and Evans, H. J.,** A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon* 1989. **27**: 613-635.
- 16 **Kramer, R. M., Hession, C., Johansen, B., Hayes, G., McGray, P., Chow, E. P., Tizard, R. and Pepinsky, R. B.,** Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1989. **264**: 5768-5775.
- 17 **Seilhamer, J. J., Pruzanski, W., Vadas, P., Plant, S., Miller, J. A., Kloss, J. and Johnson, L. K.,** Cloning and recombinant expression of phospholipase A₂ present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J Biol Chem* 1989. **264**: 5335-5338.
- 18 **Romaschin, A. D., DeMajo, W. C., Winton, T., D'Costa, M., Chang, G., Rubin, B., Gamliel, Z. and Walker, P. M.,** Systemic phospholipase A₂ and cachectin levels in adult respiratory distress syndrome and multiple-organ failure. *Clin Biochem* 1992. **25**: 55-60.
- 19 **Partrick, D. A., Moore, E. E., Silliman, C. C., Barnett, C. C. and Kuypers, F. A.,** Secretory phospholipase A₂ activity

- correlates with postinjury multiple organ failure. *Crit Care Med* 2001. **29**: 989-993.
- 20 **Schroder, T., Kivilaakso, E., Kinnunen, P. K. and Lempinen, M.,** Serum phospholipase A₂ in human acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980. **15**: 633-636.
21. **Vadas, P.,** Elevated plasma phospholipase A₂ levels: correlation with the hemodynamic and pulmonary changes in gram-negative septic shock. *J Lab Clin Med* 1984. **104**: 873-881.
- 22 **Nakae, H., Endo, S., Inada, K., Yamashita, H., Yamada, Y., Takakuwa, T., Kasai, T., Ogawa, M. and Uchida, K.,** Plasma concentrations of type II phospholipase A₂, cytokines and eicosanoids in patients with burns. *Burns* 1995. **21**: 422-426.
- 23 **Kim, D. K., Fukuda, T., Thompson, B. T., Cockrill, B., Hales, C. and Bonventre, J. V.,** Bronchoalveolar lavage fluid phospholipase A₂ activities are increased in human adult respiratory distress syndrome. *Am J Physiol* 1995. **269**: L109-118.
- 24 **Kugiyama, K., Ota, Y., Sugiyama, S., Kawano, H., Doi, H., Soejima, H., Miyamoto, S., Ogawa, H., Takazoe, K. and Yasue, H.,** Prognostic value of plasma levels of secretory type

II phospholipase A₂ in patients with unstable angina pectoris.

Am J Cardiol 2000. **86**: 718-722.

- 25 **Samet, J. M., Madden, M. C. and Fonteh, A. N.,** Characterization of a secretory phospholipase A₂ in human bronchoalveolar lavage fluid. *Exp Lung Res* 1996. **22**: 299-315.
- 26 **Bowton, D. L., Seeds, M. C., Fasano, M. B., Goldsmith, B. and Bass, D. A.,** Phospholipase A₂ and arachidonate increase in bronchoalveolar lavage fluid after inhaled antigen challenge in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1997. **155**: 421-425.
- 27 **Chilton, F. H., Averill, F. J., Hubbard, W. C., Fonteh, A. N., Triggiani, M. and Liu, M. C.,** Antigen-induced generation of lyso-phospholipids in human airways. *J Exp Med* 1996. **183**: 2235-2245.
- 28 **Triggiani, M., De Marino, V., Sofia, M., Faraone, S., Ambrosio, G., Carratu, L. and Marone, G.,** Characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase in human bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 1997. **156**: 94-100.
- 29 **Arbibe, L., Koumanov, K., Vial, D., Rougeot, C., Faure, G., Havet, N., Longacre, S., Vargaftig, B. B., Bereziat, G., Voelker, D. R., Wolf, C. and Touqui, L.,** Generation of lyso-

- phospholipids from surfactant in acute lung injury is mediated by type-II phospholipase A2 and inhibited by a direct surfactant protein A-phospholipase A2 protein interaction. *J Clin Invest* 1998. **102**: 1152-1160.
- 30 **Weltzien, H. U.**, Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 1979. **559**: 259-287.
- 31 **Graler, M. H. and Goetzl, E. J.**, Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity. *Biochim Biophys Acta* 2002. **1582**: 168-174.
- 32 **Granata, F., Balestrieri, B., Petraroli, A., Giannattasio, G., Marone, G. and Triggiani, M.**, Secretory phospholipases A₂ as multivalent mediators of inflammatory and allergic disorders. *Int Arch Allergy Immunol* 2003. **131**: 153-163.
- 33 **Triggiani, M., Granata, F., Giannattasio, G. and Marone, G.**, Secretory phospholipases A₂ in inflammatory and allergic diseases: not just enzymes. *J Allergy Clin Immunol* 2005. **116**: 1000-1006.
- 34 **Bomalaski, J. S., Lawton, P. and Browning, J. L.**, Human extracellular recombinant phospholipase A₂ induces an

- inflammatory response in rabbit joints. *J Immunol* 1991. **146**: 3904-3910.
- 35 **Pruzanski, W., Vadas, P. and Fornasier, V.,** Inflammatory effect of intradermal administration of soluble phospholipase A₂ in rabbits. *J Invest Dermatol* 1986. **86**: 380-383.
- 36 **Singer, A. G., Ghomashchi, F., Le Calvez, C., Bollinger, J., Bezzine, S., Rouault, M., Sadilek, M., Nguyen, E., Lazdunski, M., Lambeau, G. and Gelb, M. H.,** Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A₂. *J Biol Chem* 2002. **277**: 48535-48549.
- 37 **Beck, S., Lambeau, G., Scholz-Pedretti, K., Gelb, M. H., Janssen, M. J., Edwards, S. H., Wilton, D. C., Pfeilschifter, J. and Kaszkin, M.,** Potentiation of Tumor Necrosis Factor- α -induced Secreted Phospholipase A₂ (sPLA₂)-IIA Expression in Mesangial Cells by an Autocrine Loop Involving sPLA₂ and Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Activation. *J Biol Chem* 2003. **278**: 29799-29812.
- 38 **Granata, F., Petraroli, A., Boilard, E., Bezzine, S., Bollinger, J., Del Vecchio, L., Gelb, M. H., Lambeau, G., Marone, G. and Triggiani, M.,** Activation of cytokine production by

- secreted phospholipase A₂ in human lung macrophages expressing the M-type receptor. *J Immunol* 2005. **174**: 464-474.
- 39 **Kanemasa, T., Arimura, A., Kishino, J., Ohtani, M. and Arita, H.**, Contraction of guinea pig lung parenchyma by pancreatic type phospholipase A₂ via its specific binding site. *FEBS Lett* 1992..**303**: 217-220.
- 40 **Kanemasa, T., Hanasaki, K. and Arita, H.**, Migration of vascular smooth muscle cells by phospholipase A₂ via specific binding sites. *Biochim Biophys Acta* 1992. **1125**: 210-214.
- 41 **Nakajima, M., Hanasaki, K., Ueda, M. and Arita, H.**, Effect of pancreatic type phospholipase A₂ on isolated porcine cerebral arteries via its specific binding sites. *FEBS Lett* 1992. **309**: 261-264.
- 42 **Murakami, M., Kambe, T., Shimbara, S., Yamamoto, S., Kuwata, H. and Kudo, I.**, Functional association of type IIA secretory phospholipase A₂ with the glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan in the cyclooxygenase-2-mediated delayed prostanoid-biosynthetic pathway. *J Biol Chem* 1999. **274**: 29927-29936.

- 43 **Lambeau, G. and Lazdunski, M.,** Receptors for a growing family of secreted phospholipases A_2 . *Trends Pharmacol Sci* 1999. **20**: 162-170.
- 44 **Kim, K. P., Rafter, J. D., Bittova, L., Han, S. K., Snitko, Y., Munoz, N. M., Leff, A. R. and Cho, W.,** Mechanism of human group V phospholipase A_2 (PLA₂)-induced leukotriene biosynthesis in human neutrophils. A potential role of heparan sulfate binding in PLA₂ internalization and degradation. *J Biol Chem* 2001. **276**: 11126-11134.
- 45 **Murakami, M., Koduri, R. S., Enomoto, A., Shimbara, S., Seki, M., Yoshihara, K., Singer, A., Valentin, E., Ghomashchi, F., Lambeau, G., Gelb, M. H. and Kudo, I.,** Distinct arachidonate-releasing functions of mammalian secreted phospholipase A_2 s in human embryonic kidney 293 and rat mastocytoma RBL-2H3 cells through heparan sulfate shuttling and external plasma membrane mechanisms. *J Biol Chem* 2001. **276**: 10083-10096.
- 46 **Lewis, C. E. and McGee, J.,** *The Macrophage*. IRL Press, Oxford: 1992.

- 47 **Lohmann-Matthes, M. L., Steinmuller, C. and Franke-Ullmann, G.**, Pulmonary macrophages. *Eur. Respir. J.* 1994. 7: 1678-1689.
- 48 **Nathan, C. F.**, Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987. 79: 319-326.
- 49 **Remick, D.**, *Cytokines in Health and Disease*, 02 Edn. Marcel Dekker, New York: 1997.
- 50 **Triggiani, M., Granata, F., Oriente, A., De Marino, V., Gentile, M., Calabrese, C., Palumbo, C. and Marone, G.**, Secretory phospholipases A₂ induce β -glucuronidase release and IL-6 production from human lung macrophages. *J Immunol* 2000. 164: 4908-4915.
- 51 **Triggiani, M., Granata, F., Balestrieri, B., Petraroli, A., Scalia, G., Del Vecchio, L. and Marone, G.**, Secretory phospholipases A₂ activate selective functions in human eosinophils. *J Immunol* 2003. 170: 3279-3288.
- 52 **Triggiani, M., Granata, F., Oriente, A., Gentile, M., Petraroli, A., Balestrieri, B. and Marone, G.**, Secretory phospholipases A₂ induce cytokine release from blood and synovial fluid monocytes. *Eur J Immunol* 2002. 32: 67-76.

- 53 **Triggiani, M., Gentile, M., Secondo, A., Granata, F., Oriente, A., Taglialatela, M., Annunziato, L. and Marone, G.,** Histamine induces exocytosis and IL-6 production from human lung macrophages through interaction with H1 receptors. *J Immunol* 2001. **166**: 4083-4091.
- 54 **Lowry, O., Rosebrough, A., Farr, A. and Randall, R.,** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951. **193**: 265-275.
- 55 **Diez, E., Chilton, F. H., Stroup, G., Mayer, R. J., Winkler, J. D. and Fonteh, A. N.,** Fatty acid and phospholipid selectivity of different phospholipase A₂ enzymes studied by using a mammalian membrane as substrate. *Biochem J* 1994. **301**: 721-726.
- 56 **Snedecor, G. W.,** *Statistical Methods*. Iowa State University Press, Ames: 1980.
- 57 **Verheij, H. M., Volwerk, J. J., Jansen, E. H., Puyk, W. C., Dijkstra, B. W., Drenth, J. and de Haas, G. H.,** Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. *Biochemistry* 1980. **19**: 743-750.

- 58 **Ruegg, U. T. and Rudinger, J.,** Reductive cleavage of cystine disulfides with tributylphosphine. *Methods Enzymol.* 1977. **47:** 111-116.
- 59 **Janssen, M. J., van de Wiel, W. A., Beiboer, S. H., van Kampen, M. D., Verheij, H. M., Slotboom, A. J. and Egmond, M. R.,** Catalytic role of the active site histidine of porcine pancreatic phospholipase A₂ probed by the variants H48Q, H48N and H48K. *Protein Eng* 1999. **12:** 497-503.
- 60 **Hagishita, S., Yamada, M., Shirahase, K., Okada, T., Murakami, Y., Ito, Y., Matsuura, T., Wada, M., Kato, T., Ueno, M., Chikazawa, Y., Yamada, K., Ono, T., Teshirogi, I. and Ohtani, M.,** Potent inhibitors of secretory phospholipase A₂: synthesis and inhibitory activities of indolizine and indene derivatives. *J Med Chem* 1996. **39:** 3636-3658.
- 61 **Yokota, Y., Hanasaki, K., Ono, T., Nakazato, H., Kobayashi, T. and Arita, H.,** Suppression of murine endotoxic shock by sPLA₂ inhibitor, indoxam, through group IIA sPLA₂-independent mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1999. **1438:** 213-222.
- 62 **Yokota, Y., Higashino, K., Nakano, K., Arita, H. and Hanasaki, K.,** Identification of group X secretory

- phospholipase A₂ as a natural ligand for mouse phospholipase A₂ receptor. *FEBS Lett* 2000. **478**: 187-191.
- 63 **Lambeau, G., Ancian, P., Nicolas, J. P., Beiboer, S. H., Moinier, D., Verheij, H. and Lazdunski, M.**, Structural elements of secretory phospholipases A₂ involved in the binding to M-type receptors. *J Biol Chem* 1995. **270**: 5534-5540.
- 64 **Tocker, J. E., Durham, S. K., Welton, A. F. and Selig, W. M.**, Phospholipase A₂-induced pulmonary and hemodynamic responses in the guinea pig. Effects of enzyme inhibitors and mediators antagonists. *Am Rev Respir Dis* 1990. **142**: 1193-1199.
- 65 **Arumugam, T. V., Arnold, N., Proctor, L. M., Newman, M., Reid, R. C., Hansford, K. A., Fairlie, D. P., Shiels, I. A. and Taylor, S. M.**, Comparative protection against rat intestinal reperfusion injury by a new inhibitor of sPLA₂, COX-1 and COX-2 selective inhibitors, and an LTC₄ receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 2003. **140**: 71-80.
- 66 **Furue, S., Kuwabara, K., Mikawa, K., Nishina, K., Shiga, M., Maekawa, N., Ueno, M., Chikazawa, Y., Ono, T., Hori, Y., Matsukawa, A., Yoshinaga, M. and Obara, H.**, Crucial role of group IIA phospholipase A(2) in oleic acid-induced

- acute lung injury in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 1999. **160**: 1292-1302.
- 67 Tomita, Y., Jyoyama, H., Kobayashi, M., Kuwabara, K., Furue, S., Ueno, M., Yamada, K., Ono, T., Teshirogi, I., Nomura, K., Arita, H., Okayasu, I. and Hori, Y., Role of group IIA phospholipase A2 in rat colitis induced by dextran sulfate sodium. *Eur J Pharmacol* 2003. **472**: 147-158.
- 68 Tomita, Y., Kuwabara, K., Furue, S., Tanaka, K., Yamada, K., Ueno, M., Ono, T., Maruyama, T., Ajiki, T., Onoyama, H., Yamamoto, M. and Hori, Y., Effect of a selective inhibitor of secretory phospholipase A₂, S-5920/LY315920Na, on experimental acute pancreatitis in rats. *J Pharmacol Sci* 2004. **96**: 144-154.
- 69 Abraham, E., Naum, C., Bandi, V., Gervich, D., Lowry, S. F., Wunderink, R., Schein, R. M., Macias, W., Skerjanec, S., Dmitrienko, A., Farid, N., Forgue, S. T. and Jiang, F., Efficacy and safety of LY315920Na/S-5920, a selective inhibitor of 14-kDa group IIA secretory phospholipase A2, in patients with suspected sepsis and organ failure. *Crit Care Med* 2003. **31**: 718-728.

- 70 **Bowton, D. L., Dmitrienko, A. A., Israel, E., Zeiher, B. G. and Sides, G. D.,** Impact of a soluble phospholipase A₂ inhibitor on inhaled allergen challenge in subjects with asthma. *J Asthma* 2005. **42**: 65-71.
- 71 **Bradley, J. D., Dmitrienko, A. A., Kivitz, A. J., Gluck, O. S., Weaver, A. L., Wiesenhutter, C., Myers, S. L. and Sides, G. D.,** A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial of LY333013, a selective inhibitor of group II secretory phospholipase A₂, in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2005. **32**: 417-423.

LEGENDA DELLE FIGURE

FIG. 1: Livelli di sPLA₂ nel BAL. Le sPLA₂ sono presenti nel lavaggio broncoalveolare (BAL) sia di individui normali che di pazienti asmatici e con fibrosi. In questi ultimi, i livelli di sPLA₂ sono circa tre volte più elevati rispetto ai pazienti di controllo. Analogamente, livelli di sPLA₂ più elevati rispetto agli individui normali si rilevano nel BAL di pazienti con fibrosi polmonare idiopatica.

FIG. 2 Isoforme di sPLA₂ nel BAL. Nel lavaggio broncoalveolare (BAL) di pazienti con COPD, Fibrosi e Sarcoidosi sono presenti le isoforme IB, III e V di sPLA₂.

FIG. 3: Effetto di diverse sPLA₂ sulla secrezione di TNF- α dai HLM. Le cellule sono state incubate (37°C, 6 ore) con la hGIB, hGIIA, bvGIII, hGV, hGX e hGXII alle concentrazioni indicate. La secrezione di TNF- α è stata determinata nei sopranatanti mediante ELISA. I dati sono

la media \pm ES di sei esperimenti. *, $p < 0,05$ vs verso il gruppo di controllo

FIG. 4: Effetto di diverse sPLA₂ sulla secrezione di CXCL-8 dai HLM. Le cellule sono state incubate (37°C, 6 ore) con la hGIB, hGIIA, bvGIII, hGV, hGX e hGXII alle concentrazioni indicate. La secrezione di CXCL-8 è stata determinata nei sopranatanti mediante ELISA. I dati sono la media \pm ES di sei esperimenti. *, $p < 0,05$ vs verso il gruppo di controllo

FIG. 5: Effetto della hGX sulla secrezione di citochine dai HLM. Le cellule sono state incubate (37°C, 6 o 24 ore) con le concentrazioni di hGX indicate. La secrezione di citochine (IL-6, IL-10 e IL-12) è stata determinata nei sopranatanti mediante ELISA. I valori sono espressi come ng/mg di proteine. I dati sono la media \pm ES di sei esperimenti. * $p < 0,05$ vs. verso il gruppo di controllo

FIG. 6: Effetto della hGX sulla secrezione di chemochine dai HLM. Le cellule sono state incubate (37°C, 6 o 24 ore)

con le concentrazioni di hGX indicate. La secrezione di chemochine (CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 β e CCL22/MDC) è stata determinata nei soprannatanti mediante ELISA. I valori sono espressi come ng/mg di proteine. I dati sono la media \pm ES di sei esperimenti. * $p < 0,05$ vs. verso il gruppo di controllo

FIG. 7: Ruolo dell'attività enzimatica sulla secrezione di TNF- α dai HLM. Le cellule sono state incubate (37°C, 6 ore) con la hGIB enzimaticamente attiva (*wild type*), la hGIB inattivata con BPB (1 mM, 4 ore, 37°C), o con DTT (10 mM, 2 ore, 50 °C) e con il mutante hGIB-H48Q. La secrezione di TNF- α è stata determinata nei soprannatanti mediante ELISA. I valori sono espressi come ng/mg di proteine. I dati sono la media di quattro esperimenti \pm l'ES. * $p < 0,05$; § $p < 0,01$ vs il gruppo di controllo

FIG. 8: Effetto di Me-indoxam sulla secrezione di CXCL8 indotta dalla hGX dai HLM. La hGX (1 μ g/ml) è stata incubata (37°C, 15 min) con o senza Me-indoxam prima di essere aggiunta ai HLM. La secrezione di CXCL8 è stata

determinata nei sopranatanti mediante ELISA. I risultati sono espressi come percento di inibizione della risposta massima indotta dalla hGX. I dati sono la media \pm ES di quattro esperimenti. * p < 0,05 vs la hGX

FIG. 9: Effetto di Me-indoxam sulla secrezione di TNF- α indotta dalla hGIB e dal hGIB-H48Q HLM. La hGX enzimaticamente attiva (*wild type*) e il mutante hGIB-H48Q (1 μ g/ml) sono state incubate (37°C, 15 min) con o senza 10 μ M Me-indoxam prima dell'aggiunta agli HLM. La secrezione di TNF- α è stata determinata nei sopranatanti mediante ELISA. I valori sono espressi come ng/mg di proteine. I dati sono la media \pm ES di quattro esperimenti. * p < 0,05; §, p < 0,01 vs i rispettivi gruppi di controllo non trattati