



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA in Scienze Mediche Cliniche e Sperimentali

INDIRIZZO: Reumatologia Clinica e Sperimentale

CICLO XX

**Il ruolo delle HDL
nel controllo dell'inflammazione sinoviale**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Silvano Todesco

Supervisore: Ch.mo Prof. Leonardo Punzi

Dottorando: Dott.ssa Anna Scanu

31 Gennaio 2008

INDICE

| | Pagina |
|--|--------|
| RIASSUNTO..... | 1 |
| SUMMARY..... | 3 |
| INTRODUZIONE | |
| Il processo infiammatorio..... | 5 |
| L'infiammazione da microcristalli..... | 6 |
| Le microparticelle nell'infiammazione..... | 12 |
| Il controllo della risposta infiammatoria..... | 14 |
| SCOPO DELLA TESI..... | 17 |
| MATERIALI E METODI..... | 18 |
| RISULTATI..... | 23 |
| DISCUSSIONE..... | 38 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 41 |

RIASSUNTO

Recenti studi hanno messo in evidenza che le apolipoproteine (apo) svolgono un ruolo importante nel controllo dell'infiammazione. È stato dimostrato che le lipoproteine ad alta densità (HDL) sono in grado di bloccare il contatto cellulare linfocita T attivato – monociti inibendo il rilascio di IL-1 β e TNF α .

Scopo dello studio: Studiare gli effetti delle HDL sul rilascio di MCP-1 da parte di sinoviociti stimolati con cristalli di urato monosodico (UMS) e di IL-1 β , TNF α e IL-1Ra da parte di monociti stimolati con microparticelle (MP).

Materiali e metodi: Sinoviociti ottenuti da membrane sinoviali di pazienti affetti da artrosi sono stati stimolati in coltura con cristalli di UMS (0,01-0,25 mg/ml) in presenza o assenza di HDL (50-100 μ g/ml).

Le MP sono state isolate da linfociti T umani e HUT-78 non stimolati o attivati con forbolo miristato acetato (PMA) (5 ng/ml) e fitoemagglutinina (PHA) (1 μ g/ml) per 48 e 6 h rispettivamente e quantificate attraverso la determinazione della concentrazione delle proteine totali. L'origine cellulare delle MP è stata determinata mediante immunocitofluorimetria. Monociti isolati da sangue umano sono stati stimolati per 48 h in presenza delle MP da linfociti T alle concentrazioni di 13,3 μ g/ml e 26,6 μ g/ml. Le MP da HUT-78 sono state utilizzate a concentrazioni da 1,5 a 6 μ g/ml in presenza o assenza di HDL (0,2 mg/ml).

Le HDL sono state purificate da sangue periferico di volontari sani attraverso ultracentrifugazione.

MCP-1 è stata determinata nelle cellule mediante western blotting e microscopia confocale.

Le concentrazioni di IL-1 β , IL-1Ra, TNF α e MCP-1 sono state determinate nei supernatanti di coltura mediante ELISA.

Risultati: La microscopia confocale e il western blotting hanno evidenziato la presenza di MCP-1 in granuli citoplasmatici nei sinoviociti in condizioni cellulari basali. Dopo 24 h di stimolazione con cristalli di UMS si assiste ad una diminuzione di MCP-1 intracellulare e ad un aumento della chemochina nel supernatante di coltura. Il trattamento con HDL inibisce la liberazione di MCP-1 in maniera dose dipendente conservandone

l'immagazzinamento nei granuli. Gli stessi risultati sono stati ottenuti pretrattando le cellule con HDL un'ora prima dello stimolo con i cristalli.

Le MP isolate da linfociti T attivati inducono una produzione di IL-1 β , TNF α e IL-1Ra da parte dei monociti maggiore rispetto alle MP isolate da linfociti T non stimolati. È stato osservato che la stimolazione dei monociti con MP da HUT-78 attivate induce il rilascio di IL-1 β , TNF α e IL-1Ra in maniera dose-dipendente. Il trattamento dei monociti con HDL riporta i valori di IL-1 β e TNF α a livelli basali, mentre non modifica quelli di IL-1Ra.

Conclusioni: Il pretrattamento delle cellule con le HDL mette in evidenza come l'attività inibitoria non sia legata all'adsorbimento delle lipoproteine sulla superficie dei cristalli bensì ad una loro azione diretta sui sinoviociti. Inibendo il rilascio di MCP-1 le HDL possono essere coinvolte nella limitazione del processo flogistico.

La produzione di citochine dipende dal grado di attivazione delle cellule dalle quali le MP vengono isolate. L'inibizione quasi completa dei livelli di IL-1 β e TNF α da parte delle HDL ci permette di ipotizzare un meccanismo di inibizione da contatto tra MP attivate e HDL come dimostrato per il sistema monoliti - linfociti T attivati.

SUMMARY

Recent reports suggest that apolipoproteins (apo) exert an important role in controlling inflammation. It has been demonstrated that high density lipoprotein (HDL) are able to block the contact-mediated activation of monocytes-macrophages by stimulated T lymphocytes and inhibit the production of IL-1 β and TNF α .

Aim of the thesis: To investigate the effects of HDL on MCP-1 release from monosodium urate crystals-stimulated synoviocytes and IL-1 β , TNF α and IL-1Ra release from microparticles-stimulated monocytes.

Methods: Human synoviocytes were obtained by synovial tissue explants from patients with osteoarthritis and stimulated with monosodium urate (MSU) crystals (0.01-0.25 mg/ml) in the presence or absence of human HDL (50 e 100 μ g/ml).

Microparticles (MP) were isolated by ultracentrifugation from T lymphocytes and HUT-78 cultures stimulated with phorbol myristate acetate (PMA) (5 ng/ml) and phytohemagglutinin (PHA) (1 μ g/ml) for 48 and 6 h respectively. The cellular origin of MP was determined by flow cytometry. Human monocytes were activated for 48 h by MP from T lymphocytes at concentrations of 13.3 μ g/ml and 26.6 μ g/ml. HUT-78-derived MP were used at a concentration of 1.5-6 μ g/ml in the presence or absence of human HDL (0.2 mg/ml).

HDL were isolated from peripheral blood of healthy volunteers by ultracentrifugation.

MCP-1 was determined in cultured cells by western blotting and confocal microscopy, while the production of IL-1 β , TNF α and IL-1Ra was measured in culture supernatants by ELISA.

Results: Confocal microscopy and western blotting analysis revealed that MCP-1 resides in small cytoplasmatic granules on non stimulated cells. The exposure of synoviocytes to MSU crystals leads to a decrease of intracellular levels of the protein and an increase of extracellular chemokine concentration. The treatment of synoviocytes with HDL causes a dose-dependent inhibition of the release of MCP-1 which maintains its storage in granules. The same effect was observed pre-incubating cells with HDL 1 h before crystal activation.

MP generated by stimulated T cells induce a production of IL-1 β , TNF α and IL-1Ra in monocyte cultures higher than those obtained by MP from unstimulated T lymphocytes. It

has also been observed that monocytes stimulated with MP generated by activated HUT-78 release IL-1 β , TNF α and IL-1Ra in a dose-dependent manner. The treatment with HDL inhibits IL-1 β and TNF α levels, whereas the production of IL-1Ra remains unchanged.

Conclusion: The inhibitory activity of HDL highlighted by the pre-treatment of cells is probably due to a direct action of lipoproteins on synoviocytes rather than to their adsorption on the surface of the crystals. By inhibiting MCP-1 release, HDL may limit the inflammatory process.

The production of cytokines depends on the activation level of cells from which MP take origin.

The almost complete inhibition of IL-1 β and TNF α levels by HDL lead us to hypothesize that HDL control cellular contact between MP and monocytes, as already observed in the lymphocytes T - monocytes interaction.

INTRODUZIONE

Il processo infiammatorio

L'infiammazione è definita come un processo dinamico comprendente l'insieme delle modificazioni che compaiono nelle strutture vascolari e connettivali di un distretto organico, per arginare e riparare i danni prodotti da agenti lesivi di diversa natura. Il processo infiammatorio è caratterizzato fundamentalmente dal reclutamento e dall'attivazione di cellule del sistema immunitario innato e acquisito che fanno seguito alle alterazioni tessutali locali. Qualunque sia lo stimolo flogogeno la risposta infiammatoria acuta è fundamentalmente identica, generale ed aspecifica nei suoi momenti essenziali. Questa risposta è centrata sulla reazione vascolare, caratterizzata da essudazione di liquido plasmatico e di leucociti, in particolare di granulociti neutrofili. Al reclutamento iniziale di polimorfonucleati (PMN) segue quello dei monociti che, localmente, si differenziano in macrofagi. Questa risposta è amplificata da mast cellule tessutali e da macrofagi residenti, la cui degranolazione e attivazione portano al rilascio di una batteria di mediatori infiammatori tra cui ammine vasoattive, citochine, chemochine e mediatori lipidici, che a loro volta promuovono il reclutamento e l'attivazione di altre cellule infiammatorie.

L'azione di tali mediatori condiziona quattro fenomeni fondamentali dell'infiammazione acuta:

- la vasodilatazione
- l'aumento della permeabilità dei piccoli vasi
- la migrazione dei leucociti
- il comportamento delle cellule nei tessuti infiammati.

Le molecole pro-infiammatorie rilasciate agiscono in modo sinergico con un'attività spesso ridondante e giocano un ruolo importante nell'orchestrare la risposta flogistica (1).

Tale risposta è caratterizzata dall'attivazione coordinata di varie vie di segnale che regolano l'espressione di mediatori sia pro- che anti-infiammatori nelle cellule residenti e nei leucociti reclutati. Le più note e le più studiate sono quelle mediate dai recettori

dell'interleuchina-1 (IL-1) e del tumor necrosis factor (TNF), e dai "toll-like receptors" (TLR) che appartengono alla famiglia dei recettori dell'IL-1. L'IL-1 β e il TNF α rappresentano l'archetipo delle citochine pro-infiammatorie rapidamente rilasciate dopo lesioni tessutali o infezioni. I TLR riconoscono specifici pattern molecolari microbici ma possono essere attivati anche da ligandi endogeni in assenza di infezioni (2).

In generale il legame a questi recettori porta al reclutamento di proteine adattatrici specifiche e in un secondo momento di proteine di segnale e di varie proteine chinasi (3,4). Queste molecole attivano diverse vie effettrici, la più importante delle quali porta all'attivazione delle MAP (5) e delle I κ B chinasi (6) con conseguente fosforilazione di diversi fattori di trascrizione come NF- κ B e AP-1 (7) che si legano ai promotori dei geni dell'IL-1 e del TNF α . Un'altra via di segnale mediata dai recettori delle citochine coinvolge l'attivazione della fosfoinositolo 3-chinasi (8). Complessivamente tutte queste proteine coordinano l'espressione di un ampio numero di sostanze pro-infiammatorie che iniziano e amplificano la risposta infiammatoria.

L'infiammazione da microcristalli

Una delle più intense reazioni flogistiche che si conoscano é rappresentata dall'infiammazione da microcristalli. La formazione di cristalli all'interno della cavità articolare causa infatti un abbondante accumulo di leucociti polimorfonucleati e la liberazione di numerosi mediatori pro-infiammatori (9).

I cristalli più noti e più flogogeni sono quelli di urato monosodico (UMS) responsabili della gotta. I cristalli di calcio, come quelli di pirofosfato (PFCD) e di fosfato basico (BCP), nonostante siano presenti in un'elevata percentuale di LS di pazienti con artrosi, hanno un ruolo controverso e il loro significato diagnostico e prognostico non è ancora chiaro.

Nonostante gli effetti cellulari dei cristalli di UMS siano noti, i meccanismi attraverso i quali essi evocano la risposta infiammatoria non sono del tutto chiari. Una delle ipotesi si basa sulla formazione dei fagolisosomi (10).

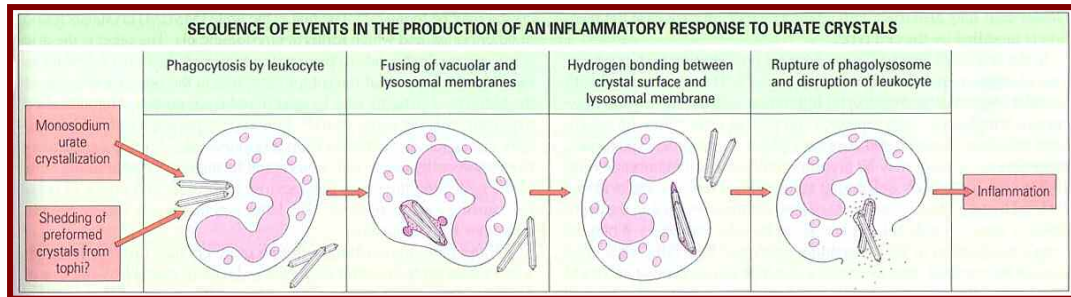


Figura 1. Sequenza degli eventi che portano alla formazione del fagolisosoma e che precedono l'infiammazione da microcristalli (11).

Quando i cristalli precipitano per eccesso di soluto, o si staccano da depositi preformati, vengono rivestiti da molecole polipeptidiche o proteiche, in particolare IgG che ne facilitano la fagocitosi. Il riconoscimento di queste proteine da parte di specifici recettori di superficie nelle cellule polimorfonucleate, porta alla formazione del fagosoma intracellulare che per fusione con i lisosomi e successiva rottura, scatena la reazione infiammatoria (Fig. 1) (11). L'adsorbimento proteico non è però una tappa indispensabile per l'attivazione cellulare, in quanto i cristalli sono in grado di interagire direttamente con le membrane cellulari.

La risposta infiammatoria successiva alla fagocitosi include l'attivazione delle vie del complemento, l'attivazione del fattore di Hageman, la lisi di neutrofili e lisosomi, la risposta secretoria dei neutrofili, la degranolazione delle mast-cellule e la sintesi di interleuchine proinfiammatorie da parte di monociti e sinoviociti.

Durante un attacco acuto numerosi neutrofili vengono reclutati nell'articolazione attraverso l'interazione con l'endotelio attivato (Fig. 2). L'infiltrato viene sostenuto ulteriormente dalla sintesi locale di fattori chemotattici quali IL-8, MCP-1, C5a e le proteine mieloidi S100A8 e S100A9 (12,13). Le cellule mononucleate d'altra parte producono mediatori solubili come citochine e chemochine in modo dipendente dalla concentrazione dei cristalli (14).

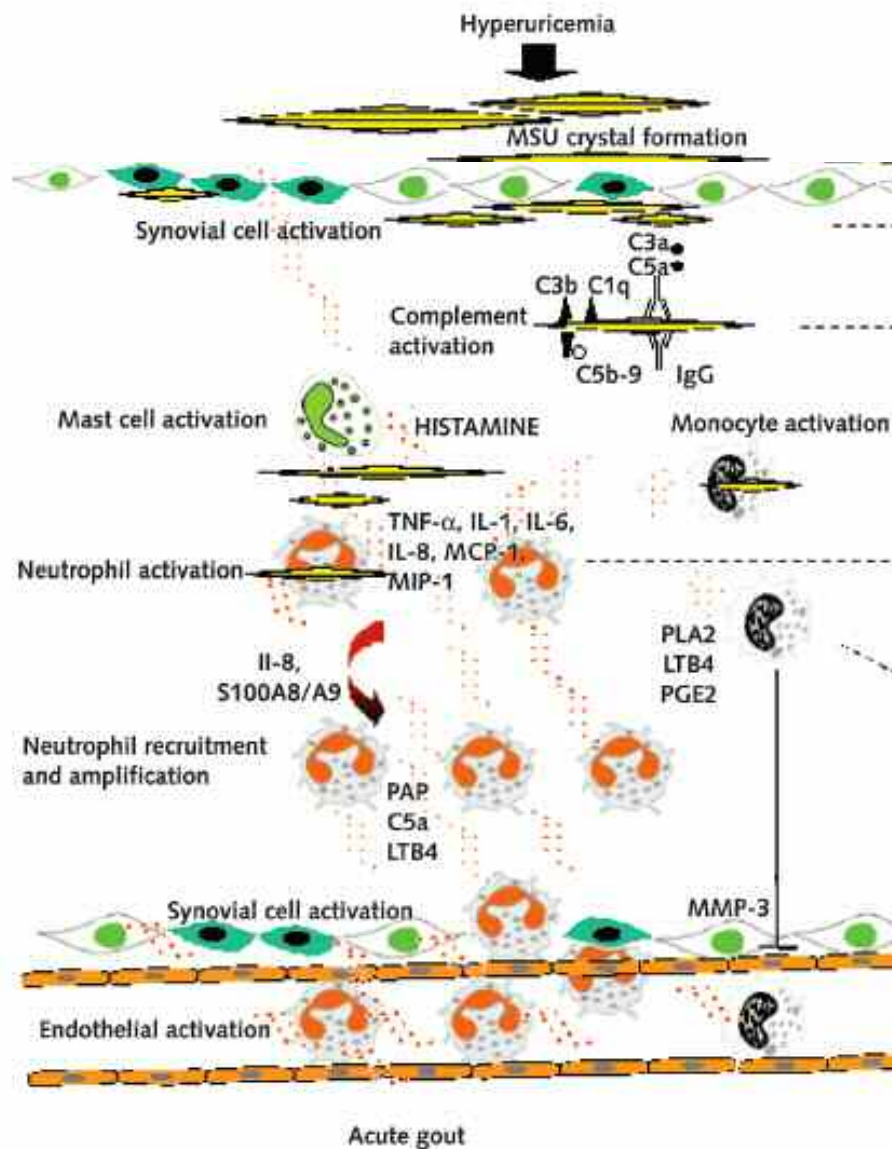


Figura 2. Schema dell'attivazione cellulare indotta dai cristalli di urato monosodico.

Le vie di segnale attivate dai cristalli sono state ampiamente caratterizzate in diversi tipi cellulari (15) ma solo recentemente sono stati messi in luce alcuni meccanismi a monte della cascata infiammatoria. In particolare è stato dimostrato come l'immunità innata sia coinvolta negli eventi iniziali dell'infiammazione da microcristalli e che quindi possa giocare un ruolo chiave nella patogenesi delle malattie ad essa correlate.

I primi ad ipotizzare un ruolo dell'immunità innata nell'infiammazione da microcristalli sono stati Shi e coll. i quali osservarono che l'acido urico rilasciato dalle cellule

danneggiate durante i processi metabolici forma cristalli di UMS ed è in grado di mettere in allarme il sistema immunitario inducendo la maturazione delle cellule dendritiche, promuovendo la presentazione dell'antigene, e stimolando i linfociti T. Secondo gli autori i cristalli possono essere considerati degli “adiuvanti” esogeni in grado di attivare in modo diretto la risposta immunitaria (16).

Qualche anno più tardi, Liu-Bryan e coll. hanno dimostrato per la prima volta che i cristalli di UMS e PFCd sono in grado di interagire con i recettori dell'immunità innata toll-like receptor (TLR) 2 nei condrociti inducendo rapidamente l'assemblaggio di ligandi intracellulari (Rac1, PI3K, MyD88) e portando all'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B (17) e alla sintesi di ossido nitrico (Fig. 3).

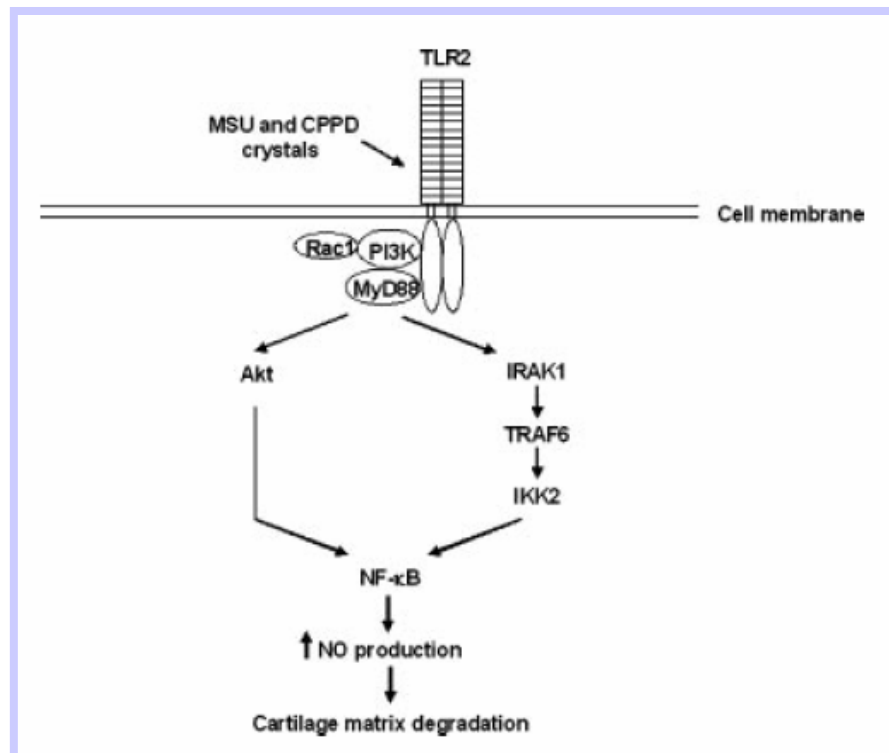


Figura 3. Meccanismo proposto da Liu-Bryan e coll. (17) secondo il quale i cristalli di UMS e PFCd interagiscono con i recettori TLR2 nell'induzione del segnale infiammatorio.

Secondo uno studio successivo condotto in un modello sperimentale di infiammazione da microcristalli, i TLR non sono indispensabili per la risposta da cristalli di UMS che viene invece abolita in topi geneticamente difettosi per la proteina adattatrice MyD88. Nasce l'ipotesi che l'infiammazione indotta da cristalli di UMS sia mediata dal recettore dell'IL-1 (IL-1R) che trasmette via MyD88 e che sia responsabile dell'amplificazione del processo infiammatorio (18).

La prova definitiva che l'immunità innata e l'IL-1 β sono direttamente coinvolte nell'infiammazione da microcristalli viene fornita da Martinon e coll. con la dimostrazione che i cristalli di UMS sono in grado di attivare l'inflammasoma NALP3, complesso costituito da recettori intracellulari dell'immunità innata chiamati NOD-like receptor (NLR) (Fig. 4) (19). La successiva attivazione della caspasi-1, la maturazione del precursore dell'IL-1 β e la secrezione della citochina nello spazio extracellulare, innescano poi il processo infiammatorio attraverso la via di segnale IL-1R/MyD88. Gli autori propongono un modello di infiammazione che avviene in due fasi:

- 1- L'attivazione dell'inflammasoma da parte dei cristalli fagocitati da monociti con il successivo rilascio di IL-1 β .
- 2- L'attivazione del complesso recettoriale IL-1R/MyD88 in altri tipi cellulari, quali i sinoviociti (18), che porta alla produzione di chemochine e mediatori pro-infiammatori e all'accumulo di neutrofili nell'articolazione, evento primario di questo tipo di infiammazione.

La scoperta di questi nuovi meccanismi molecolari non solo chiarisce la patogenesi delle artriti da microcristalli ma permette di prendere in considerazione nuove strategie terapeutiche basate principalmente sull'inibizione del segnale dell'IL-1 β (20).

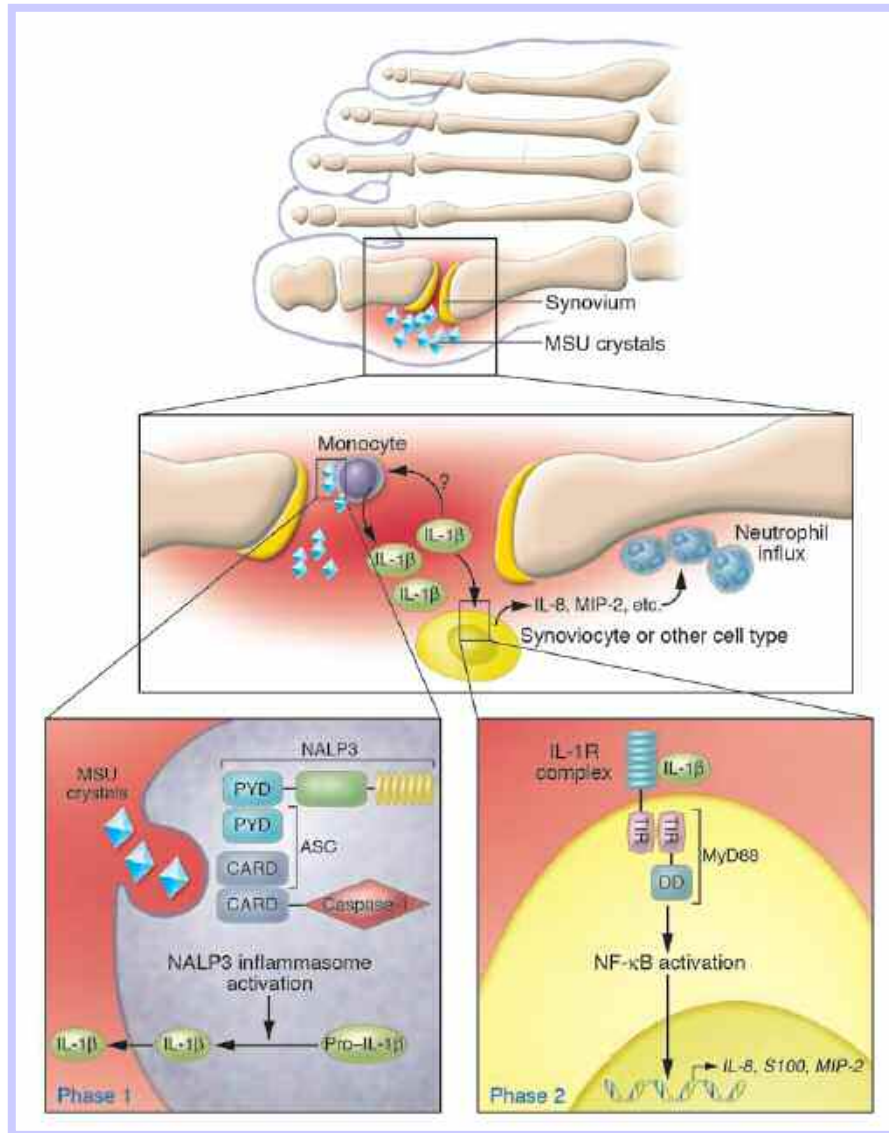


Figura 4. Fasi sequenziali che portano all'attivazione dell'infiammasoma NALP3 da parte dei cristalli di UMS (19).

Le microparticelle nell'inflammatione

Le microparticelle (MP) sono piccole vescicole liberate dalla superficie di membrana di diversi tipi di cellule in condizioni sia fisiologiche che patologiche. Nel sangue le MP originano dalle piastrine mentre in altri fluidi organici si possono trovare elevate quantità di MP derivate anche da macrofagi, linfociti, monociti, neutrofili, eritrociti, cellule endoteliali, cellule epiteliali e linee cellulari tumorali (21). Sia la stimolazione che la morte cellulare, in particolare l'apoptosi, aumentano la liberazione di MP. L'esatto meccanismo di questo processo rimane ancora sconosciuto, ma è stato osservato che durante l'attivazione cellulare si assiste ad un aumento della concentrazione del Ca^{2+} intracellulare (22) e alla riorganizzazione del citoscheletro (23) seguiti dal rimodellamento della membrana plasmatica e dalla formazione di "bleb" (vescicole) (Fig. 5).

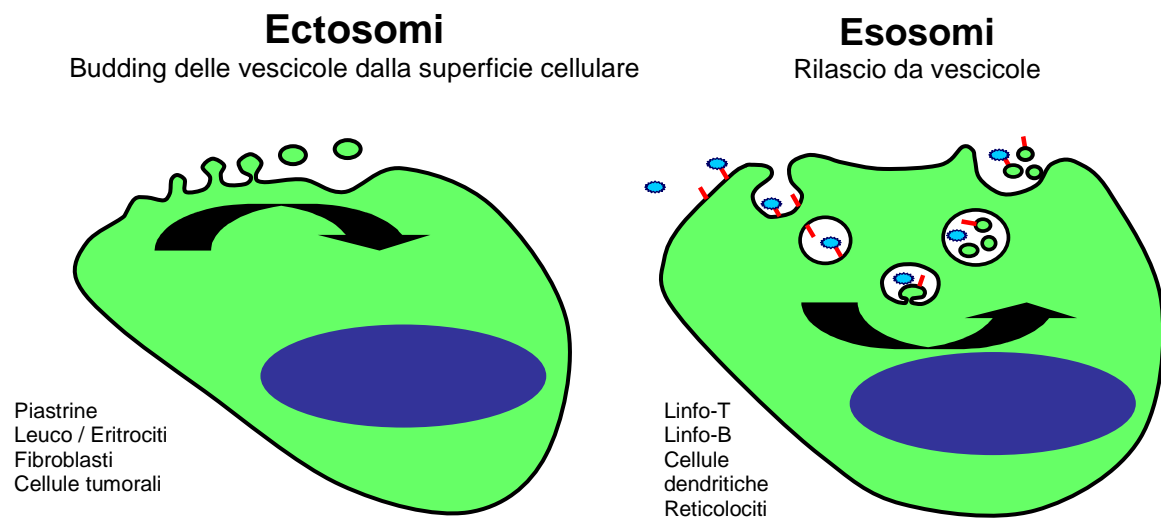


Figura 5. Modello della formazione delle microparticelle proposto da Gasser secondo il quale esse derivano dal budding di vescicole dalla superficie cellulare. Si differenziano dagli esosomi in quanto questi ultimi sono rilasciati da vescicole preformate (28).

Il "blebbing" e la regolazione della distribuzione asimmetrica dei fosfolipidi di membrana coinvolgono alcuni enzimi, come l'amminofosfolipid-translocasi o la flippasi, responsabili del mantenimento dell'asimmetria della membrana cellulare. Nelle cellule non stimolate questi enzimi distribuiscono i fosfolipidi privi di carica come la fosfatidilcolina e la

sfingomielina nel lato esterno del bilayer, mentre quelli carichi negativamente come la fosfatidilserina e la fosfatidiletanolamina, nel lato interno (24). Quando la concentrazione di calcio nel citosol aumenta, questo stato stazionario viene modificato e si osserva come conseguenza l'espressione della fosfatidilserina nella superficie esterna della membrana (25). La comparsa di questo fosfolipide nel lato esterno permette alle MP di legare l'annexina V, che è largamente usata per identificare e quantificare le MP. Oltre all'alterata superficie lipidica, un'altra caratteristica delle MP è quella di essere in grado di esporre componenti citoplasmatiche e elementi della superficie cellulare, tra le quali proteine, recettori e antigeni specifici delle loro cellule di origine (Fig. 6).

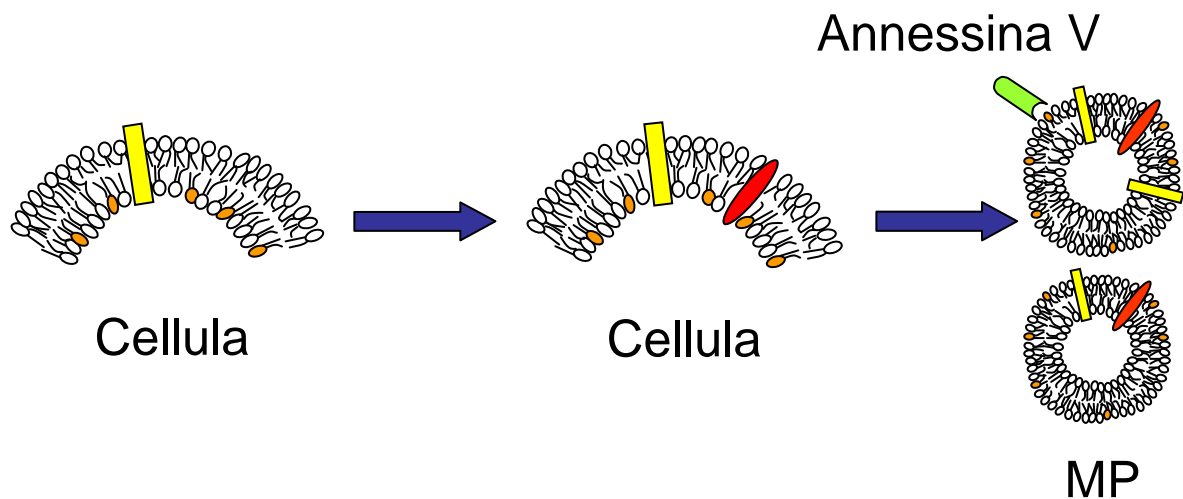


Figura 6. Esposizione dei residui di fosfatidilserina sulla superficie delle microparticelle. Queste contengono anche componenti citoplasmatiche e elementi della superficie cellulare, delle loro cellule di origine.

I meccanismi che stanno alla base della formazione delle MP e la loro eterogeneità nelle dimensioni (0,1-1 μm) e nella composizione in proteine e lipidi le differenziano da altre strutture subcellulari come i corpi apoptotici (1-4 μm) e gli esosomi (0,03-0,09 μm) (26). I corpi apoptotici sono generati nello stadio finale della morte cellulare programmata, mentre le MP in una fase preliminare (27). Gli esosomi invece sono conservati a livello

intracellulari in corpi multivescicolari e sono secreti quando questi si fondono con la membrana cellulare (28) (Fig. 5).

Grazie alle loro piccole dimensioni le MP sono in grado di circolare nel sangue ed interagire con vari tipi di cellule attraverso ligandi di superficie. In questo modo possono “mettere in comunicazione“ cellule distanti tra loro e trasferire tra di esse molecole di superficie e recettori (29,30).

Nonostante non sia chiaro se le MP siano la causa o la conseguenza del processo infiammatorio, esse possono direttamente attivare e stimolare le cellule a produrre sostanze infiammatorie. È stato dimostrato che le MP sono in grado di attivare la via classica del complemento (31), di stimolare la produzione di molecole di adesione da parte delle cellule endoteliali (32), di aumentare la secrezione di IL-1 β da parte dei monociti attivati (33), di indurre l'apoptosi dei macrofagi (34) e di indurre l'espressione di metalloproteasi nei fibroblasti sinoviali promuovendo la degradazione cartilaginea e l'erosione dell'osso (35).

Il controllo della risposta infiammatoria

Tutte le vie di segnale intracellulari che contribuiscono allo scatenamento della risposta infiammatoria sono soggette ad una regolazione negativa. In particolare, fosfatasi e proteine soppressive limitano l'attivazione di specifiche vie di segnale; tra queste le PTEN, le MAPK, le SOCS, le A20 e le IKK (36-40).

Le vie di segnale pro-infiammatorie sono in grado di indurre in parallelo l'espressione di mediatori anti-infiammatori. Molto spesso l'equilibrio tra la sintesi di mediatori pro-infiammatori e anti-infiammatori dipende dall'espressione delle proteine adattatrici, che quindi sono in grado di interferire con la risoluzione dell'infiammazione. L'assenza di questi regolatori negativi può essere responsabile dello sviluppo di un'infiammazione cronica o di una risposta infiammatoria esagerata ed aggressiva.

Nonostante i recettori e le vie di segnale che iniziano e promuovono la risposta infiammatoria siano state ben caratterizzate, poco si sa di come si risolva l'infiammazione acuta e come quella cronica venga prevenuta.

Si può affermare, in generale, che l'infiammazione termina con la neutralizzazione e la rimozione dell'agente scatenante e la riparazione del danno, seguito dall'eliminazione delle cellule infiammatorie (41).

Questa fase rappresenta un momento critico per la difesa dell'organismo e per l'omeostasi tissutale e deve essere pertanto finemente regolata. Quando infatti la reazione difensiva supera largamente le necessità locali di risposta agli insulti produce essa stessa un danno. Recentemente si è sviluppata l'idea che le malattie infiammatorie croniche siano il risultato di una mancata risoluzione della flogosi piuttosto che dell'induzione del processo infiammatorio (42). In quest'ottica un ruolo importante è svolto dalla clearance delle cellule infiammatorie da parte dei monociti-macrofagi.

L'IL-6 e il suo recettore solubile sIL-6R rappresentano lo stimolo principale responsabile della risposta macrofagica che segue quella dei PMN (43). In particolare, il complesso IL-6/sIL-6R è in grado di promuovere l'espressione delle chemochine CC (come MCP-1) e di sopprimere la sintesi delle chemochine CXC indotte dall'IL-1 e dal TNF α favorendo l'influsso di cellule mononucleate.

Un altro meccanismo coinvolto nel controllo dello switch PMN - monociti/macrofagi è rappresentato dalla famiglia delle lipossine (LX) che esercitano azioni specifiche sui leucociti quali l'inibizione della chemotassi, dell'adesione e della transmigrazione dei PMN attraverso l'endotelio (44).

È estremamente importante che l'azione dei PMN sia controllata in maniera efficiente soprattutto a causa del loro contenuto proteolitico ed ossidante. La loro apoptosi e la successiva rimozione da parte dei macrofagi permette il rilascio di molecole anti-infiammatorie come IL-10 e TGF β (45) che conducono alla risoluzione dell'infiammazione. È stato dimostrato che le molecole di adesione svolgono un ruolo importante nel promuovere la clearance finale dei macrofagi infiammatori attraverso la circolazione linfatica (46). La mancata regolazione della fagocitosi delle cellule apoptotiche può essere pertanto coinvolta nello sviluppo dell'infiammazione cronica.

Altre sostanze implicate nel controllo della mobilitazione leucocitaria sono rappresentate da alcuni fattori solubili endogeni. Tra questi i metaboliti attivi delle prostaglandine PGD₂ che legandosi al recettore PPAR γ (peroxisome proliferators-activated receptor gamma) sono in grado di sopprimere le vie di segnale pro-infiammatorie, il traffico leucocitario e di indurre apoptosi, e i metaboliti degli acidi grassi ω -3, resolvine e docosatrieni, potenti inibitori della migrazione transendoteliale dei PMN (47).

In questi ultimi anni particolare attenzione è stata rivolta al ruolo antinfiammatorio delle lipoproteine ad alta densità (HDL) nel controllo della risposta infiammatoria.

È stato dimostrato che l'apoproteina A-I (apo A-I) associata alle HDL è in grado di ostacolare il contatto cellulare linfocita T attivato – monocita, evento di primaria importanza per la produzione di IL-1 β e TNF α (48) (Fig. 7). L'attività inibitoria di apo A-I presente nel plasma controlla l'attivazione contatto-mediata dei monociti circolanti. In corso di infiammazione l'aumentata permeabilità vascolare permette alle lipoproteine di diffondere nel compartimento extra-vascolare e di interferire con il contatto cellula-cellula.

L'attività dell'apo A-I legata alle HDL, potrebbe spiegare le fluttuazioni delle condizioni cliniche osservate nei pazienti con malattie croniche infiammatorie. Recentemente abbiamo dimostrato che i liquidi sinoviali di pazienti con artropatie infiammatorie presentano aumentati livelli di lipoproteine che correlano positivamente con la flogosi locale e in modo inverso con quella sistemica (49).

Il ruolo delle HDL nella risposta infiammatoria è sottolineato anche dal fatto che queste lipoproteine riducono la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) indotta nei PMN dopo contatto con i linfociti T attivati (50). Tutte queste osservazioni supportano il ruolo emergente delle HDL come immunomodulatori nelle malattie infiammatorie.

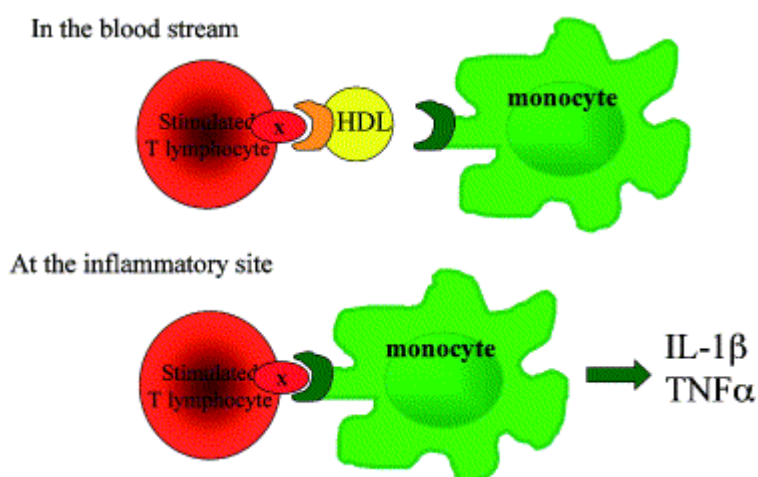


Figura 7. Modello di azione di apo A-I proposto da Burger e coll. In condizioni normali i livelli di HDL nel circolo sono sufficienti ad inibire il rilascio di citochine da parte dei monociti, mediato dal contatto cellulare diretto con i linfociti T. Le apo A-I associate alle HDL legano un fattore X posto nella superficie dei linfociti T impedendo il legame di quest'ultimo con i recettori specifici dei monociti, inibendo così la produzione di TNF- α e IL-1 β (51).

SCOPO DELLA TESI

La risposta infiammatoria è condizionata da molti elementi nel suo sviluppo e nella sua persistenza. La prevalenza di questi o di sostanze da questi generate può alterare gli equilibri fisiologici e fare in modo che l'infiammazione da risposta fisiologica diventi un evento patologico.

Fra le sostanze che negli ultimi anni vanno sollecitando più attenzione vi sono le HDL, le quali possono essere, da un lato condizionate dal tipo di risposta infiammatoria, dall'altro possono esse stesse modulare questi eventi. Un'osservazione cruciale che abbiamo ritenuto di dover assumere come ipotesi di base del nostro studio è stata la constatazione che le HDL possono influenzare la reazione infiammatoria indotta dal contatto cellulare linfocita T attivato – monocita.

A partire da questa dimostrazione abbiamo ritenuto che potesse essere interessante analizzare se risposte di questo tipo potessero anche verificarsi in un tipo d'infiammazione come quella sinoviale.

Per valutare questa ipotesi ci siamo serviti dei seguenti modelli:

- 1- sinoviociti isolati da membrane sinoviali stimolati con cristalli sintetici di urato monosodico;
- 2- monociti isolati da sangue periferico stimolati con microparticelle derivanti da linfociti T attivati.

Abbiamo studiato l'effetto delle HDL sul rilascio di MCP-1, chemochina che riveste un ruolo importante nel reclutamento di cellule mononucleate che caratterizzano l'infiltrato leucocitario; IL-1 β e TNF α , citochine pro-infiammatorie coinvolte nell'amplificazione del processo flogistico; IL-1Ra, antagonista del recettore dell'IL-1 β implicato nella risoluzione dell'infiammazione.

MATERIALI E METODI

Le metodiche utilizzate sono state le seguenti:

Isolamento dal siero delle HDL

Le HDL sono state isolate mediante ultracentrifugazione a partire da sangue periferico di volontari sani (48). Il siero è stato centrifugato per 45 min a 20.000 rpm per rimuovere i chilomicroni e poi per 24 h a 50.000 rpm. Delle due fasi formatesi, quella superiore, contenendo un'elevata quantità di lipoproteine a bassissima densità (VLDL) è stata eliminata, mentre quella inferiore è stata centrifugata per 24 h e 37 min a 50.000 rpm dopo aver aggiunto del NaBr solido per portare la densità a 1,063 g/ml. La fase superiore contenente un'elevata quantità di lipoproteine a bassa densità (LDL) è stata eliminata, mentre quella inferiore è stata centrifugata per 60 h e 47 min a 45.000 rpm. NaBr solido è stato infine utilizzato per regolare la densità della soluzione ottenuta a 1,23 g/ml. Le HDL sono state recuperate nella fase superiore e dializzate utilizzando del tampone sodio-fosfato. La quantità di proteine è stata determinata utilizzando il metodo di Bradford (52).

Sintesi dei cristalli di urato monosodico

I cristalli sintetici di UMS sono stati preparati usando il metodo descritto da Denko (53). Una soluzione satura di acido urico a 60°C e pH 8,9 è stata fatta raffreddare a temperatura ambiente. Dopo 12 h i cristalli sono stati recuperati per centrifugazione. La loro forma e birifrangenza è stata verificata al microscopio a luce polarizzata e compensata. Prima di ogni esperimento i cristalli sono stati triturati e sterilizzati a 180°C per 2 h. L'assenza di contaminazioni da endotossine è stata verificata usando il Limulus test.

Colture di fibroblasti sinoviali

I campioni di tessuto sinoviale sono stati raccolti da pazienti con osteoartrosi sottoposti ad operazioni chirurgiche. Da questi i fibroblasti sono stati isolati tramite la tecnica dell'espianto. Le frange della membrana sinoviale sono state asportate e tagliate fino ad ottenere pezzi di tessuto di circa 1 mm. Successivamente sono state fatte aderire in capsule Petri in presenza di terreno DMEM addizionato di penicillina-streptomomicina 1%, glutamina

1% e di siero bovino fetale (FCS) 10%. L'origine delle cellule sinoviali è stata confermata tramite colorazione immunocitochimica con gli anticorpi, anti-CD90, anti-CD55 e anti-prolil-4-idrossilasi (Chemicon). I fibroblasti sono stati utilizzati dal terzo al sesto passaggio al 70 % di confluenza. Prima di ogni esperimento le cellule sono state lasciate aderire in piastra per 24 h in terreno DMEM completo a 37°C e 5% di CO₂ e infine trattate con i diversi stimoli in terreno al 2% di siero.

Test di citotossicità

La tossicità dei cristalli alle concentrazioni utilizzate è stata determinata mediante il test colorimetrico di proliferazione e vitalità cellulare (MTT, Chemicon International) che misura l'attività mitocondriale delle cellule.

Il test è stato condotto su fibroblasti sinoviali (10.000 cellule/pozzetto/200 µl) stimolati per 24 h con concentrazioni crescenti di cristalli di UMS fino a 0,25 mg/ml e lisati prima della lettura spettrofotometrica a 570 nm.

Stimolazione dei fibroblasti sinoviali

I sinoviociti sono stati incubati in presenza o in assenza di cristalli di UMS (0,01-0,25 mg/ml) e di HDL (50 e 100 µg/ml) per un periodo di tempo variabile dalle 0 alle 24 h. Il trattamento con le HDL é stato effettuato contemporaneamente alla stimolazione con i cristalli. In alcuni esperimenti le cellule sono state preincubate per 1 h con le HDL e lavate con terreno fresco prima dell'aggiunta dei cristalli. Al termine di ogni esperimento, le cellule e i supernatanti sono stati raccolti e conservati per la determinazione di MCP-1.

Isolamento delle microparticelle

Le MP sono state isolate da supernatanti di coltura di linfociti T e di cellule HUT-78.

I linfociti sono stati isolati dal sangue periferico di volontari sani per gradiente di centrifugazione (Ficoll-Hystopaque). Le cellule recuperate sono state lavate per tre volte con PBS, raccolte mediante centrifugazione a diverse velocità (7 min a 1.500 rpm, 7 min a 1.200 rpm e 10 min a 900 rpm), risospese in terreno RPMI 1640 addizionato di FCS 10%, streptomina (1%), penicillina (1%), glutamina (1%) e polimixina B solfato alla concentrazione di 1 µg/ml e incubate in piastre di plastica per 1 h a 37°C. Il supernatante di coltura è stato poi centrifugato a 1.200 rpm per 10 min e il pellet ottenuto, risospeso ancora

una volta in terreno. I monociti rimasti nella sospensione cellulare sono stati eliminati mediante l'utilizzo di colonne in nylonwool.

La linea di cellule T umane HUT-78 è stata fornita dall'ATCC e mantenuta in terreno RPMI-1640 completo.

I linfociti T (4×10^6 cellule/ml) e le cellule HUT-78 (2×10^6 cellule/ml) sono state stimulate con forbolo miristato acetato (PMA) (5 ng/ml) e fitoemagglutinina (PHA) (1 μ g/ml) per 48 e 6 h rispettivamente (54). I supernatanti di coltura, ottenuti dopo centrifugazione a 800 g per 5 min, sono stati centrifugati a 7.000 g per 5 min per eliminare i detriti. Dopo un'ulteriore centrifugazione a 20.000 g per 45 min, le MP sono state lavate 2 volte con PBS e risospese in PBS. Come indice quantitativo di MP è stata utilizzata la concentrazione delle proteine totali (52).

Analisi citofluorimetrica

L'origine cellulare delle MP, il legame con l'annessina V e il loro numero sono stati determinati mediante immunocitofluorimetria (FACS) (BD Facscalibur, BD Biosciences) utilizzando due metodiche diverse. La prima ha previsto l'uso di biglie in latex con un diametro di 4 μ m (aldehyde/sulfate latex beads) che sono state miscelate con le MP (MP:biglie, 1:3) (55). La reazione è stata condotta in PBS sotto lenta agitazione per 2 h, ed è stata fatta terminare con l'aggiunta di glicina. La sospensione è stata centrifugata a 10.000 rpm e il precipitato è stato risospeso in tampone per FACS. Il legame con l'annessina V e l'espressione del CD69 sono stati determinati usando le tecniche standard con annexin V-FITC (BD Biosciences) e l'anticorpo per CD69-FITC o PE (BD Biosciences). Come controllo negativo sono state utilizzate sole biglie e supernatante privato delle MP.

La seconda metodica ha previsto invece l'utilizzo del protocollo descritto da Combes (56). Questo ha permesso di ottenere maggiori informazioni sulla quantità e sulla grandezza delle MP. Il limite di grandezza è stato fissato usando delle biglie in latex con un diametro di 0,8 μ m.

Microscopia elettronica

MP derivate da cellule HUT-78 stimulate e non stimulate sono state fissate con glutaraldeide in tampone cacodilato 0,1 M pH 7,2-7,4, postfissate con tetrossido di osmio nello stesso tampone e disidratate mediante soluzioni a concentrazioni crescenti di etanolo (30-100%). La disidratazione è stata completata con esposizione a esametildisilazano.

Per la microscopia a scansione elettronica (SEM), i campioni sono stati essiccati mediante punto critico di CO₂, montati sugli appositi supporti e ricoperti con una sottile lamina di oro.

Per la microscopia a trasmissione elettronica (TEM), i campioni sono stati inclusi in una resina epossidica, sezionati e contrastati con una soluzione di acetato di uranile (10 min) e citrato di piombo (5 min).

Isolamento dei monociti

I monociti sono stati isolati dal sangue periferico di volontari sani tramite gradiente di concentrazione con Ficoll-Hystopaque (57). Le cellule, una volta recuperate, sono state lavate con PBS e risospese (50×10^6 cellule/ml) in terreno RPMI 1640 addizionato del 10% di FCS, 50 µg/ml di streptomicina, 50 U/ml di penicillina, 2 mM di L-glutamina e 1 µg/ml di polimixina B solfato. La sospensione cellulare è stata incubata per 40 min a 4°C sotto lenta agitazione e in seguito per 10 min in ghiaccio. I monociti aggregati sono stati separati dalle cellule non aggregate utilizzando un gradiente di FCS e un'ulteriore incubazione di 10 min in ghiaccio e infine separati da linfociti T e NK presenti mediante l'uso di globuli rossi di pecora trattati con bromuro di S-(2-aminoetil) isotiuronio (AET-SRBC). Per evitare l'attivazione cellulare da parte di eventuali endotossine, è stata aggiunta della Polimixina B in tutte le soluzioni durante la procedura di isolamento dei monociti (2 µg/ml) e gli esperimenti (5 µg/ml) (58).

Stimolazione dei monociti

I monociti (5×10^4 cellule/pozzetto/200 µl) sono stati stimolati per 48 h in presenza delle MP ottenute da linfociti T alle concentrazioni di 13,3 µg/ml e 26,6 µg/ml. Le MP da HUT-78 sono state utilizzate a concentrazioni da 1,5 a 6 µg/ml in presenza o assenza di HDL (0,2 mg/ml).

Western Blotting

I fibroblasti sinoviali sono stati incubati per diversi intervalli di tempo (0-2-24 h) in assenza o in presenza di cristalli di UMS (0,05 mg/ml). Le cellule sono state poi raccolte e lisate in tampone di lisi contenente 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7,4, e 0,5% (v/v) Triton X-100 e il lisato ottenuto è stato sottoposto a western blotting analysis. 30 µg di proteine sono stati separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) e trasferite su un foglio di nitrocellulosa. Le membrane sono state bloccate overnight in una soluzione di BSA all'1% in tampone TBS con Tween 20 (TBS-T), sottoposte a trattamento prima con l'anticorpo monoclonale anti-MCP-1 (dil. 1:1.000, Biosource), poi con l'anticorpo secondario (dil. 1:5.000, Amersham) e infine visualizzate mediante chemiluminescenza.

ELISA

La produzione di MCP-1 è stata misurata nei supernatanti di coltura dei fibroblasti sinoviali mediante kit ELISA a coppie di anticorpi (RayBiotech Inc).

La produzione di IL-1Ra, IL-1β e TNF è stata misurata nei supernatanti di coltura dei monociti mediante i kit immunoenzimatici per IL-1β (Immunotech), TNF e IL-1Ra (Quantikine, R&D).

Microscopia confocale

I fibroblasti sinoviali (15.000 cellule/pozzetto slide chamber/200 µl) sono stati stimolati per 24 h con una sospensione di cristalli di UMS (0,05 mg/ml) in presenza o in assenza di HDL (50-100 µg/ml). Dopo aver raccolto i supernatanti, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% per 10 min, permeabilizzate con una soluzione di Triton X 100 0,5% per 4 min e lavate in PBS. I sinoviociti sono stati incubati per 1 h con l'anticorpo monoclonale anti-MCP-1 (dil. 1:40, Biosource) e per 30 min con l'anticorpo secondario (dil. 1:150; Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, Molecular Probes). La fluorescenza è stata quindi rilevata nelle varie sezioni cellulari al microscopio confocale.

RISULTATI

Effetto dei cristalli sulla proliferazione e vitalità cellulare

La tossicità dei cristalli è stata valutata a diverse concentrazioni di UMS in coltura dopo 24 h di stimolazione. Come si può osservare nella figura 8 i cristalli di UMS alle concentrazioni utilizzate riducono in modo non significativo l'attività mitocondriale delle cellule. La vitalità cellulare viene lievemente diminuita con concentrazioni superiori a 0,05 mg/ml.

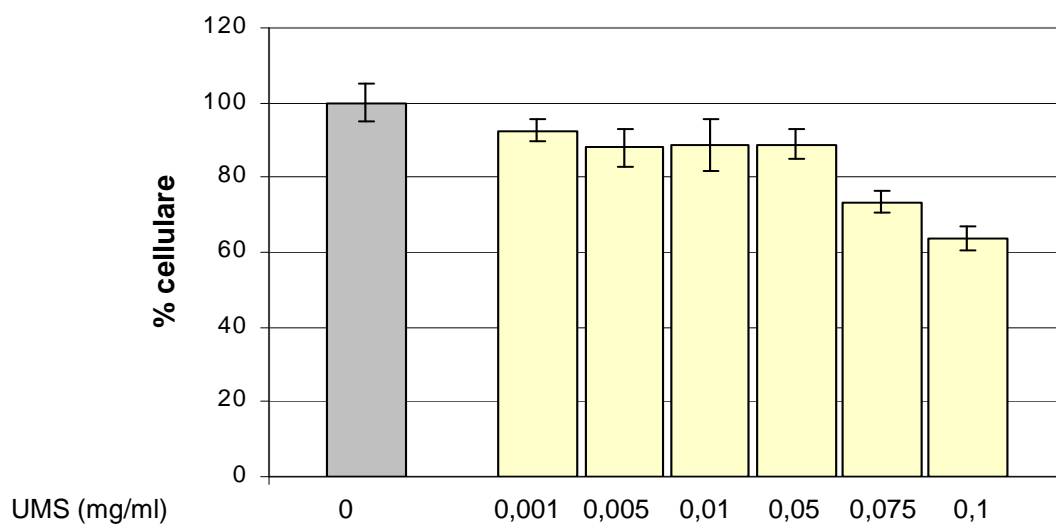


Figura 8. Effetto dei cristalli di UMS sull'attività mitocondriale dei fibroblasti sinoviali dopo 24 h di stimolazione. Citotossicità valutata attraverso il test MTT.

Effetto dei cristalli di UMS sul rilascio di MCP-1

La stimolazione dei fibroblasti sinoviali con i cristalli di UMS provoca un aumento di MCP-1 nei supernatanti di coltura che è dipendente dalla concentrazione dei cristalli utilizzata (fig. 9). Questi risultati, insieme a quelli del test di citotossicità, ci hanno indotti ad utilizzare una concentrazione di cristalli pari a 0,05 mg/ml in tutti gli esperimenti successivi.

A tale concentrazione la cinetica di rilascio di MCP-1 nel tempo ha messo in evidenza che i livelli più alti della chemochina vengono osservati dopo 24 h di stimolazione (fig. 10).

Lo studio della presenza di MCP-1 a livello intracellulare condotto con la metodica del western-blotting ha messo in evidenza che all'aumento di chemochina extracellulare corrisponde una diminuzione di MCP-1 intracellulare (fig. 11).

Questo è stato confermato dalla microscopia confocale, che ha inoltre rilevato la presenza di MCP-1 in granuli citoplasmatici in condizioni cellulari basali. Tali granuli diminuiscono nei sinoviociti stimolati con i cristalli (fig. 12 e 13).

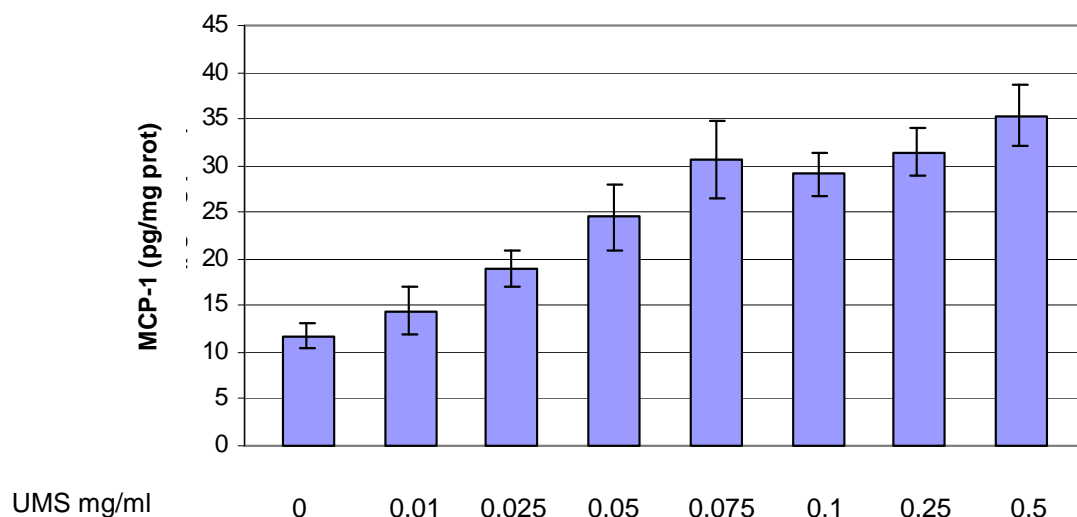


Figura 9. Rilascio di MCP-1 da parte dei sinoviociti stimolati per 24 h con i cristalli di UMS (0,01-0,5 mg/ml). Le colonne rappresentano le medie di tre esperimenti separati.

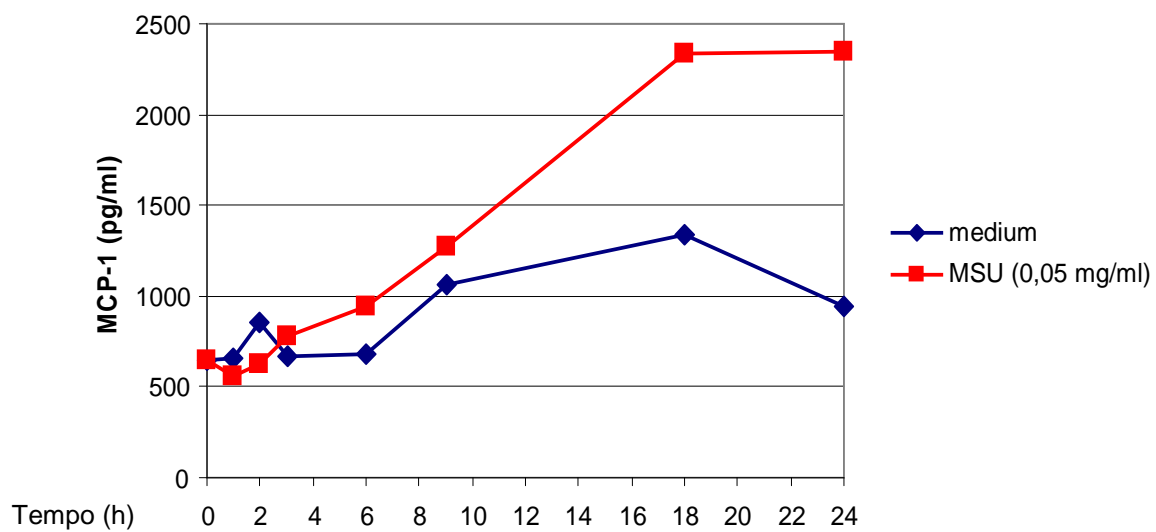
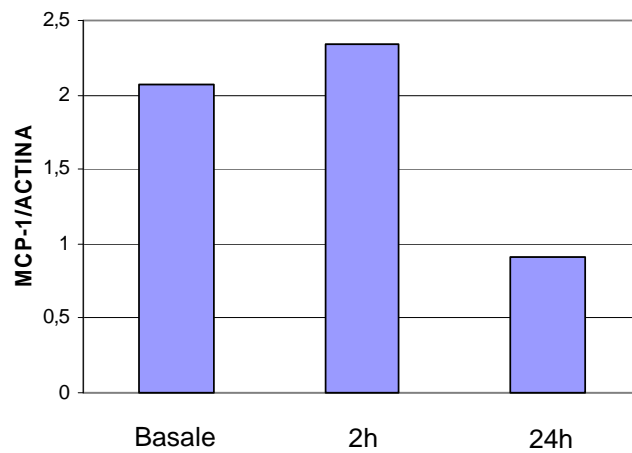
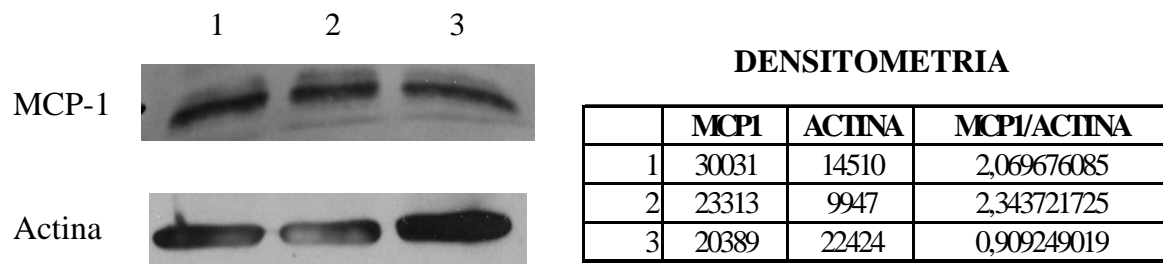
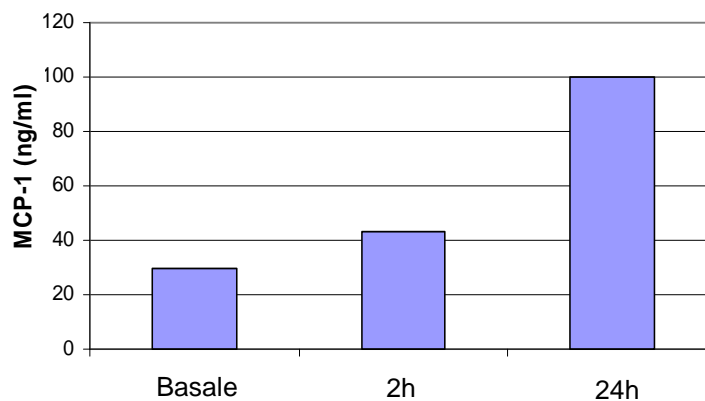


Figura 10. Cinetica di rilascio di MCP-1 da parte dei sinoviociti stimolati con cristalli di UMS 0,05 mg/ml. La chemochina è stata determinata sul supernatante di coltura dopo 1, 2, 3, 6, 9, 18, 24 h dallo stimolo.



A



B

Figura 11. Analisi western blotting per MCP-1 dei lisati cellulari di sinoviociti stimolati con cristalli di UMS 0,05 mg/ml e in condizioni basali (A). Livelli di MCP-1 determinati nei supernatanti dello stesso esperimento (B).

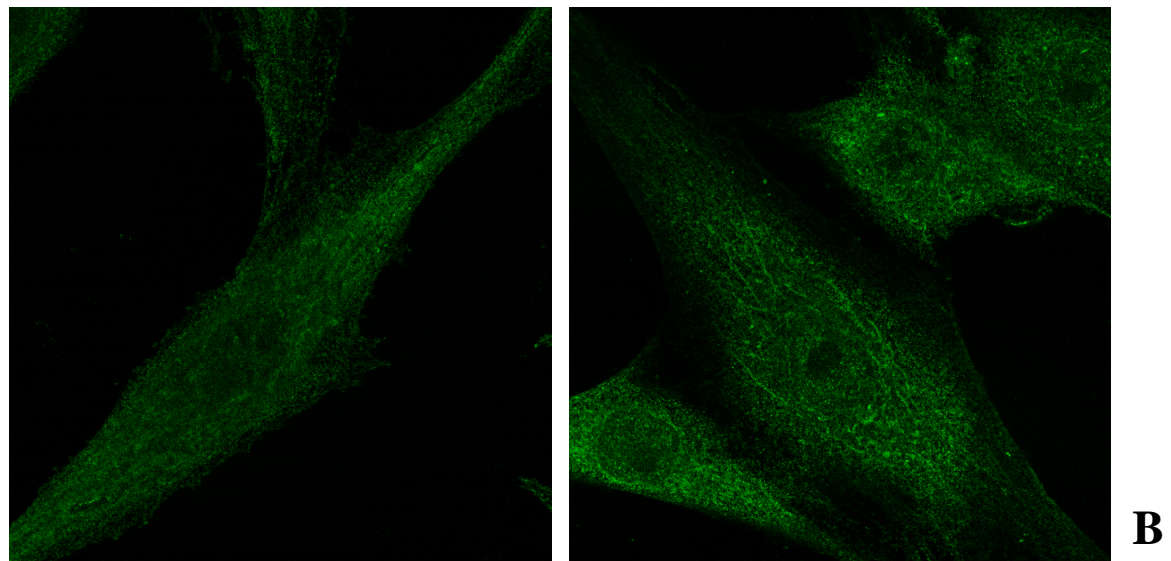
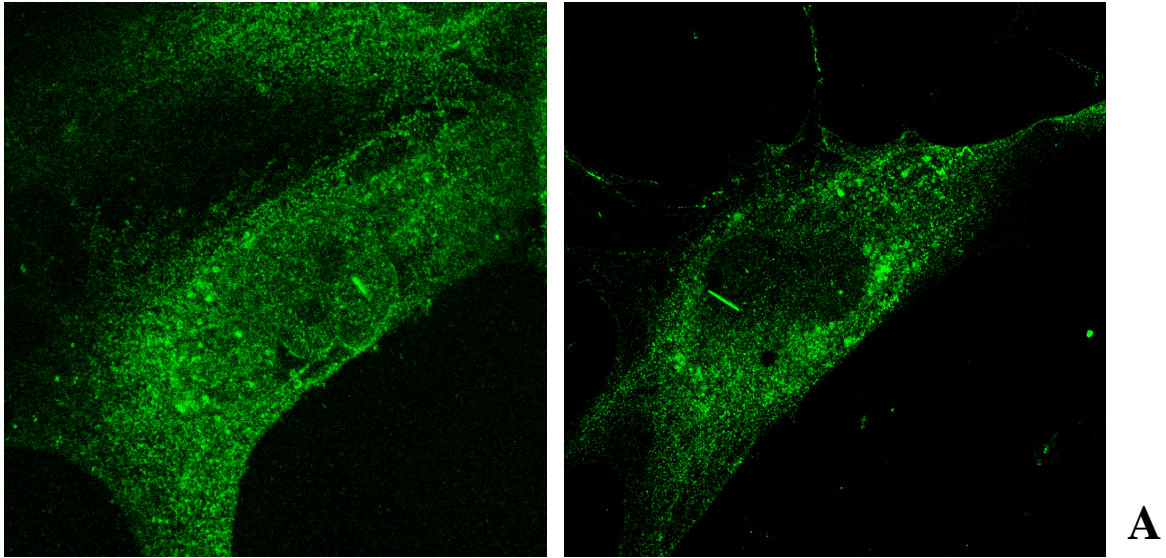


Figura 12. Espressione di MCP-1 intracellulare evidenziata alla microscopia confocale in condizioni basali (A) e dopo stimolazione (B). In A sono visibili i granuli citoplasmatici di immagazzinamento della chemochina che diminuiscono in B, dopo la stimolazione con i cristalli.

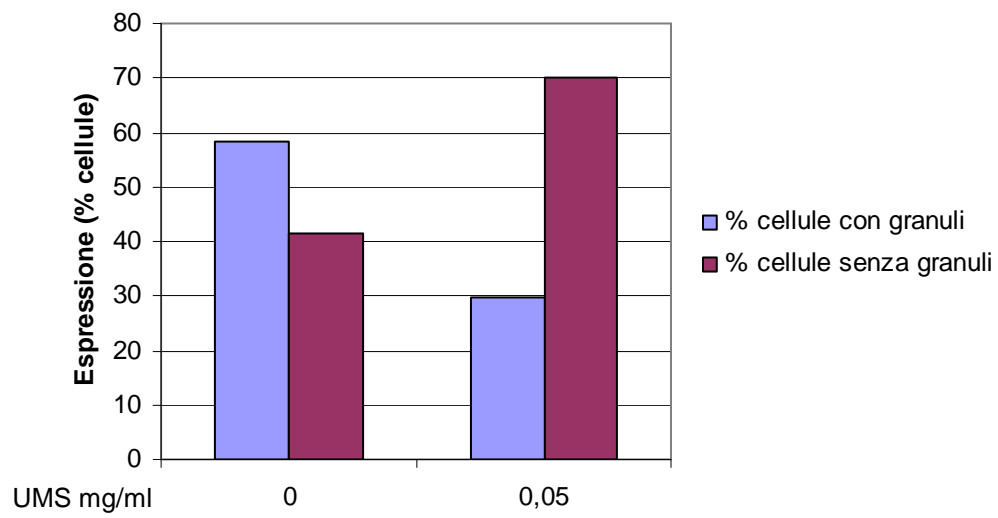
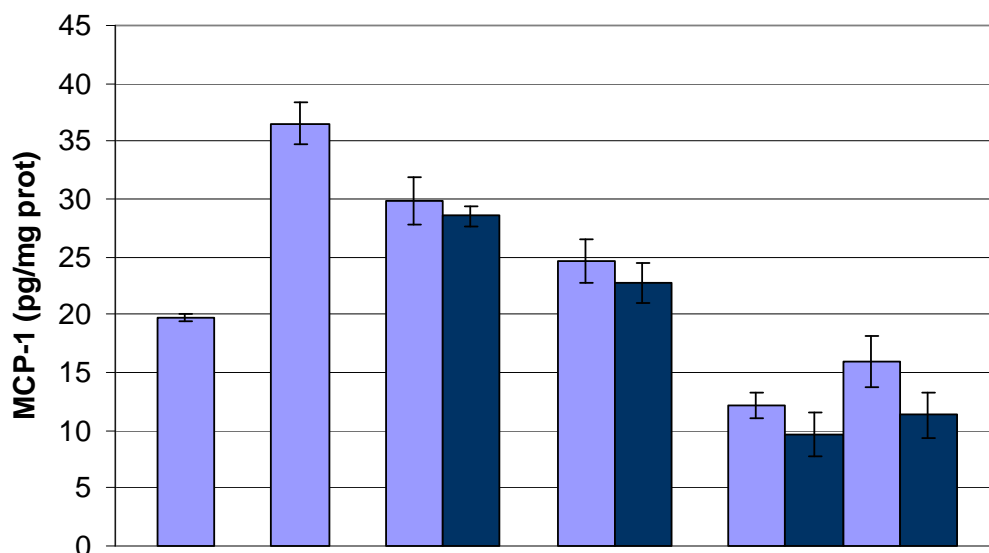


Figura 13. Analisi quantitativa dei granuli secretori di MCP-1 osservati alla microscopia a fluorescenza. Le cellule sono state osservate in condizioni basali e dopo 24 h di stimolazione con cristalli di UMS (0,05 mg/ml)

Effetto delle HDL sul rilascio di MCP-1 indotto dai cristalli di UMS

Il trattamento dei sinoviociti con le HDL alle concentrazioni di 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ inibisce in maniera dose dipendente il rilascio di MCP-1 indotto dai cristalli di UMS (fig. 14). Lo stesso effetto è stato osservato dopo pretrattamento delle cellule con HDL e seguente stimolazione con i cristalli (fig. 14).

Nella figura 15 è riportata l'espressione intracellulare di MCP-1 alla microscopia confocale dopo stimolo con i cristalli e trattamento con le HDL. Come si può osservare l'aggiunta delle HDL permette ai fibroblasti sinoviali di conservare l'immagazzinamento della chemochina nei granuli. L'analisi quantitativa dei granuli è riportata nella figura 16.



| | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| UMS 0,05 mg/ml | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| HDL 50 $\mu\text{g/ml}$ | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - |
| HDL 50 $\mu\text{g/ml}$ (pretratt.) | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - |
| HDL 100 $\mu\text{g/ml}$ | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - |
| HDL 100 $\mu\text{g/ml}$ (pretratt.) | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + |

Figura 14. Livelli di MCP-1 nei supernatanti di coltura dopo 24 h di stimolazione con cristalli di UMS in presenza o assenza di HDL. Le colonne scure rappresentano i livelli della chemochina ottenuti dopo pretrattamento cellulare di 1 h con HDL seguito da lavaggio con PBS e successiva stimolazione con cristalli.

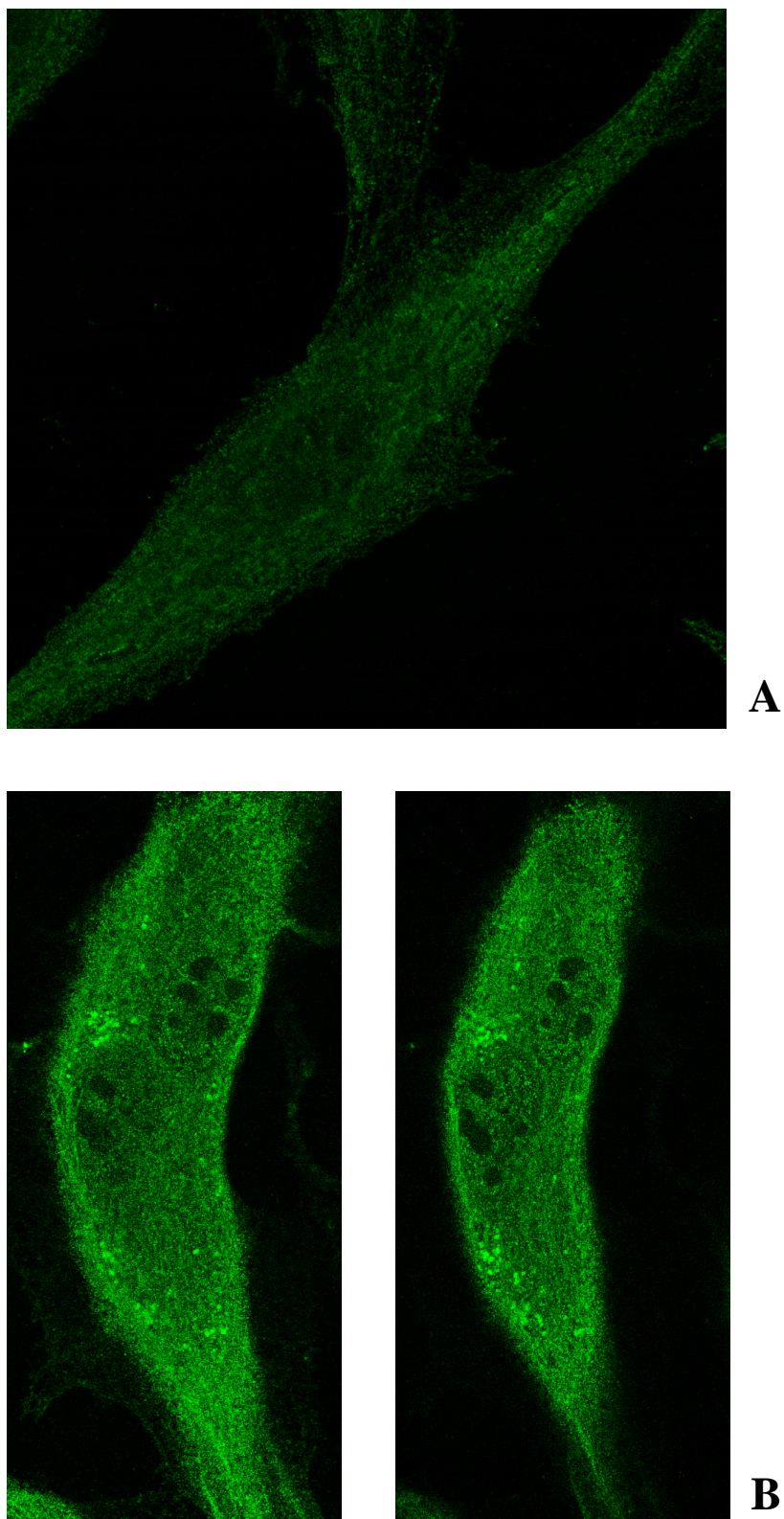
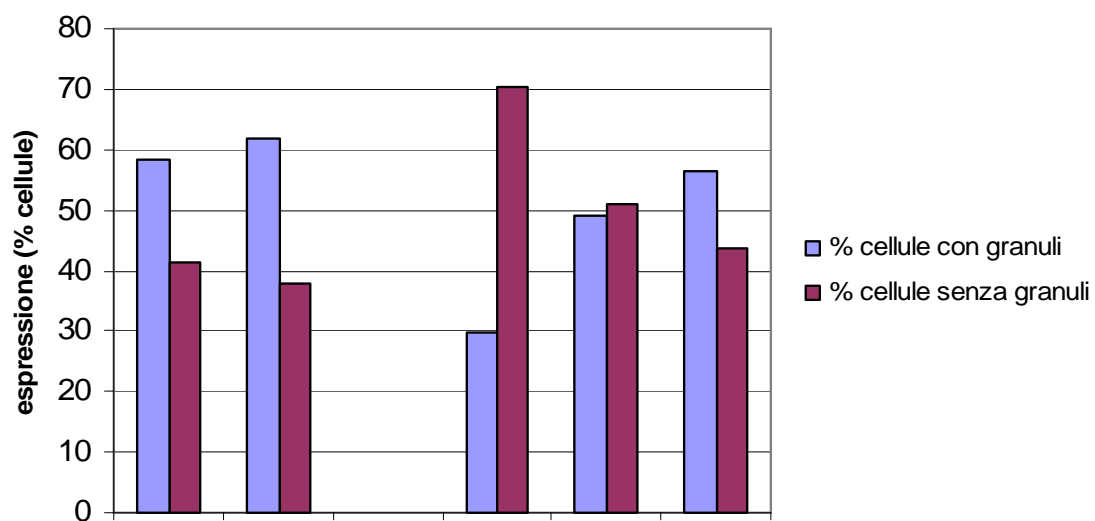


Figura 15. Espressione di MCP-1 intracellulare evidenziata alla microscopia confocale dopo stimolazione con i cristalli di UMS in assenza (A) e in presenza (B) di HDL 100 $\mu\text{g/ml}$.



| | | | | | |
|----------------|---|---|---|---|---|
| UMS 0,05 mg/ml | - | - | + | + | + |
| HDL 50 µg/ml | - | + | - | + | - |
| HDL 100 µg/ml | - | - | - | - | + |

Figura 16. Analisi quantitativa dei granuli secretori di MCP-1 osservati alla microscopia a fluorescenza. Le cellule sono state osservate in condizioni basali e dopo 24 h di stimolazione con cristalli di UMS (0,05 mg/ml) in presenza o assenza di HDL.

Caratteristiche delle MP

Le MP sono state isolate dai supernatanti di coltura di linfociti T e della linea cellulare HUT-78 non stimolati o attivati con PMA e PHA per 48 e 6 ore rispettivamente e analizzate mediante microscopia elettronica e citofluorimetria. Nelle figure 17 e 18 sono riportate le immagini, alla SEM e alla TEM rispettivamente, delle MP ottenute.

MP da cellule stimulate o non stimulate presentano una grandezza simile con un diametro compreso tra 0,1 e 0,8 μm . L'espressione dell'antigene CD69 ha confermato l'origine cellulare delle MP (fig. 19), mentre il legame con l'annessina V ha dimostrato che la fosfatidilserina è stata esposta in superficie (fig. 20). Le biglie e i diversi supernatanti non hanno riportato alcun tipo di positività né per il CD69 né per l'annessina V.

Per quanto riguarda la produzione di MP, è stato osservato che le cellule HUT-78 attivate sono in grado di produrre quantità di MP 200 volte superiori rispetto a quelle non attivate (tab. 1). Risultati simili sono stati ottenuti per le MP da linfociti T da sangue periferico attivati, 50 volte superiori rispetto a quelli non attivati (tab.1).

Come evidenziato dai valori riportati, la produzione di MP da linfociti T isolati da sangue periferico richiede un numero piuttosto elevato di cellule. Di conseguenza, per avere quantità di MP sufficiente per stimolare i monociti, negli esperimenti sono state utilizzate quelle provenienti da cellule HUT-78. Inoltre è stato dimostrato che questo tipo di cellule è in grado di attivare i monociti in maniera simile ai linfociti T (54).

È stata determinata anche la quantità di proteine totali, ed è stato osservato che MP da linfociti T e cellule HUT-78 attivate e non attivate contengono una quantità simile di proteine pari a $19.6 \pm 4.8 \mu\text{g}$ proteine/ 10^6 MP.

| | HUT-78 (MP/ 10^6 cellule) | Linfociti T (MP/ 10^6 cellule) |
|---------------------|---------------------------------------|--|
| Attivate | $11,5 \pm 2.3 \times 10^6$ | $1.6 \pm 0.4 \times 10^6$ |
| Non attivate | $0.07 \pm 0.03 \times 10^6$ | $0.03 \pm 0.02 \times 10^6$ |

Tabella 1. Microparticelle ottenute dalle cellule HUT-78 e dai linfociti T attivati e non attivati. La quantità è espressa come n. di MP rilasciate da 10^6 cellule.

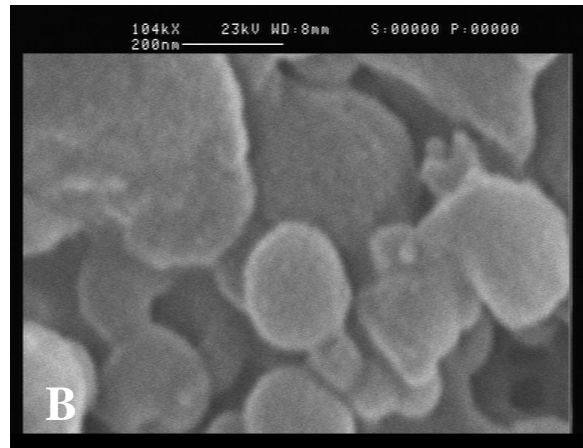
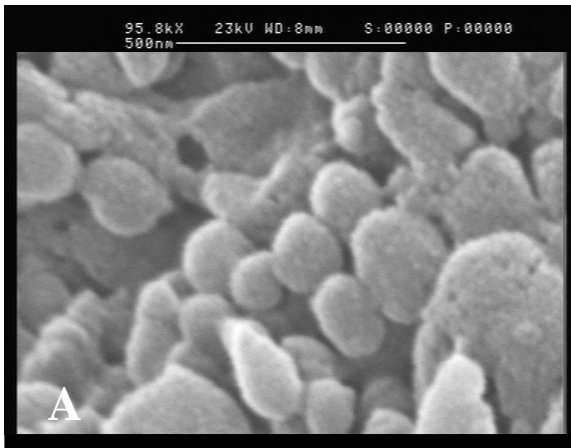


Figura 17. Immagini alla microscopia a scansione elettronica delle microparticelle rilasciate dalle cellule HUT-78. Ingrandimento 95.800x (A) e 104.000x (B).

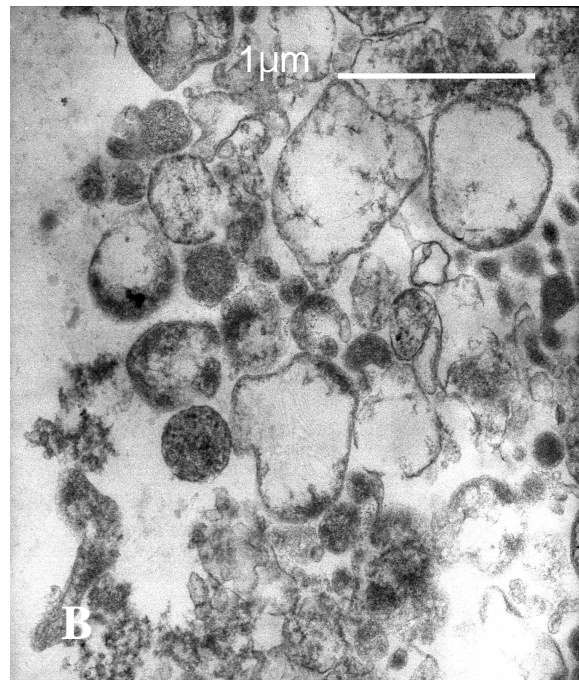
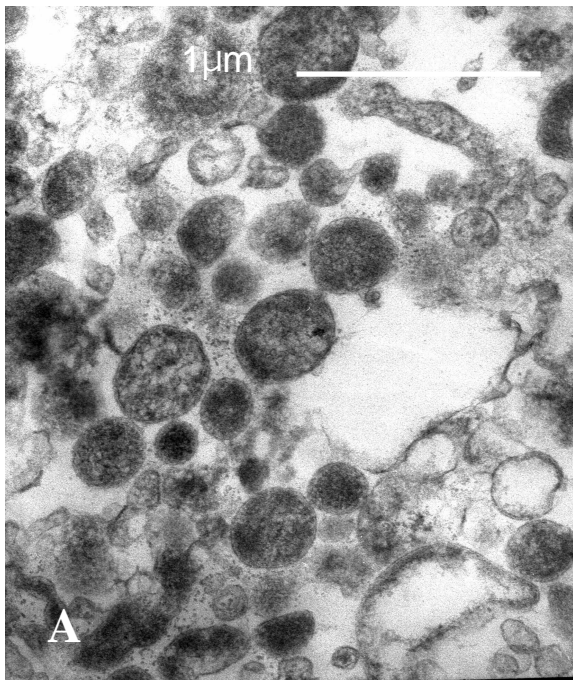
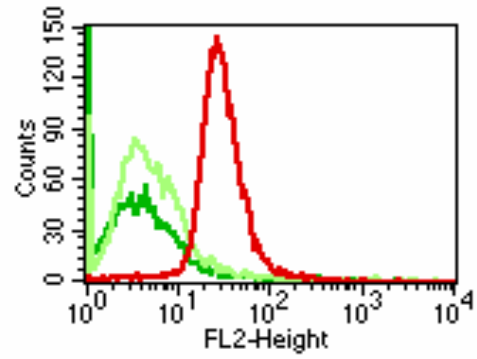
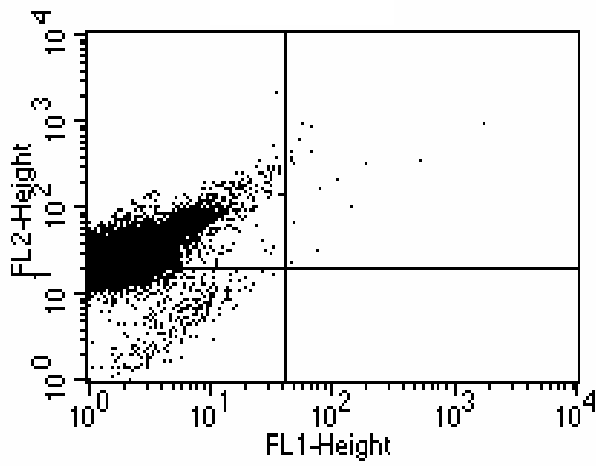
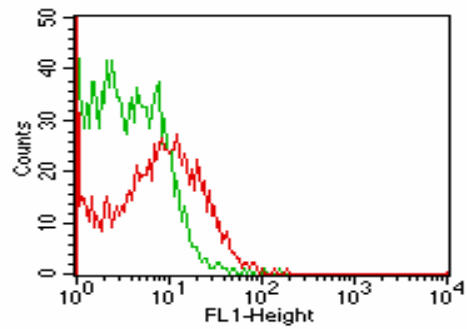
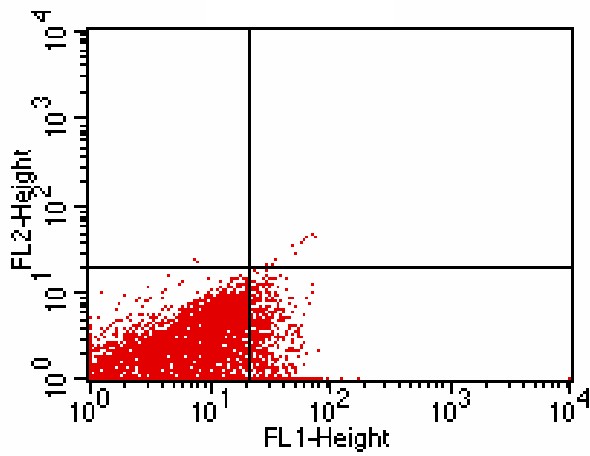


Figura 18. Immagini alla microscopia a trasmissione elettronica delle microparticelle rilasciate dalle cellule HUT-78. Ingrandimento 30.000x (A) e 25.000x (B).



A



B

Figura 19. Analisi citofluorimetrica per il CD69 delle microparticelle isolate da linfociti T da sangue periferico (A) e dalla linea HUT-78 (B).

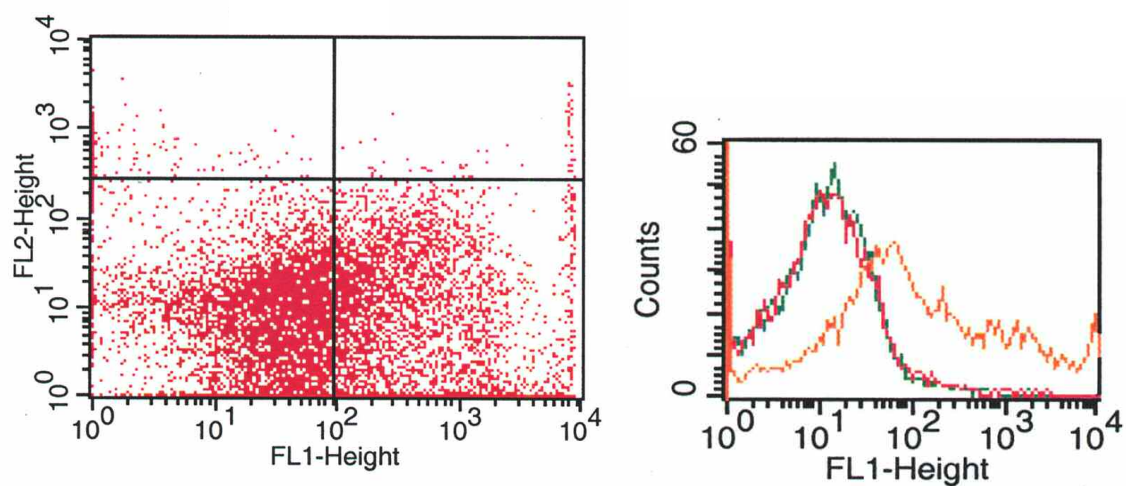


Figura 20. Analisi citofluorimetrica per l'annessina V delle microparticelle rilasciate dalle cellule HUT-78.

Effetto delle HDL sul rilascio di citochine pro- e anti-infiammatorie indotto dalle MP

Le MP isolate da linfociti T attivati inducono una produzione di TNF, IL-1 β e IL-1Ra da parte dei monociti in maniera dose dipendente. La stimolazione con le MP provenienti da linfociti T non attivati non ha alcun effetto sul rilascio di citochine (fig. 21).

Come mostrato in figura 22, le MP generate dalle cellule HUT-78 inducono la produzione di citochine nei monociti umani in modo simile alle MP da linfociti T attivati. Le HDL inibiscono la produzione di citochine proinfiammatorie da parte dei monociti, mentre non hanno alcun effetto sul rilascio di IL-1Ra (fig. 22).

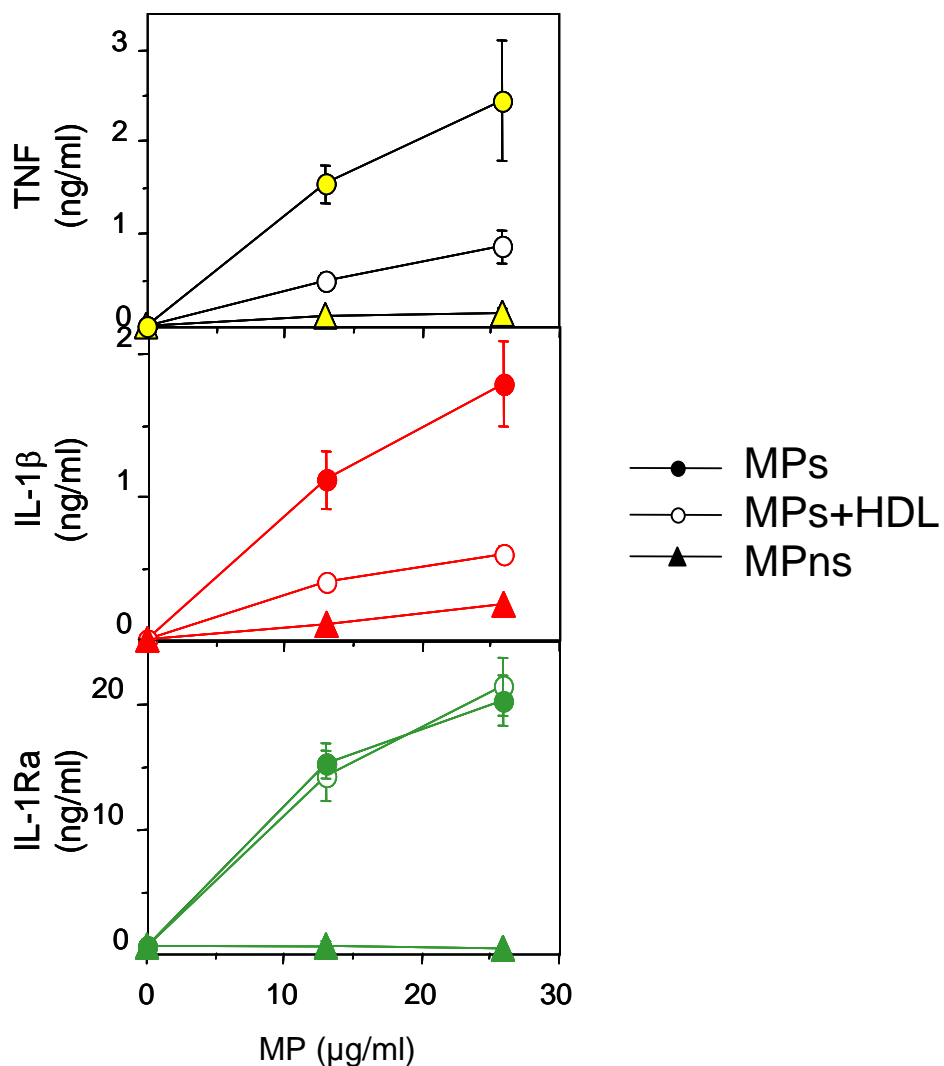


Figura 21. Livelli di TNF, IL-1 β e IL-1Ra nei supernatanti di coltura dei monociti stimolati per 48 h con le microparticelle isolate da linfociti T stimolati (MPs) e non stimolati (MPns), in presenza o assenza di HDL (0,2 mg/ml).

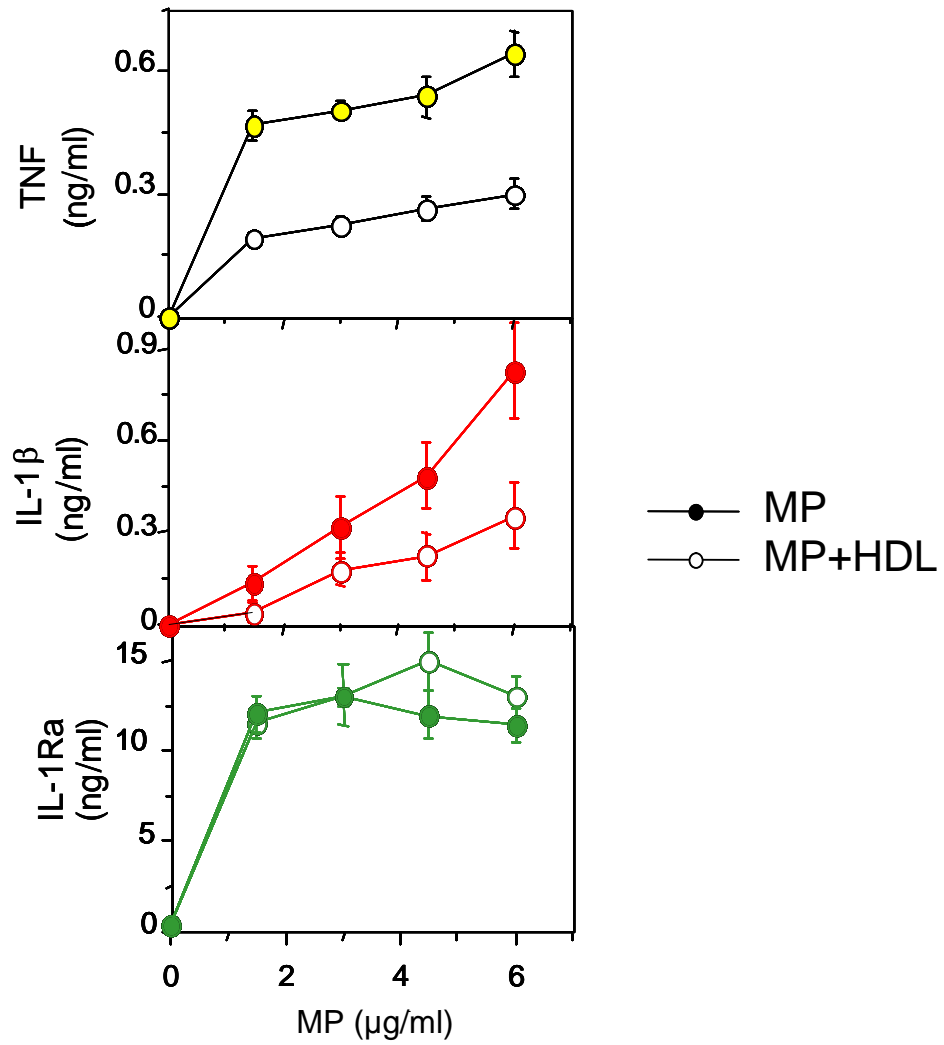


Figura 22. Livelli di TNF, IL-1 β e IL-1Ra nei supernatanti di coltura dei monociti stimolati per 48 h con le microparticelle isolate da HUT-78 attivate, in presenza o assenza di HDL (0,2 mg/ml).

DISCUSSIONE

I risultati del nostro studio dimostrano che le HDL sono in grado di diminuire la liberazione di citochine pro-infiammatorie indotta da differenti meccanismi di stimolazione e sono pertanto potenzialmente in grado di contribuire alla risoluzione della risposta infiammatoria.

Per dimostrarlo abbiamo utilizzato un modello di infiammazione acuta e uno di infiammazione cronica in vitro che riproducono alcuni degli elementi caratteristici della flogosi sinoviale.

Il primo è stato realizzato stimolando delle colture primarie di fibroblasti sinoviali con microcristalli sintetici di urato monosodico. La fagocitosi di questi cristalli è in grado di favorire il rilascio della chemochina MCP-1 da granuli citoplasmatici preformati, messi in evidenza grazie alla microscopia confocale, aumentandone i livelli extracellulari. La diminuzione di MCP-1 nei supernatanti di colture trattate con HDL e la conservazione dei granuli secretori intracellulari indicano un chiaro effetto antinfiammatorio di queste lipoproteine. Abbiamo quindi ipotizzato che le HDL vengano adsorbite sulla superficie dei cristalli diminuendone la capacità flogogena. Tuttavia gli esperimenti condotti pretrattando le cellule con le HDL hanno portato agli stessi risultati. Sulla base di questi dati riteniamo che le HDL possano interagire con dei recettori di superficie attivando delle vie di segnale antinfiammatorie o interferire con il legame dei cristalli ai loro recettori o con le membrane cellulari impedendo la trasduzione del segnale.

Nel secondo modello l'infiammazione cronica è stata riprodotta stimolando colture primarie di monociti con microparticelle generate a partire da linfociti T attivati e dalla linea cellulare HUT-78. Abbiamo osservato che la produzione di citochine dipende dal grado di attivazione delle cellule dalle quali le MP vengono isolate. L'inibizione della produzione di IL-1 β e TNF α da parte dei monociti e gli inalterati livelli di IL-1Ra hanno messo in evidenza l'effetto antinfiammatorio delle HDL.

Studi precedenti hanno dimostrato che il contatto diretto con i linfociti T attivati è fondamentale per l'induzione nei monociti di citochine pro-infiammatorie e dei loro inibitori e che questo meccanismo può rendere conto della sbilanciata produzione di citochine responsabile della cronicizzazione del processo infiammatorio che caratterizza

alcune malattie croniche quali l'artrite reumatoide (59,60). In questo studio le MP rilasciate dai linfociti T stimolati mostrano effetti infiammatori inducendo nei monociti la produzione di IL-1 β e TNF α . Le MP sono in grado però di indurre anche la secrezione di IL-1Ra, specifico inibitore dell'IL-1 β . Il fatto che le HDL non abbiano effetto sui livelli di IL-1Ra mette ancor più in evidenza le loro proprietà antiflogistiche.

L'attività antinfiammatoria delle HDL è stata ampiamente descritta in letteratura. Le HDL sono in grado di diminuire l'espressione delle molecole di adesione indotta dalle citochine nelle cellule endoteliali (61). Questa potente attività è stata osservata anche nel modello animale di infiammazione vascolare acuta dove le HDL diminuiscono l'infiltrazione dei neutrofili nella parete delle arterie. Questa azione coinvolge l'inibizione di alcuni enzimi attivati dal TNF α , responsabili dell'espressione delle molecole di adesione nelle cellule endoteliali (62). Nelle stesse cellule le HDL attenuano anche la produzione di IL-6 da parte di stimoli pro-infiammatori (63). Le HDL, inoltre, svolgono un importante ruolo antiossidante attraverso l'inibizione dell'ossidazione dei fosfolipidi e la riduzione dell'attività delle LDL modificate (64). I componenti che contribuiscono a questo effetto sono rappresentati dall'apo AI e dagli enzimi paraossonasi e lecitin-colesterolo aciltransferasi. Infine, le HDL promuovono la riduzione del colesterolo nei macrofagi vascolari limitando la formazione delle foam-cells (65).

In un nostro recente studio abbiamo osservato che i livelli di lipoproteine tendono ad aumentare nel LS di pazienti con artropatie infiammatorie rispetto a quelli riscontrati nell'artrosi.

Il confronto fra tre modelli di artropatia, l'artrite reumatoide, l'artrite psoriasica e l'artrosi, caratterizzate da un livello decrescente di flogosi sistemica ed articolare, ha confermato che l'infiammazione determina una riduzione dei livelli sierici di apolipoproteine, lipoproteine e lipidi. Tali sostanze presentano inoltre una correlazione negativa con gli indici di flogosi sistemici e positiva con quelli sinoviali. L'aumentata concentrazione delle apolipoproteine nel compartimento articolare, probabilmente dovuto all'aumentata permeabilità della membrana sinoviale, potrebbe contribuire all'evoluzione della risposta infiammatoria, in particolare nell'artrite psoriasica, malattia a carattere più autolimitante e meno aggressivo.

Nell'artrite reumatoide la stimolazione della sintesi delle proteine della fase acuta, in particolare della proteina sierica amiloide A (SAA), è in grado di diminuire la produzione di apolipoproteine e favorire la progressione della flogosi e della distruzione articolare.

Durante il processo infiammatorio si assiste ad un aumento delle proteine della fase acuta associato ad una modificazione della composizione e della concentrazione plasmatica delle lipoproteine. In particolare le HDL circolanti si arricchiscono in colesterolo libero, trigliceridi, acidi grassi e SAA perdendo il loro effetto protettivo. Questo è dovuto, almeno in parte, agli effetti dell'IL-1 β e TNF α che limitano la produzione di apo AI. I diminuiti livelli di apo AI favoriscono così l'attivazione dei monociti/macrofagi attraverso il contatto con i linfociti T attivati e aumentando a loro volta la produzione delle citochine (66).

Il processo infiammatorio che si manifesta nelle artriti presenta numerose analogie con quello che conduce alla formazione della placca aterosclerotica (67). Le statine, largamente usate nella prevenzione delle malattie cardiovascolari, sono in grado di controllare la risposta infiammatoria attraverso la riduzione dell'attività di malattia, della tumefazione articolare e degli indici di flogosi sistemica, VES e PCR, nei pazienti con artrite reumatoide (68). Recentemente è stato dimostrato che le modifiche del profilo lipidico indotte dalle statine comprendono anche la modulazione della composizione delle HDL che acquisiscono una maggior capacità anti-infiammatoria (69).

Questa osservazione e i risultati del nostro studio giustificano ampiamente l'utilizzo di strategie terapeutiche volte sia al ripristino dell'attività anti-infiammatoria delle HDL, sia all'aumento della loro concentrazione.

Infine riteniamo che, analogamente a quanto proposto per le patologie cardiovascolari, i peptidi sintetici che mimano apo A-I (70), possano rappresentare una strategia terapeutica emergente nelle malattie infiammatorie croniche articolari.

BIBLIOGRAFIA

1. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2002;2:787–95.
2. Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 2006; 24:823–35.
3. Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P. *Immunity* 1998;8:297–303.
4. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001;11:372–7.
5. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 2005;15:11–18.
6. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002;109:S81–S96.
7. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogenactivated protein kinases. *J Biol Chem* 1995;270:16483–6.
8. Martin M, Schifferle RE, Cuesta N, Vogel SN, Katz J, Michalek SM. Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 2003;171:717–25.
9. Oliviero F, Punzi L. L'infiammazione articolare da microcristalli. *Reumatismo* 2003;55:16–27.
10. Rich AM, Giedd KN, Cristello P, Weissmann G. Granules are necessary for death of neutrophils after phagocytosis of crystalline monosodium urate. *Inflammation* 1985;9:221–32.
11. Doherty M, Dieppe P. Crystal-related arthropathies. In: *Rheumatology*. Klippel JH, Dieppe PA eds, Mosby, London, 2000, 14.1–14.
12. Terkeltaub R, Zachariae C, Santoro D, Martin J, Peveri P, Matsushima K. Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 is a potential mediator of crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum* 1991;34:894–903.
13. Ryckman C, McColl SR, Vandal K, de Medicis R, Lussier A, Poubelle PE, et al. Role of S100A8 and S100A9 in neutrophil recruitment in response to monosodium urate monohydrate crystals in the air-pouch model of acute gouty arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2310–20.

14. Jaramillo M, Godbout M, Naccache PH, Olivier M. Signaling events involved in macrophage chemokine expression in response to monosodium urate crystals. *J Biol Chem* 2004;279:52797–805.
15. Dalbeth N, Haskard DO. Mechanisms of inflammation in gout. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:1090–6.
16. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003;425:516–21.
17. Liu-Bryan R, Pritzker K, Firestein GS, Terkeltaub R. TLR2 signaling in chondrocytes drives calcium pyrophosphate dehydrate and monosodium urate crystal-induced nitric oxide generation. *J Immunol* 2005;174:5016–23.
18. Chen CJ, Shi Y, Hearn A, Fitzgerald K, Golenbock D, Reed G, et al. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *J Clin Invest* 2006;116:2262–71.
19. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006;440:237–41.
20. So A, De Smedt, Revaz S, Tschopp J. A pilot study on IL-1 β inhibition by anakinra in acute gout. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R28.
21. Ardoin SP, Shanahan JC, Pisetsky DS. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand J Immunol* 2007;66:159–65.
22. Martinez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H1004–9.
23. VanWijk MJ, VanBavelb E, Sturkc A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Card Res* 2003;59:277–87.
24. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood* 2007;21:157–71.
25. Diaz C, Schroit AJ. Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry. *J Membr Biol* 1996;151:1–9.
26. Distler JHW, Pisetsky DS, Huber LC, Kalden JR, Gay S, Distler O. *Arth Rheum* 2005;52:3337–48.

27. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2004;104:2761–6.
28. Gasser O, Hess C, Miot S, Deon C, Sanchez JC, Schifferli JA. Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp Cell Res* 2003;285:243–57.
29. Fritzsching B, Schwer B, Kartenbeck J, Pedal A, Horejsi V, Ott M. Release and intercellular transfer of cell surface CD81 via microparticles. *J Immunol* 2002;169:5531–7.
30. Barry OP, Praticò D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of Monocyte–Endothelial Cell Interactions by Platelet Microparticles. *J Clin Invest* 1998;102:136–44.
31. Nauta AJ, Trouw LA, Daha MR, Tijssma I O, Nieuwland R, Schwaeble WJ, et al. Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur J Immunol* 2002;32:1726–36.
32. Barry OP, Kazanietz MG, Praticò D, FitzGerald GA. Arachidonic Acid in Platelet Microparticles Up-regulates Cyclooxygenase-2-dependent Prostaglandin Formation via a Protein Kinase C/Mitogen-activated Protein Kinase-dependent Pathway. *J Biol Chem* 1999;274:7545–56.
33. Mackenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid Secretion of Interleukin-1 β by Microvesicle Shedding. *Immunity* 2001;8:825–35.
34. Distler JHW, Huber LC, Hueber AJ, Reich III CF, Gay S, Distler O, et al. The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis* 2005;10:731–41.
35. Distler JHW, Jüngel A, Huber LC, Seemayer CA, Reich III CF, Gay RE, et al. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:2892–7.
36. Neel BG, Gu H, Pao L. The ‘Shp’ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* 2003;28:284–93.
37. Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 2000;120:649–61.

38. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004;22:503–29.
39. Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, Tsui C, et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* 2004;5:1052–60.
40. Maeda S, Chang L, Li ZW, Luo JL, Leffert H, Karin M. IKK β is required for prevention of apoptosis mediated by cell-bound but not by circulating TNF α . *Immunity* 2003;19:725–37.
41. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002;420:846–52.
42. Wells CA, Ravasi T, Hume DA. Inflammation suppressor genes: please switch out all the lights. *J Leuk Biol* 2005;78:9–13.
43. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, et al. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 2001;14:705–14.
44. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol* 2001;2:612–9.
45. Huynh MN, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 2002;109:41–50.
46. Bellingan GJ, Xu P, Cooksley H, Cauldwell H, Shock A, Bottoms S, et al. Adhesion molecule-dependent mechanisms regulate the rate of macrophage clearance during the resolution of peritoneal inflammation. *J Exp Med* 2002;196:1515–21.
47. Ariel A, Serhan CN. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends Immunol* 2007;28:176–83.
48. Hyka N, Dayer JM, Modoux C, Kohno T, Edwards III CK, Roux-Lombard P, Burger D. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood* 2001;97:2381–9.
49. Punzi L, Oliviero F, Dayer JM, Giunco S, Bernardi D, Plebani M, et al. Relationship between lipoproteins and synovial inflammation in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis. *Clin Exp Rheum* submitted.

50. Cettour-Rose P, Nguyen TXK, Serrander L, Kaufmann MT, Dayer JM, Burger D, Roux-Lombard P. T cell contact-mediated activation of respiratory burst in human polymorphonuclear leukocytes is inhibited by highdensity lipoproteins and involves CD18. *J Leukoc Biol* 2005;77:52–8.
51. Burger D, Dayer JM. High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? *Autoimmun Rev* 2002;1:111-7.
52. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
53. Denko CW, Whitehouse MW. Experimental inflammation induced by natural occurring microcrystalline salts. *J Rheumatol* 1976;3:54.
54. Burger D, Molnarfi N, Gruaz L, Dayer J M. Differential induction of IL-1beta and TNF by CD40 ligand or cellular contact with stimulated T cells depends on the maturation stage of human monocytes. *J Immunol* 2004;173:1292–1297.
55. Théry C, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, et al. Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *J Immunol* 2001;166:7309–18.
56. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1999;104:93–102.
57. Boyum A. Separation of white blood cells. *Nature* 1964;204:793–4.
58. Armant M, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. Soluble CD23 directly activates monocytes to contribute to the antigen-independent stimulation of resting T cells. *J Immunol* 1995;155:4868–4875.
59. Burger D. Cell contact-mediated signaling of monocytes by stimulated T cells: a major pathway for cytokine induction. *Eur Cytokine Netw* 2000;11:346–53.
60. Brennan FM, Foey AD. Cytokine regulation in RA synovial tissue: role of T cell/macrophage contact-dependent interactions. *Arthritis Res* 2002; 4:S177–S182.
61. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1987–94.

62. Xia P, Vadas MA, Rye K-A, Barter PJ, Gamble JR. High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway: a possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. *J Biol Chem* 1999;274:33143–7.
63. Gomaschi M, Basilico N, Sisto F, Taramelli D, Eligini S, Colli S, et al. High-density lipoproteins attenuate interleukin-6 production in endothelial cells exposed to pro-inflammatory stimuli. *Biochim Biophys Acta* 2005;1736:136–43.
64. Watson A, Berliner J, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995;96:2882–91.
65. Miyazaki A, Rahim AT, Ohta T, Morino Y, Horiuchi S. High density lipoprotein mediates selective reduction in cholesteryl esters from macrophage foam cells. *Biochim Biophys Acta* 1992;1126:73–80.
66. Haas MJ, Horani M, Mreyoud A, Plummer B, Wong NC, Mooradian AD. Suppression of apolipoprotein AI gene expression in HepG2 cells by TNF alpha and IL-1beta. *Biochim Biophys Acta* 2003;1623:120–8.
67. Chung CP, Avalos I, Raggi P, Stein CM. Atherosclerosis and inflammation: insights from rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2007;26:1228–33.
68. McCarey DW, McInnes IB, Madhok R, Hampson R, Scherbakov O, Ford I, et al. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004;363:2015-21.
69. Charles-Schoeman C, Khanna D, Furst DE, McMahon M, Reddy ST, Fogelman AM, et al. Effects of high-dose atorvastatin on antiinflammatory properties of high density lipoprotein in patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. *J Rheumatol* 2007;34:1459-64.
70. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Hama S, Hough G, Grijalva VR, et al. Oral D-4F causes formation of pre-beta high-density lipoprotein and improves high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux and reverse cholesterol transport from macrophages in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 2004;109:3215-20.

RINGRAZIAMENTI

A Francesca Oliviero, con tutto il mio affetto, per il suo sostegno e aiuto, per i suoi numerosi consigli e la sua pazienza in tutti questi tre anni di dottorato e soprattutto nella realizzazione di questa tesi. La ringrazio anche per la sua straordinaria amicizia e generosità.

À Danielle Burger, avec toute mon estime, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour la confiance qu'elle m'a accordée, pour sa grande disponibilité, ses enseignements, ses conseils et son affection.

Al Prof. Leonardo Punzi, per avermi accolta nel suo laboratorio ed avermi dato la possibilità di intraprendere questo dottorato.

Au Prof. Jean-Michel Dayer, pour m'avoir permis de réaliser une partie de ma thèse dans les laboratoires de l'Unité d'Immunologie Clinique de l'Hôpital Cantonal Universitaire de Genève.

À Lyssia Gruaz, pour son aide inestimable dans le travail et dans mon séjour à Genève et pour son amitié.

Aux Cocoli, pour le bonheur et pour m'avoir fait sentir un peu moins loin de chez moi.

A tutti gli amici della Reumatologia, in particolare al mio compagno di avventura Roberto Luisetto e al Dott. Paolo Sfriso, per la simpatia e per tutti i momenti trascorsi insieme.