

Università degli Studi di Napoli Federico II

Facoltà di Medicina e Chirurgia



Dottorato di Ricerca in

Fisiopatologia Clinica e Medicina Sperimentale

(Coordinatore: Prof. Gianni Marone)

XXIV° Ciclo

TESI DI DOTTORATO

Il blocco farmacologico del recettore β 1-adrenergico riduce l'iperattività simpatica in corso di scompenso cardiaco ripristinando i livelli proteici di GRK2 e migliorando il signaling del recettore α 2-adrenergico nella midollare del surrene

Tutor

Candidata

Ch.mo Prof. Franco Rengo

Dott.ssa Carmela Zincarelli

INTRODUZIONE

Lo scompenso cardiaco (HF) è la principale causa di morte nei paesi occidentali (Levy et al. 2002). Le alterazioni del signaling e della funzione del recettore β -adrenergico (β AR) cardiaco rappresentano una caratteristica saliente della fisiopatologia dello scompenso cardiaco cronico (Feldman et al 2005; Tilley and Rockman 2006). E' stato dimostrato che l'aumento dei livelli e dell'attività della chinasi 2 del recettore accoppiato a proteina G (GRK2), gioca un ruolo critico nel promuovere la down-regulation di β_1 AR e la dissociazione sia di β_1 AR che di β_2 AR dalla proteina G (desensibilizzazione) nello scompenso cardiaco, determinando un peggioramento della funzione cardiaca globale (Petrofski and Koch 2003; Rengo et al. 2011). Inoltre, nell'ultimo decennio, il nostro gruppo ha dimostrato che l'inibizione di GRK2 cardiaca riduce la mortalità ed il rimodellamento cardiaco mentre migliora la funzione cardiaca in modelli con HF (Iaccarino et al. 2005; Raake et al. 2008; Rengo et al. 2009).

Nello scompenso cardiaco si verifica una iperattivazione adrenergica, che aiuta a mantenere le performance a breve termine, ma con il progredire dello scompenso, l'ipertono del sistema nervoso simpatico (SNS) determina effetti biologici avversi sui cardiomiociti (Triposkiadis et al. 2009; Lympelopoulos et al. 2007). L'iperattivazione adrenergica è associata ad una attivazione neuroormonale generale, risultante in un danno strutturale d'organo come dilatazione delle camere cardiache, ipertrofia e fibrosi (Triposkiadis et al. 2009; Lympelopoulos et al. 2007). E' stato dimostrato che la terapia con β -bloccanti esercita effetti benefici sulla funzione cardiaca e soprattutto, che riduce la morbilità e mortalità correlata allo scompenso cardiaco (Bristow 2000; Foody et al. 2002). Tale terapia con β -bloccanti è in grado di prevenire direttamente la l'azione cardiotossica delle catecolamine, prevenendo il legame di quest'ultime con i recettori β -adrenergici (Bristow 2000; Foody et al. 2002). In particolare, è stato riportato che la terapia a lungo termine con β -bloccanti è in grado di ridurre l'iperattivazione del SNS che si associa allo scompenso cardiaco, sia in

modelli sperimentali di HF (Rengo et al. 2009; Pleger et al. 2007) che nell'uomo (Nemanich et al. 1990; Andersson et al. 1994; Yoshikawa et al. 1996). Tuttavia, i meccanismi sottostanti responsabili di tali effetti restano ancora non del tutto identificati.

Recentemente, il nostro gruppo ha dimostrato che l'aumento di espressione di GRK2 nelle cellule cromaffini della midollare del surrene, produttori CA, in animali con HF, determina la down-regulation e la desensibilizzazione del recettore α_2 -adrenergico (α_2 ARs) (Lympelopoulos et al. 2007; Lympelopoulos et al. 2008; Lympelopoulos et al. 2010). Tali recettori sono fisiologicamente espressi sulle membrane delle cellule cromaffini della ghiandola surrenale e sulle terminazioni nervose del SNS, dove in condizioni normali esercitano un controllo di feedback negativo sulla produzione e secrezione delle CA (Lympelopoulos et al. 2007). Sembra che con la progressione dello scompenso cardiaco, i recettori surrenalici α_2 AR diventano marcatamente disfunzionanti a causa dell'azione di GRK2, favorendo in questo modo gli elevati livelli di CA e l'iperattivazione del SNS che si verificano in tale patologia.

Nel presente studio, abbiamo studiato gli effetti del trattamento con β -bloccanti sulle ghiandole surrenaliche in un modello di HF nel ratto. Abbiamo valutato se il trattamento cronico con bisoprololo possa potenzialmente recuperare l'alterazione dell'asse α_2 AR-CA nello scompenso cardiaco e contribuire a ridurre l'attivazione del SNS, esercitando in questo modo un'azione protettiva sul cuore scompensato. Concentrando la nostra attenzione sui livelli di GRK2 nel nostro studio abbiamo cercato di trovare non solo il target principale per la disfunzione delle ghiandole surrenali nello scompenso cardiaco, ma anche un potenziale meccanismo terapeutico per ridurre fisiologicamente l'attivazione del SNS.

MATERIALI E METODI

Il protocollo di studio è stato disegnato in accordo con la guida all'assistenza e all'utilizzo degli animali da laboratorio (*The Guide for Care and Use of Laboratory Animals*) de l National Institutes of Health (NIH Publication No. 85–23, Revised 1996) ed approvato dal comitato etico del nostro Istituto per l'utilizzo di animali nella ricerca scientifica.

Gruppi Sperimentali: 105 ratti maschi Sprague-Dawley (~300g) (Charles River Laboratories, Italy) sono stati inclusi nello studio e sono stati randomizzati in tre gruppi sperimentali. Gli animali sottoposti ad infarto del miocardio, indotto mediante procedura chirurgica e animali sham-operati sono stati trattati con veicolo (drinking water) per 24 settimane Sham, $n = 20$; HF/C, $n = 40$). Dopo 4 settimane dall'infarto del miocardio un gruppo di animali con scompenso cardiaco (HF) è stato trattato con bisoprololo per 10 settimane (HF/B, $n = 45$), utilizzando 80 mg per litro in drinking water (pari ad una dose approssimativa di 10mg/kg/die) (Rengo et al. 2009; Pleger et al. 2007; Watanabe et al. 2001). La somministrazione di bisoprololo inizialmente corrispondeva ad un quarto della dose totale che veniva incrementata ogni settimana fino al raggiungimento del dosaggio intero.

Procedure sperimentali: L'infarto del miocardio è stato indotto mediante legatura chirurgica del ramo discendente anteriore della coronaria sinistra, come descritto in precedenza (Leosco et al. 2008). Per l'induzione dell'infarto del miocardio i ratti venivano anestetizzati con isoflurano 4% e lo stato di anestesia profonda confermato dall'assenza di risposta allo stimolo doloroso. Successivamente, i ratti venivano intubati e ventilati con una miscela di O₂ ed isoflurano 2% mediante un ventilatore a pressione controllata. Dopo toracotomia, l'infarto del miocardio veniva indotto mediante legatura permanente della arteria coronaria discendente anteriore. I ratti venivano osservati fino al momento del risveglio, e riportati nell'unità di stabulazione. Nel periodo post-operatorio i ratti venivano sottoposti a trattamento analgesico (buprenorfina 400 IU/kg ip 20 min prima dell'intervento, ketoprofene 10 mg/kg sc per 2 giorni dopo l'intervento). Il tasso globale di mortalità (precoce e tardiva)

per tale procedura era circa del 35%, come riportato precedentemente (Leosco et al. 2008). Le valutazioni ecocardiografiche seriali in M-mode venivano effettuate a 4 settimane dall'IM e alla fine del protocollo sperimentale nei ratti anestetizzati (1.5% isofluorano), con l'impiego del sistema VisualSONICS VeVo 770, come descritto (Rengo et al. 2009; Pleger et al. 2007; Leosco et al. 2008). Alla fine dello studio, gli animali venivano sacrificati mediante dislocazione cervicale sotto anestesia (ventilati con miscela di O₂ ed isofluorano 5%).

Estrazione RNA e Real-time RT-PCR: l'estrazione dell'RNA totale cardiaco, la retro trascrizione in cDNA e la real time quantitativa RT-PCR sono state eseguite come precedentemente descritto (Rengo et al. 2010).

Western blotting : I livelli proteici di GRK2 (sc-562; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) sono stati valutati mediante western blotting utilizzando estratti proteici di ghiandole surrenali e cuori come descritto (Rengo et al. 2010).

Preparazione delle frazioni tissutali: le frazioni tissutali sono state ottenute come precedentemente citato (Leosco et al. 2008).

Saturation ligand-binding : Il saggio di binding sulle membrane plasmatiche ottenute dalle ghiandole surrenali è stato effettuato utilizzando un radioligando (³H]RX821002), del recettore α_2 AR come descritto (Lymeropoulos et al. 2007).

Binding del recettore β -AR: le frazioni membranali ottenute dal ventricolo sinistro sono state utilizzate per studi di binding del recettore β -AR mediante l'impiego del l' antagonista non selettivo [¹²⁵I]Cianopindololo (¹²⁵I-CYP) come descritto precedentemente (Leosco et al. 2008). Tutti i saggi sono stati effettuati in triplicato e la densità recettoriale (in fmol) è stata normalizzata per mg di proteine di membrana.

Misurazione dell'area infartuata: L'area infartuata è stata esaminata in tutti i gruppi sperimentali alla fine dello studio, come descritto in precedenza (Rengo et al. 2009).

Isolamento e coltura delle cellule cromaffini del surrene: Allo scopo di isolare le cellule cromaffini, le ghiandole surrenali degli animali dei tre gruppi di studio sono state incubate con soluzione di Locke contenete 1 mg/ml di collagenasi (>200 U/ml; Biochrom KG, Berlin, Germany), come precedentemente riportato (Lymperopoulos et al. 2007; Lymperopoulos et al. 2008).

Dosaggio della secrezione di catecolamine (CA) in vitro: A 48 h dall'isolamento, le cellule cromaffini venivano poste in una soluzione salina bilanciata, pretrattate o meno con UK14304 10 μ M per 30 min e stimulate con nicotina 20 μ M per 30 min . Alla fine del trattamento il soprannatante è stato collezionato per il dosaggio delle CA. Le cellule trattate con Adenovirus venivano infettate 48 h dopo l'isolamento e sottoposte alle varie stimolazioni 24h dopo l'infezione (72H dopo l'isolamento).

Dosaggio della secrezione di CA plasmatiche ed in vitro: I livelli plasmatici di epinefrina (Epi) e la norepinefrina (NEpi) plasmatiche sono stati determinati mediante saggio ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) su campioni di plasma di ratto mediante kit BI-CAT EIA ALPCO Diagnostics (Windham, NH) come già descritto.(Lymperopoulos et al. 2007; Rengo et al. 2010). La secrezione di Epi e NEpi in vitro nel mezzo di coltura delle cellule cromaffini è stata valutata mediante saggio ELISA, fondamentalmente come già descritto ((Lymperopoulos et al. 2007; Rengo et al. 2010).

Adenovirus: gli adenovirus ricombinanti AdGRK2 or AdGFP sono stati prodotti come descritto e purificati mediante due cicli sequenziali di ultracentrifugazione su gradiente di CsCl (Lymperopoulos et al. 2008).

Analisi Statistica: I dati sono stati analizzati mediante ANOVA, seguita da analisi di Bonferroni post hoc. La significatività è stata stabilita per valori di $p < 0.05$ e tutti i dati sono stati riportati come media \pm ES.

RISULTATI

Effetti della terapia con β -bloccanti sulla funzione e dimensioni cardiache

Allo scopo di valutare gli effetti del trattamento con β -bloccanti nello scompenso cardiaco cronico, ratti maschi adulti Sprague-Dawley sono stati sottoposti ad infarto del miocardio o operazione di controllo. Come mostrato in Fig. 1, l'infarto del miocardio determina importante disfunzione cardiaca e sfocia nello scompenso dopo 4 settimane. A questo time-point i ratti che erano stati sottoposti ad infarto, sono stati randomizzati per due trattamenti: bisoprololo o placebo. Come mostrato in Fig. 1 e 1D, ratti trattati con bisoprololo (HF/B) o i ratti di controllo (HF/C), non presentavano differenze sostanziali della funzione cardiaca espressa dalla frazione di eiezione (EF) del ventricolo sinistro o dimensioni (come espresso dal diametro telediastolico del ventricolo sinistro), mediante ecocardiografia pre-trattamento, così come tutti i ratti presentavano disfunzione del ventricolo sinistro a 4 settimane dopo infarto del miocardio e prima di iniziare il trattamento, paragonati con i ratti di controllo operati (sham). Dopo 10 settimane di trattamento, entrambi i gruppi di ratti scompensati presentavano una funzione cardiaca significativamente depressa rispetto ai ratti utilizzati come controlli; tuttavia, la frazione di eiezione era significativamente migliorata nei ratti sottoposti a trattamento con bisoprololo (Fig. 1B, 1C e tabella). Al contrario, il trattamento con placebo conduce ad un ulteriore deterioramento della funzione cardiaca dopo 10 settimane (Fig. 1B, 1C e tabella). Anche il negativo rimodellamento del ventricolo sinistro, espresso dalla dilatazione delle camere cardiache, progrediva ulteriormente nei ratti trattati con placebo, mentre veniva prevenuto dal trattamento con bisoprololo (1E e tabella). Inoltre, il trattamento con β -bloccante determinava una significativa riduzione della frequenza cardiaca (Fig. 1F). Infine, non vi era alcuna differenza nelle dimensioni dell'area infartuale tra i due gruppi di animali con scompenso cardiaco (tabella), il che non era sorprendente visto che il trattamento con bisoprololo era stato iniziato a 4 settimane dopo

l'infarto del miocardio, quando le dimensioni dell'infarto sono già stabilite. Questi risultati, considerati insieme, dimostrano che il trattamento con il β - bloccante bisoprololo è in grado di migliorare la funzione cardiaca e prevenire il rimodellamento negativo dello scompenso cardiaco post-infarto.

Effetti della terapia con β -bloccanti sul profilo genico del rimodellamento cardiaco

Dopo 10 settimane di trattamento dello scompenso cardiaco (14 settimane dopo l'infarto del miocardio), abbiamo valutato l'espressione genica cardiaca correlata con il rimodellamento cardiaco nei nostri animali da esperimento. Come marcatore di HF, abbiamo studiato l'espressione dell'mRNA nel ventricolo sinistro del Peptide natriuretico cerebrale (BNP) ed abbiamo trovato che risulta essere significativamente aumentato nei ratti di controllo con lo scompenso cardiaco, mentre era normalizzato negli animali trattati con bisoprololo (Fig. 2A). Abbiamo ulteriormente esaminato, come marcatore di rimodellamento e fibrosi, i livelli cardiaci di mRNA del Collagene di tipo I (Col1) e del fattore di crescita TGF β -1 (Fig. 2B e 2C) ed abbiamo riscontrato che i livelli di mRNA di entrambi questi marcatori erano significativamente elevati nei ratti HF/C rispetto ai controlli sham, mentre entrambi erano marcatamente ridotti nei ratti scompensati trattati con bisoprololo. Questi risultati dimostrano gli effetti positivi del trattamento con bisoprololo sul negativo rimodellamento cardiaco anche a livello molecolare.

Effetti della terapia con β -bloccanti sui livelli plasmatici di CA nello scompenso cardiaco

Abbiamo valutato i livelli di catecolamine nei nostri gruppi sperimentali al termine del periodo di studio. Sia Epinefrina (Epi) che la Norepinefrina (Nepi) erano marcatamente elevate nei ratti con HF rispetto ai controlli sham, come atteso (Fig. 3). Il trattamento di dieci settimane con bisoprololo determinava una significativa riduzione dei livelli plasmatici di Nepi e Epi circolanti rispetto al gruppo trattato con placebo (Fig. 3). Tuttavia, i nostri dati

dimostrano che il trattamento con bisoprololo nello scompenso cardiaco, non determina una completa normalizzazione dei livelli di CA circolanti, infatti essi restano significativamente più elevati rispetto ai ratti di controllo sham

Livelli di GRK2 nello scompenso cardiaco dopo terapia con β -bloccanti

Considerando che abbiamo recentemente dimostrato che GRK2, un regolatore cruciale della produzione surrenalica di CA, risulta essere over-espresso nella midollare del surrene degli animali scompensati (Lymeropoulos et al. 2007), la scoperta che la somministrazione di bisoprololo significativamente riduce i livelli di CA circolanti nello scompenso cardiaco, ci ha spinti a valutare come questo trattamento potrebbe influire i livelli di espressione di GRK2 nelle ghiandole surrenaliche degli animali scompensati. In accordo con i nostri precedenti studi, i livelli della proteina GRK2 surrenalica nel gruppo di animali HF/C era significativamente elevato rispetto ai ratti di controllo sham (Fig 4A). In particolare, il trattamento di dieci settimane con bisoprololo determinava una normalizzazione dei livelli di GRK2 nella midollare del surrene, indistinguibile dai ratti sham ed in linea con i ridotti livelli di CA circolanti (Fig. 4A). Di rilievo, abbiamo riscontrato simile incrementi dei livelli di GRK2 nel miocardio di ratti HF post-infarto che era associato con significativa down-regulation dei recettori β -adrenergici rispetto ai ratti sham (Supplemental Figure 1 and 2). Questi risultati sono consistenti con le nostri precedenti osservazioni (Rengo et al. 2009; Leosco et al. 2008; Rengo et al. 2010) e il trattamento con bisoprololo determinava una normalizzazione dei livelli proteici della GRK2 cardiaca e significativamente incrementava la densità dei recettori β -adrenergici cardiaci rispetto ai ratti HF/C e questi livelli erano normali nei ratti sham (Supplemental Figure 1 and 2).

Densità dei recettori α_2 -adrenergici della midollare del surrene nello scompenso cardiaco dopo terapia con β -bloccanti

Precedenti dati del nostro gruppo hanno dimostrato che durante lo scompenso cardiaco l'aumento di espressione/attività di GRK2 conduce ad una sostanziale disregolazione dei recettori adrenergici α_2 nella ghiandola surrenalica determinando una perdita della funzione inibitoria di tale recettore ed un incremento della secrezione di CA (Lymeropoulos et al. 2007). Questo ci ha spinto a valutare gli effetti della terapia con β -bloccante sulla densità dei α_2 AR del surrene nei nostri ratti con HF. Come mostrato in Fig. 4B, il gruppo HF/C mostrava una marcata down-regulation dei α_2 -AR surrenalici rispetto agli animali sham sani, tuttavia il trattamento con bisoprololo induceva un miglioramento significativo della densità dei α_2 AR surrenalici. Questi dati rafforzano la nozione che il trattamento con β -bloccanti reduce i livelli plasmatici di CA nello scompenso cardiaco, ripristinando nella midollare l'asse GRK2- α_2 AR-CA.

Rilascio in vitro di Epi da cellule cromaffini isolate

Per meglio valutare gli effetti del trattamento con β -bloccanti sulla disfunzione dei α_2 AR nello scompenso cardiaco, abbiamo esaminato il rilascio di CA da cellule cromaffini isolate da tre gruppi sperimentali e le abbiamo trattate in vitro con nicotina, uno stimolatore farmacologico del rilascio di CA, e pre-trattate con o senza l'agonista specifico UK14304 dei α_2 AR. Nelle cellule cromaffini in coltura di tutti i tre gruppi, la nicotina induceva il rilascio di uguali livelli di Epi. Nelle cellule derivate dai ratti sham, UK14304 attenuava il rilascio di Epi in risposta allo stimolo, come atteso, mentre nelle cellule cromaffini isolate dai ratti HF/C tale agonista non era in grado di inibire la secrezione di Epi in risposta alla stimolazione con nicotina, indicando che i recettori α_2 -A erano desensibilizzati. Al contrario, quando cellule cromaffini isolate dai ratti HF/B erano stimulate con UK14304, il rilascio di Epi indotto dalla nicotina era significativamente ridotto come con le cellule derivanti dai ratti sham (Fig. 5). Inoltre, il trattamento in vivo con β -bloccante era anche in grado di ripristinare la funzione dei α_2 AR verso l'inibizione della secrezione di Epi indotta dalla nicotina nelle cellule cromaffini (Supplemental Figure 3). Questi dati supportano l'ipotesi che il trattamento con

β -bloccante è in grado di ridurre la desensibilizzazione dei α_2 AR mediata da GRK2 attraverso la riduzione dei livelli di GRK2 e così può ripristinare la funzione inibitoria dei α_2 AR sul rilascio di CA da parte delle cellule cromaffini nello scompenso cardiaco.

Effetti della over-espressione di GRK2 sul rilascio di Epi da parte di cellule cromaffini isolate da ratti scompensati sottoposti a trattamento con bisoprololo a 14 settimane dall'infarto del miocardio

Per verificare se la normalizzazione dei livelli proteici di GRK2 surrenalici è critica per la capacità del bisoprololo a prevenire in vivo la down-regulation dei α_2 AR correlata allo scompenso cardiaco, abbiamo estratto le ghiandole surrenaliche dai ratti scompensati trattati con bisoprololo e le abbiamo tenute in coltura per 24 ore. Successivamente le cellule surrenaliche sono state infettate sia con un adenovirus esprimente GFP (Ad-GFP) come controllo, sia con Ad-GRK2. L'espressione indotta dei transgeni (GRK2 and GFP) era confermata dal western blotting negli estratti proteici cellulari (Fig. 6, pannello superiore) e 24 ore dopo l'infezione, la secrezione di CA dalle cellule cromaffini isolate era testata utilizzando nicotina e l'agonista specifico dei α_2 AR UK14304, come precedentemente descritto. Come mostrato in Fig. 6 (pannello inferiore), le cellule cromaffini estratte dai ratti trattati con bisoprololo ed infettate in vitro con Ad-GFP presentavano una normalizzazione del feedback negativo poiché UK14304 bloccava il rilascio di Epi indotto dalla nicotina. Di rilievo, quando GRK2 veniva over-espressa in queste cellule, l'inibizione con UK14304 del rilascio di CA indotto dalla nicotina veniva perso (Fig. 6). Risultati simili venivano ottenuti per la secrezione di Nepi nello stesso tipo di esperimenti (Figure 4 supplementare). Questi risultati suggeriscono fortemente che l'effetto del bisoprololo nel ripristinare la funzione inibitoria dei α_2 ARn nello scompenso cardiaco, sono dipendenti dai livelli/attività di GRK2 della ghiandola surrenalica.

DISCUSSIONE

In questo studio riportiamo un nuovo meccanismo molecolare che spiega, almeno in parte, la capacità, del trattamento a lungo termine con β -bloccante nello scompenso cardiaco cronico, di ridurre gli elevati livelli di CA circolanti che peggiorano significativamente la prognosi dei pazienti affetti da tale patologia (Triposkiadis et al. 2009; Lymperopoulos et al. 2007). Dieci settimane di trattamento con bisoprololo nei ratti con HF post-infarto determinano una normalizzazione dei livelli di GRK2 surrenalica, che conduce ad una marcata riduzione della produzione di CA surrenaliche attraverso il ripristino della funzione dei α_2 AR surrenalici, che sono desensibilizzati e down-regolati nello scompenso cardiaco. Questi risultati sono di particolare rilevanza clinica e fisiologica poiché diversi studi hanno riportato che il trattamento con β -bloccanti contrasta l'iperattivazione catecolaminergica dello scompenso cardiaco cronico nell'uomo (Nemanich et al. 1990; Andersson et al. 1994; Yoshikawa et al. 1996) e nei modelli animali (Rengo et al. 2009; Pleger et al. 2007) di questa malattia, non solo prevenendo l'attivazione del recettore adrenergico da parte dell'agonista, ma anche, in cronico, riducendo i livelli di CA circolanti. Tuttavia, precedentemente non è stata riportata nessuna evidenza concernente il meccanismo molecolare che media quest'ultimo effetto benefico di questa modalità di trattamento nello scompenso cardiaco.

Le CA circolanti derivano da due principali fonti: le terminazioni nervose del SNS, che rilasciano Nepi e la midollare del surrene, che produce principalmente Epi ed in minor misura Nepi. Nella ghiandola surrenalica, la produzione di CA è strettamente regolata dal sistema adrenergico, in particolare dai α_2 AR espressi nelle cellule cromaffini della midollare, che esercita un'azione inibitoria sul rilascio di CA, ed anche i β_2 AR, che facilitano la secrezione di CA (Lymperopoulos et al. 2007). Come molte altri GPCRs, i α_2 AR possono essere desensibilizzati dalla fosforilazione attraverso GRK, la cui azione cronica, come quella di GRK2, può promuovere la down-regulation del recettore. Durante lo scompenso cardiaco, GRK2 è sovra-espressa nella midollare del surrene, causando la disfunzione dei α_2 AR ed

risultando nella ipersecrezione di CA da parte delle cellule cromaffini (Lympelopoulos et al. 2007). Riducendo i livelli di GRK2 nella ghiandola surrenale, il trattamento con β -bloccante sembra ripristinare la densità ed il signaling dei α_2 AR surrenalici sulla membrana plasmatica ed il feedback inibitorio sulle CA, e questo rappresenta un meccanismo attraverso il quale farmaci come il bisoprololo (utilizzato in questo studi) possono ridurre l'ipertono simpatico nello scompenso cardiaco cronico

In generale, il successo dei β - bloccanti nel trattamento dello scompenso cardiaco è attribuito alla loro capacità di bloccare il costante ipertono adrenergico presente nel cuore scompensato, riducendo in questo modo la mortalità e la morbilità dei pazienti con HF (Bristow 2000; Foody et al. 2002). Inoltre, nei modelli sperimentali ed umani di HF, il blocco dei β AR è stato dimostrato avere diversi effetti addizionali terapeutici, incluso miglioramento del rimodellamento cardiaco negativo, ridotta apoptosi, inibita internalizzazione dei β AR, ridotto consumo di ossigeno, e ridotto rischio di aritmie (Foody et al. 2002). In aggiunta a questi effetti funzionali e clinici, il trattamento con β -bloccanti sembra anche ridurre lo squilibrio neuroormonale nello scompenso cardiaco (Nemanich et al. 1990; Andersson et al. 1994; Yoshikawa et al. 1996). In particolare, abbiamo recentemente dimostrato che il trattamento a lungo termine con metoprololo nei ratti con HF, induce una significativa riduzione di entrambe Epi e Nepi (Rengo et al. 2009). Questo risultato è in accordo con l'osservazione nei pazienti con HF che dimostrano che il trattamento con β -bloccanti è in grado di ridurre l'ipertono del SNS (Nemanich et al. 1990; Andersson et al. 1994; Yoshikawa et al. 1996). Quest'ultima proprietà del trattamento con β -bloccanti è particolarmente importante per almeno due ragioni fondamentali: primo, le CA esercitano effetti negativi sul cuore e sui vasi periferici anche attraverso i α AR, che non sono antagonizzati dai β -bloccanti (Lamba and Abraham 2000); secondo, l'ipertono del SNS può potenziare e far perpetuare l'asse neuroormonale, come il sistema renina-angiotensina ed endotelina (Lee and Tkacs 2008; Goldsmith SR 2004). In questo modo, il trattamento con β -bloccanti, riducendo l'ipertono del

SNS correlato con HF, è anche in grado di prevenire l'effetto nocivo delle CA sui α_2 AR e di diminuire l'attività di altri sistemi neuromonali cardiotossici.

Tuttavia, è importante menzionare che esistono anche studi che dimostrano nessun effetto dei farmaci β -bloccanti sui livelli di CA circolanti (Santostasi et al. 1998; The RESOLVD Investigators 2000; Blanchet et al. 2003; Foucart et al. 1991). La discrepanza tra diversi studi può essere ascritta a diversi fattori: 1) particolari agenti β -bloccanti utilizzati (es. sottotipi non selettivi vs. farmaci β_1 AR selettivi); 2) durata del trattamento (lungo termine vs. breve termine); 3) severità dello HF (classe NYHA e EF%); 4) livelli di CA prima di iniziare il trattamento (elevati vs. bassi livelli). Nel nostro modello di HF severo, causato da un esteso infarto del miocardio (area infartuale ~45%), documentata dall'importante riduzione della EF%, alterato rimodellamento del ventricolo sinistro, ed elevati livelli di CA circolanti, abbiamo riscontrato, una normalizzazione dei livelli di CA circolanti nei ratti HF/B rispetto a quelli HF/C.

Come ricordato prima, nelle terminazioni nervosa del SNS e nella ghiandola surrenalica, la secrezione di CA è strettamente regolata dai recettori adrenergici che agiscono come "autorecettori presinaptici" in questo caso (Lympopoulos et al. 2007). La possibilità di ridurre i livelli di CA utilizzando i β -bloccanti è stata già suggerita ed è legata al blocco degli autorecettori presinaptici facilitatori β_2 AR (Foucart et al. 1991 ; Foucart et al. 1998). Nel nostro studio abbiamo scelto il bisoprololo, un β_1 -bloccante selettivo, allo scopo di precludere ogni coinvolgimento del sottotipo β_2 AR, che è noto essere un autorecettore facilitatorio presinaptico nelle ghiandole surrenali e nelle terminazioni del SNS (Lympopoulos et al. 2007; Foucart et al. 1991 ; Foucart et al. 1998). In particolare, il blocco dei recettori β_1 AR indotto dal bisoprololo, al contrario dei β_2 AR, sembra non essere coinvolto nel rilascio neuronale o surrenalico di CA e quindi nella regolazione dei livelli di CA (Lympopoulos et al. 2007; Foucart et al. 1991 ; Foucart et al. 1998). Inoltre, diverse linee di evidenza hanno dimostrato che il signaling e la funzione dei β_2 AR è sostanzialmente diverso da quelli dei β_1 AR nei cardiomiociti. In particolare, l'ipertono simpatico nello scompenso

cardiaco sembra essere ascrivibile principalmente ai β_1 ARs cardiaci piuttosto che ai β_2 AR (Zhu et al. 2005).

Bisogna ricordare che se gli effetti osservati del bisoprololo sull'asse secretorio GRK2- α_2 -AR-CA sono dipendenti dal recettore, ancora resta una questione aperta che noi pensiamo di chiarire con esperimenti futuri. Per esempio, non è ancora del tutto chiaro attraverso i nostri presenti risultati che la riduzione di GRK2 nelle ghiandole surrenaliche (e nel miocardio) è determinata in modo specifico dal blocco dei β_1 AR in se o se ci potrebbe esser un evento indipendente dal recettore come un'azione benefica è generale di tali farmaci sul cuore, che induce indirettamente le ghiandole surrenaliche a sopprimere il rilascio di CA. Un'altra importante questione che richiede ulteriori esperimenti in futuro, è se questi effetti positivi sulla ghiandola surrenalica, indotti dal bisoprololo siano condivisi da altri farmaci della stessa classe o almeno da altri bloccanti β_1 -selettivi, che sono risultati avere un effetto benefico nello scompenso cardiaco, come il metoprololo.

Un interessante effetto terapeutico può essere spiegato dai nostri dati sul signaling GRK2- α_2 AR nelle ghiandole surrenaliche in seguito a trattamento cronico con β_1 -bloccante. La scarsa efficacia simpato-inibitoria dell'agonista α_2 AR moxonidina nei pazienti con scompenso cardiaco, può essere ascrivibile alla disfunzione dei α_2 AR dipendente da GRK2. Infatti, i trials MOXSE e MOXCON (Swedberg et al. 2000; Swedberg et al. 2002), due recenti trials clinici sulla moxonidina per il trattamento dello scompenso cardiaco, sono stati interrotti a causa di eccessiva mortalità nel gruppo di pazienti trattati. Una possibile spiegazione del fallimento di questi trials potrebbe essere la disfunzione dei recettori α_2 AR periferici. In questo modo le terminazioni cardiache simpatiche e le ghiandole surrenaliche potrebbero non rispondere adeguatamente ad agonisti dei α_2 AR a causa della ridotta funzione recettoriale. In particolare, in entrambi gli studi, il trattamento nei 2 mesi antecedenti il reclutamento, con farmaci β AR-bloccanti, era un criterio di esclusione.

Il presente studio dimostra che il trattamento con β -bloccanti è in grado di ripristinare la funzione dei recettori α_2 -AR nello scompenso cardiaco, e questo potrebbe determinare non soltanto la riduzione dei livelli di catecolamine circolanti, come osservato, ma anche, probabilmente un potenziale incremento dell'effetto della moxonidina nel trattamento dello scompenso cardiaco. Quindi, il trattamento con β -bloccanti associate con agonisti del α_2 AR, potrebbe essere potenzialmente riconsiderato.

Queste alterazioni molecolari/fisiologiche nelle ghiandole surrenaliche post-infarto del miocardio, sono associate ad effetti benefici sul cuore in termini di contrattilità del ventricolo sinistro e rimodellamento. In particolare, il trattamento con bisoprololo sembra prevenire l'ulteriore progressione della disfunzione cardiaca. Infatti, nei ratti HF/C abbiamo osservato una progressiva riduzione della EF% ed un aumento del diametro del ventricolo sinistro, paragonando i risultati ecocardiografici a 4 e 10 settimane post-infarto del miocardio. Dall'altro canto, il bisoprololo era in grado di fermare la progressione dello scompenso cardiaco, come documentato dagli stessi valori in EF% e diametro del ventricolo sinistro ottenuti ecocardiograficamente a 4 ed a 10 settimane dopo infarto del miocardio. Questi risultati, sono in accordo con risultati precedenti indicanti che il trattamento con β -bloccanti agisce sulla FE% e reduce il diametro del ventricolo sinistro nello scompenso cardiaco (Bristow 2000; Sabbah et al. 2004; Tevaearai et al. 2004). Inoltre, gli effetti positivi del bisoprololo, sul cuore sono evidenti anche a livello molecolare. GRK2 è normalmente sovraespressa nel cuore scompensato e riduce significativamente il signaling e la funzione dei β AR cardiaci (Petrofski and Koch 2003; Rengo et al. 2011). Infatti, abbiamo riscontrato una marcata overespressione di GRK2 nei cuori di ratti non trattati dopo infarto del miocardio, mentre i ratti trattati con bisoprololo mostravano un ripristino dei livelli di GRK2 cardiaca. La normalizzazione di tali livelli rappresenta un'ulteriore evidenza molecolare aggiuntiva per il miglioramento della funzione cardiaca indotta dai β -bloccanti in HF (Petrofski and Koch 2003; Rengo et al. 2009). Di sicuro, non possiamo discriminare tra gli effetti benefici del bisoprololo ottenuti attraverso il blocco diretto dei β AR nel cuore e, l'effetto indiretto legato

alla riduzione dei livelli di CA circolanti. Questi risultati sono in linea con precedenti osservazioni ottenute dal nostro gruppo in HF (Rengo et al. 2009; Pleger et al. 2007) e nell'invecchiamento (Leosco et al. 2007) e da altri autori in modelli di ipertensione (Eckhart et al. 2002). In fine, i marcatori di rimodellamento negativo erano normalizzati dal trattamento con bisoprololo come BNP, TGF- β 1, e Col-1 nei ratti con HF.

In conclusione, il presente studio suggerisce un nuovo meccanismo molecolare alla base degli effetti benefici del trattamento con β -bloccanti sul contrastare la disregolazione autonoma che aggrava lo scompenso cardiaco cronico. In aggiunta, questo studio supporta i nostri precedenti risultati che mostrano come l'over-espressione della proteina GRK2 nella midollare del surrene sia un meccanismo patogenetico importante alla base dell'ipertono simpatico nello scompenso cardiaco, e la sua riduzione/inibizione rappresenta una nuova strategia terapeutica simpatolitica per lo scompenso cardiaco.

BIBLIOGRAFIA

1. Andersson B, Hamm C, Persson S, Wikström G, Sinagra G, Hjalmarson A, et al. (1994). Improved exercise hemodynamic status in dilated cardiomyopathy after beta-adrenergic blockade treatment. *J Am Coll Cardiol* 23:1397-1404.
2. Blanchet M, Ducharme A, Racine N, Rouleau JL, Tardif JC, Juneau M, et al (2003). Effects of cold exposure on submaximal exercise performance and adrenergic activation in patients with congestive heart failure and the effects of beta-adrenergic blockade (carvedilol or metoprolol). *Am J Cardiol* 92:548-553.
3. Bristow MR (2000). Mechanistic and clinical rationales for using beta-blockers in heart failure. *J Card Fail* 6:8-14.
4. Bristow MR (2000). β -Adrenergic Receptor Blockade in Chronic Heart Failure. *Circulation* 101:558-569
5. Eckhart AD, Ozaki T, Tevæarai H, Rockman HA, Koch WJ (2002). Vascular-targeted overexpression of G protein-coupled receptor kinase-2 in transgenic mice attenuates beta-adrenergic receptor signaling and increases resting blood pressure. *Mol Pharmacol* 61:749-758.
6. Feldman DS, Carnes CA, Abraham WT, Bristow MR (2005). Mechanisms of disease: β -adrenergic receptors in signal transduction and pharmacogenomics in heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2:475-483.
7. Foody JM, Farrell MH, Krumholz HM (2002). beta-Blocker therapy in heart failure: scientific review. *JAMA* 287:883-889.
8. Foucart S, Nadeau R, de Champlain J (1988). Local modulation of adrenal catecholamines release by beta-2 adrenoceptors in the anaesthetized dog. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 337:29-34.

9. Foucart S, de Champlain J, Nadeau R (1991). Modulation by beta-adrenoceptors and angiotensin II receptors of splanchnic nerve evoked catecholamine release from the adrenal medulla. *Can J Physiol Pharmacol* 69:1-7.
10. Goldsmith SR (2004). Interactions between the sympathetic nervous system and the RAAS in heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 1:45-50.
11. Iaccarino G, Barbato E, Cipolletta E, De Amicis V, Margulies KB, Leosco D, et al. (2005). Elevated myocardial and lymphocyte GRK2 expression and activity in human heart failure. *Eur Heart J* 26:1752-1758
12. Lamba S, Abraham WT (2000). Alterations in adrenergic receptor signaling in heart failure. *Heart Fail Rev* 5:7-16.
13. Lee CS, Tkacs NC (2008). Current concepts of neurohormonal activation in heart failure: mediators and mechanisms. *AACN Adv Crit Care*;19:364-385;
14. Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, Filippelli A, Lympelopoulos A, Zincarelli C, et al. (2007). Exercise training and beta-blocker treatment ameliorate age-dependent impairment of beta-adrenergic receptor signaling and enhance cardiac responsiveness to adrenergic stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H1596-1603.
15. Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, Golino L, Marchese M, Fortunato F, et al. (2008). Exercise promotes angiogenesis and improves beta-adrenergic receptor signaling in the post-ischaemic failing rat heart. *Cardiovasc Res* 78:385-394.
16. Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, et al (2002). Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 347:1397-1402.
17. Lympelopoulos A, Rengo G, Koch WJ (2007). Adrenal adrenoceptors in heart failure: fine-tuning cardiac stimulation. *Trends Mol Med* 13:503-11.

18. Lympelopoulos A, Rengo G, Funakoshi H, Eckhart AD, Koch WJ. (2007) Adrenal GRK2 upregulation mediates sympathetic overdrive in heart failure. *Nat Med* 13:315-323.
19. Lympelopoulos A, Rengo G, Zincarelli C, Soltys S, Koch WJ (2008). Modulation of adrenal catecholamine secretion by in vivo gene transfer and manipulation of G protein-coupled receptor kinase-2 activity. *Mol Ther* 16:302-307.
20. Lympelopoulos A, Rengo G, Gao E, Ebert SN, Dorn GW 2nd, Koch WJ (2010). Reduction of sympathetic activity via adrenal-targeted GRK2 gene deletion attenuates heart failure progression and improves cardiac function after myocardial infarction. *J Biol Chem* 285:16378-16386.
21. Nemanich JW, Veith RC, Abrass IB, Stratton JR (1990). Effects of metoprolol on rest and exercise cardiac function and plasma catecholamines in chronic congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 66:843-848.
22. Petrofski JP, Koch WJ (2003). The β -adrenergic receptor kinase (β ARK1) in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 35:1167-1174.
23. Pleger ST, Most P, Boucher M, Soltys S, Chuprun JK, Pleger W, et al. (2007). Stable myocardial-specific AAV6-S100A1 gene therapy results in chronic functional heart failure rescue. *Circulation* 115:2506-2515.
24. Raake PW, Vinge LE, Gao E, Boucher M, Rengo G, Chen X, et al. (2008). G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure. *Circ Res* 103:413-422.
25. Rengo G, Lympelopoulos A, Zincarelli C, Donniacuo M, Soltys S, Rabinowitz JE, et al. (2009). Myocardial adeno-associated virus serotype 6-betaARKct gene therapy

improves cardiac function and normalizes the neurohormonal axis in chronic heart failure. *Circulation* 119:89-98.

26. Rengo G, Leosco D, Zincarelli C, Marchese M, Corbi G, Liccardo D, et al. (2010). Adrenal GRK2 lowering is an underlying mechanism for the beneficial sympathetic effects of exercise training in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298:H2032-H2038.
27. Rengo G, Lympelopoulou A, Leosco D, Koch WJ (2011). GRK2 as a novel gene therapy target in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 50:785-792.
28. Sabbah HN (2004). Biologic rationale for the use of beta-blockers in the treatment of heart failure. *Heart Fail Rev* 9:91-97.
29. Santostasi G, Fraccarollo D, Dorigo P, Egloff C, Miraglia G, Marinato PG, et al (1998). Early reduction in plasma norepinephrine during beta-blocking therapy with metoprolol in chronic heart failure. *J Card Fail* 4:177-184.
30. Swedberg K, Bergh CH, Dickstein K, McNay J, Steinberg M (2000). The effects of moxonidine, a novel imidazoline, on plasma norepinephrine in patients with congestive heart failure. Moxonidine Investigators. *J Am Coll Cardiol* 35:398-404.
31. Swedberg K, Bristow MR, Cohn JN, Dargie H, Straub M, Wiltse C, et al. (2002). Moxonidine Safety and Efficacy (MOXSE) Investigators. Effects of sustained-release moxonidine, an imidazoline agonist, on plasma norepinephrine in patients with chronic heart failure. *Circulation* 105:1797-1803.
32. Tevaearai HT, Koch WJ (2004). Molecular restoration of beta-adrenergic receptor signaling improves contractile function of failing hearts. *Trends Cardiovasc Med* 14:252-256.

33. The RESOLVD Investigators. Effects of Metoprolol CR in Patients With Ischemic and Dilated Cardiomyopathy (2000). The Randomized Evaluation of Strategies for Left Ventricular Dysfunction Pilot Study. *Circulation* 101:378-384
34. Tilley DG, Rockman HA (2006). Role of β -adrenergic receptor signaling and desensitization in heart failure: new concepts and prospects for treatment. *Exp Rev Cardiovasc Ther* 4:417-432.
35. Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J (2009). The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 54:1747-1762.
36. Watanabe K, Ohta Y, Inoue M, Ma M, Wahed MI, Nakazawa M, et al. (2001). Bisoprolol improves survival in rats with heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 38:S55-S58.
37. Yoshikawa T, Handa S, Anzai T, Nishimura H, Baba A, Akaishi M, et al. (1996). Early reduction of neurohumoral factors plays a key role in mediating the efficacy of beta-blocker therapy for congestive heart failure. *Am Heart J* 131:329-336.
38. Zhu W, Zeng X, Zheng M, Xiao RP (2005). The Enigma of β_2 Adrenergic Receptor Gi Signaling in the Heart. The Good, the Bad, and the Ugly. *Circ Res* 97:507-509.

Table: Physical and echocardiographic data in sham-operated and HF rats at 10 the end of the study period.

	Sham-operated	HF/control	HF/Bisoprolol
Physical data			
BW (Kg)	0.463±0.014	0.446±0.010	0.470±0.013
HW (g)	1.15±0.04	1.40±0.02*	1.28±0.04*†
HW/BW (g/kg)	2.50±0.08	3.14±0.12*	2.73±0.09*†
Echocardiography			
HR (bpm)	333.9±11.1	332.4±4.66	287.5±7.28&
LV EF (%)	67.1±0.9	26.3±1.2*	35.5±1.7*†
LVIDd (mm)	8.27±0.17	10.95±0.13*	9.97±0.15*†
LVIDs (mm)	5.14±0.16	9.51±0.16*	8.18±0.20*†
LVAWDd (mm)	1.72±0.03	1.46±0.05*	1.45±0.06*
LVPWDd (mm)	1.68±0.06	2.02±0.06*	2.17±0.08*†
Infarct size (%)	-	44.8±3.7	45.2±4.3

BW= body weight, HW= heart weight, HR= heart rate, LV= left ventricle, LV EF= LV ejection fraction, LVIDd= LV internal diameter at diastole, LVIDs= LVID at systole, LVAWDd= LV anterior wall diameter at diastole, LVPWDd= LV posterior wall diameter at diastole.

ANOVA analysis and Bonferroni test were used between all 3 groups. Data are presented as mean±SEM. * P <0.05 vs Sham; † P <0.05 vs HF/control, & P <0.05 vs Sham and HF/control.

LEGENDA ALLE FIGURE:

Fig. 1: EF misurata attraverso ecocardiografia a 4 settimane post-MI (prima dell'inizio del trattamento) (A) ed alla fine del periodo di studio, 10 settimane dopo il trattamento con bisoprololo o placebo (B). C, Percentuale di modifica della EF dopo 10 settimane di trattamento. Diametro telediastolico del ventricolo sinistro (LVIDd) misurato ecocardiograficamente prima (D) e dopo il trattamento (E). F, frequenza cardiaca (HR) a 14 settimane dopo MI. Sham, n=12; HF/C, n=18; HF/B, n=20. I dati sono mostrati come media±ES. * $P < 0.05$ vs sham; # $P < 0.05$ vs HF/C; & $P < 0.05$ vs sham and HF/C. Analisi ANOVA e test Bonferroni tra tutti i gruppi.

Fig. 2: Livelli cardiac di mRNA di (A) peptide natriuretico cerebrale (BNP); (B) collagene tipo I (Col1); (C) fattore di crescita trasformante $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) in tutti i gruppi di esperimento alla fine del periodo di studio (Sham n=10, HF/C n=12; HF/B n=12). Tutti i valori sono stati standardizzati alla 28S rRNA. * $P < 0.05$ vs Sham o gruppo HF/B. Analisi ANOVA e test Bonferroni tra tutti i gruppi. I dati sono presentati come media±ES ed espressi come incremento rispetto ai valori degli sham.

Fig. 3: livelli plasmatici di norepinefrina ed epinefrina nei tre gruppi sperimentali alla fine dello studio. I dati sono mostrati come media±ES. * $P < 0.05$ vs Sham o HF/B (n=10 per ogni gruppo). Analisi ANOVA e test Bonferroni fra tutti i gruppi.

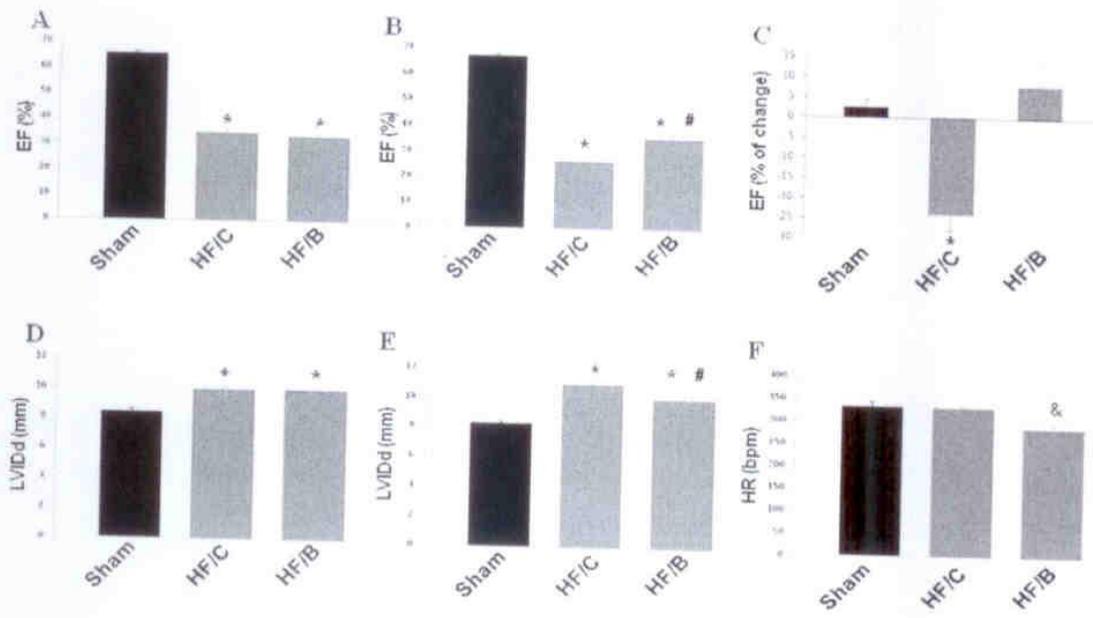
Fig. 4: (A) espressione di GRK2 in omogenati di ghiandole surrenaliche ottenute dai tre gruppi di studi alla fine del periodo (n=7 for each group). (**pannello superiore**) Western blots rappresentativo e (**pannello inferiore**) analisi quantitativa della media densitometrica dai blots mostrante il rapporto di GRK2 con GAPDH. + = controllo positivo. (B) Densità totale dei α_2 AR in membrane plasmatiche purificate dalle ghiandole surrenaliche dei tre gruppi sperimentali alla fine dello studio (n=6 per ogni gruppo). * $P < 0.05$ vs Sham o HF/B;

$P < 0.05$ vs HF/C. I dati sono mostrati come $\text{media} \pm \text{ES}$. Analisi ANOVA e test Bonferroni fra tutti i gruppi.

Fig. 5: secrezione di epinefrina *In vitro* da parte delle cellule cromaffini isolate dalle ghiandole surrenaliche di ratti sham, HF/C e HF/B a seguito del trattamento con $20 \mu\text{mol/l}$ di nicotina, dopo pretrattamento con Nicotina o con $10 \mu\text{mol/l}$ UK14304 (UK+Nicotina). * $P < 0.05$, rispetto a HF/C-UK+Nicotina, $n = 6$. I dati sono mostrati come $\text{media} \pm \text{ES}$. Analisi ANOVA e test Bonferroni fra tutti i gruppi.

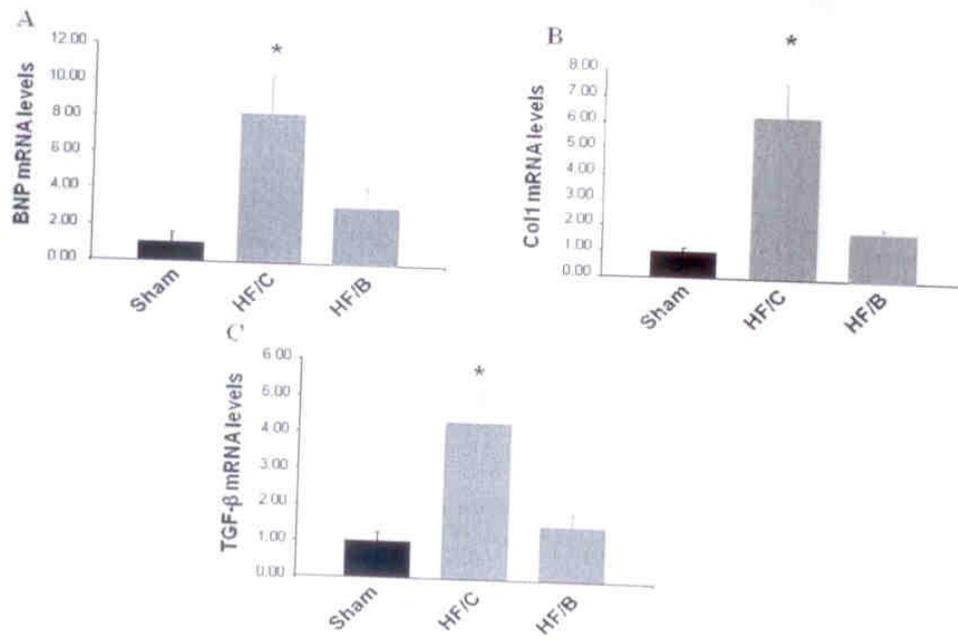
Fig. 6: pannello superiore western blot rappresentativo che mostra l'espressione dei transgeni nelle cellule cromaffini. **Pannello inferiore** secrezione di epinefrina *in vitro* da parte delle cellule cromaffini isolate dalle ghiandole surrenaliche di ratti HF/B infettati *in vivo* con AdGFP o AdGRK2 in risposta al trattamento con nicotina con o senza il pretrattamento con UK14304 (UK+Nicotina). * $P < 0.05$, rispetto a AdGRK2-UK+Nicotina, $n = 6$. I dati sono mostrati come $\text{media} \pm \text{ES}$. Analisi ANOVA e test Bonferroni fra tutti i gruppi.

Fig. 1



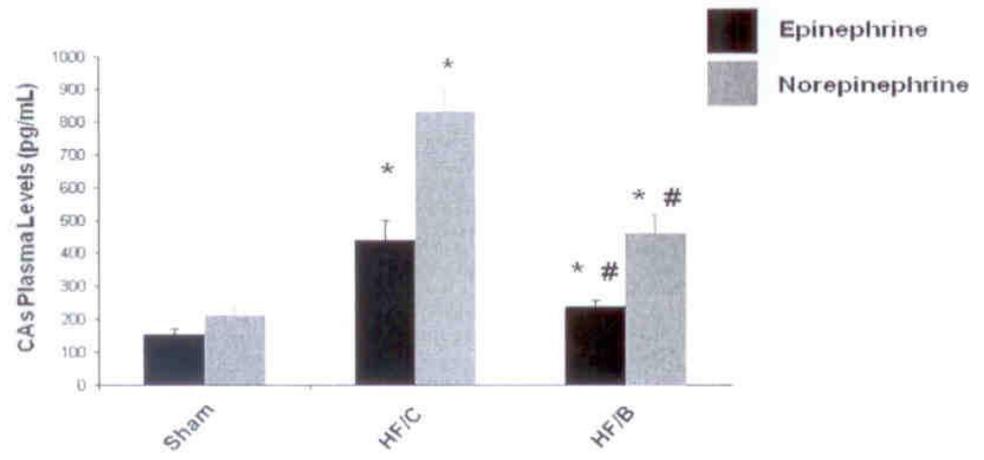
254x190mm (96 x 96 DPI)

Fig. 2



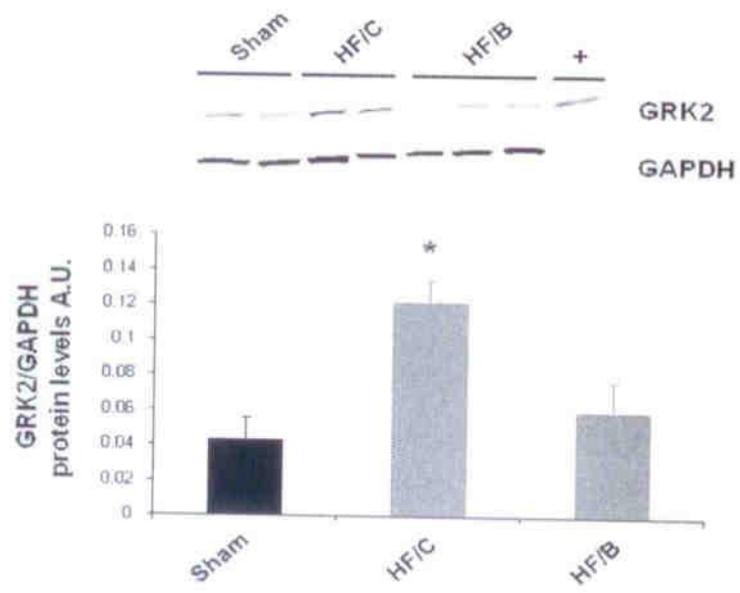
254x190mm (96 x 96 DPI)

Fig. 3



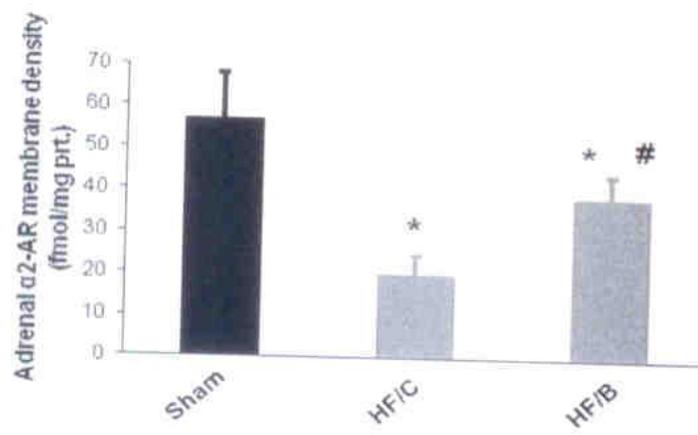
254x190mm (96 x 96 DPI)

Fig. 4A



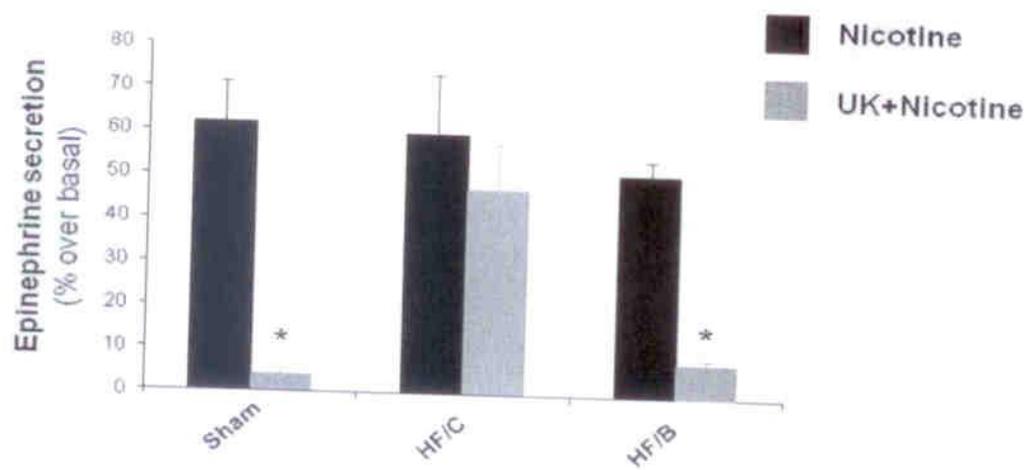
254x190mm (96 x 96 DPI)

Fig. 4B



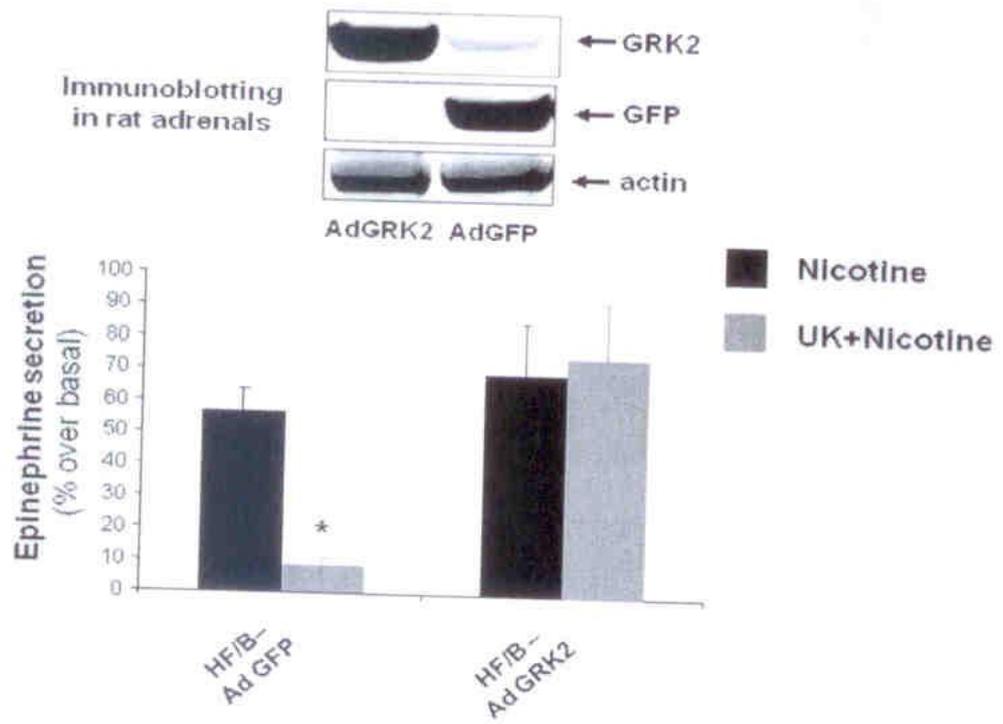
254x190mm (96 x 96 DPI)

Fig. 5



254x190mm (96 x 96 DPI)

Fig. 6



254x190mm (96 x 96 DPI)