

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO: SCIENZE BIOMEDICHE VETERINARIE E COMPARATE

CICLO XXIII

**CARATTERIZZAZIONE DELLE AOPP (*Advanced
Oxidation Protein Products*) COME INDICATORI DI
STRESS OSSIDATIVO E PROCESSI INFIAMMATORI
NELLA BOVINA**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Massimo Morgante

Supervisore: Ch.mo Prof. Gianfranco Gabai

Dottoranda: Laura Da Dalt

Riassunto:

Lo scopo del presente studio è stato quello di caratterizzare indicatori dell'ossidazione delle proteine nella specie bovina, sviluppando la metodica del dosaggio delle AOPP (*advanced oxidation protein products*).

A partire da standard proteici commerciali (Albumina bovina e γ -Globuline bovine) sono state eseguite delle ossidazioni *in vitro* con ossidante clorurato (acido ipocloroso) ed idroperossido (Cumene idroperossido) determinando la relazione tra AOPP e gruppi carbonilici tramite analisi spettrofotometriche e densitometriche tramite *Western blotting*. Le modificazioni conformazionali degli standard sono state osservate mediante elettroforesi monodimensionali mantenute in condizioni non riducenti.

La seconda parte del progetto sono state studiate le relazioni tra indicatori del processo infiammatorio e le AOPP in animali sani e/o con processi infiammatori in atto, avvalorando l'ipotesi che le AOPP siano degli indicatori specifici dell'ossidazione proteica da parte di ossidanti clorurati di origine neutrofilica.

La terza parte del lavoro si è focalizzata sulla produzione di standard proteici ossidati (AOPP-BSA) per la messa a punto di sistemi ELISA per l'individuazione di autoanticorpi diretti contro epitopi ossidati delle proteine.

Abstract:

The aim of this study was to characterize markers of oxidation of proteins in cattle, developing the assay method of AOPP (*advanced oxidation protein products*).

Using standard commercial proteins (Bovine serum Albumin, bovine γ -Globuline), oxidations *In vitro* were performed with chlorinated oxidant (hypochlorous acid) and hydroperoxide (cumene hydroperoxide) determining the relationship between AOPP and carbonyl groups by spectrophotometric and Western blotting analysis.

The conformational changes of the standards were observed by one-dimensional electrophoresis kept in non-reducing conditions.

In the second part of this project, we have studied the relationship between inflammation indicators and AOPP in both healthy cow and in animals with inflammatory processes, supporting the hypothesis that AOPP are specific indicators of protein oxidation by chlorinated oxidants produced by neutrophils.

The third part of the work has focused on the production of oxidative standard protein (AOPP-BSA) for the development of ELISA systems to detect autoantibodies directed against epitopes of oxidized proteins.

INDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. PREFAZIONE E SCOPO | 1 |
| 2. INTRODUZIONE | 7 |
| 2.1. MODIFICAZIONI OSSIDATIVE DELLE PROTEINE | 9 |
| 2.1.1. ASPETTI CHIMICI | 9 |
| 2.1.1.1. <i>Radicali</i> | 9 |
| 2.1.1.2. <i>Formazione dei ROS</i> | 9 |
| 2.1.2. STRESS OSSIDATIVO | 10 |
| 2.1.2.1. <i>Ossidazione dei lipidi</i> | 11 |
| 2.1.2.2. <i>Ossidazione del DNA</i> | 12 |
| 2.1.2.3. <i>Ossidazione delle proteine</i> | 12 |
| 2.1.3. CARBONILI PROTEICI | 13 |
| 2.1.4. OSSIDAZIONE DELLA TIROSINA | 15 |
| 2.2. CARBONILI PROTEICI E PRODUZIONE DI AUTOANTICORPI | 16 |
| 2.3. STRESS OSSIDATIVO INDOTTO DALL'INFIAMMAZIONE | 18 |
| 2.4. MARCATORI DELLO STRESS OSSIDATIVO | 21 |
| 2.4.1. AOPP | 22 |
| 2.4.2. MDA | 24 |
| 2.4.3. GLUTATIONE (GSH) | 24 |
| 2.5. INFIAMMAZIONE | 27 |
| 2.5.1. IL SISTEMA IMMUNITARIO NELLA RISPOSTA INFIAMMATORIA | 27 |
| 2.5.2. IL PROCESSO INFIAMMATOIO | 28 |
| 2.5.2.1. <i>Il processo infiammatorio acuto: modificazioni vascolari</i> | 28 |
| 2.5.2.2. <i>Il processo infiammatorio acuto: intervento cellulare</i> | 32 |
| 2.5.2.3. <i>Il processo infiammatorio cronico</i> | 42 |
| 2.5.3. INFIAMMAZIONI PIU FREQUENTI NELLA BOVINA DA LATTE | 44 |
| 2.5.3.1. <i>Le mastiti</i> | 44 |
| 2.5.3.2. <i>Infiamazioni uterine post parto</i> | 45 |
| 2.5.3.3. <i>Le patologie podali</i> | 46 |
| 2.6. MARCATORI DI INFIAMMAZIONE | 49 |
| 2.6.1. APTOGLOBINA (Hp) | 49 |
| 2.6.2. VARIAZIONE DEI PARAMETRI LEUCOCITARI NEI PROCESSI INFIAMMATOIO NEL BOVINO | 51 |
| 2.6.3. INTERLEUCHINA 6 (IL-6) | 53 |
| 2.6.4. TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF α) | 54 |
| 2.6.5. INTERFERONE ALFA (INF- α) | 56 |
| 2.6.6. CORTISOLO | 57 |
| 2.6.7. DHEA | 59 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 3. | MATERIALI E METODI | 63 |
| 3.1. | AOPP (Advanced Oxidation Protein Products): | |
| | ANALISI BIOCHIMICHE E SPETTROFOTOMETRICHE | 65 |
| 3.1.1. | PREPARAZIONE DEGLI STANDARD | 65 |
| 3.1.2. | OSSIDAZIONE CON ACIDO IPOCLOROSO (HOCl) | 65 |
| 3.1.3. | OSSIDAZIONE CON CUMENE IDROPEROSSIDO (Cum-OOH) | 66 |
| 3.1.4. | RIDUZIONE CON SODIO BORO IDRIDE (NaBH ₄) | 66 |
| 3.1.5. | ANALISI BIOCHIMICHE DEGLI STANDARD | 67 |
| 3.1.6. | SAGGIO BRADFORD | 67 |
| 3.1.7. | DOSAGGIO DELLE AOPP | 68 |
| 3.1.8. | DETERMINAZIONE DEI CARBONILI TOTALI | 69 |
| 3.1.9. | ANALISI DEI RISULTATI | 69 |
| 3.1.10. | DERIVATIZZAZIONE PER SDS-PAGE | 69 |
| 3.1.11. | WESTERN BLOT | 71 |
| | <i>Separazione elettroforetica</i> | 71 |
| | <i>Trasferimento e colorazione</i> | 72 |
| | <i>Incubazione con anticorpo</i> | 72 |
| | <i>Reazione chemiluminescente</i> | 73 |
| | <i>Analisi densitometrica</i> | 73 |
| 3.2. | MONITORAGGIO DELLE AOPP NEL POST PARTO E NEL PROCESSO INFIAMMATOIO NELLA BOVINA DA LATTE | 74 |
| 3.2.1. | DOSAGGIO DELL'APTOGLOBINA | 75 |
| 3.2.2. | TITOLAZIONE DEL LISOZIMA | 75 |
| 3.2.3. | SAGGIO BRADFORD | 78 |
| 3.2.4. | DOSAGGIO DELLE AOPP | 78 |
| 3.2.5. | DOSAGGIO DEI T-BARS | 78 |
| 3.2.6. | DETERMINAZIONE DEL GSH TOTALE | 79 |
| 3.2.7. | DETERMINAZIONE DEI CARBONILI TOTALI | 80 |
| 3.2.8. | ANALISI RADIOIMMUNOLOGICA (RIA) | 80 |
| 3.2.9. | RIA SU MICROPIASTRA | 81 |
| 3.2.10. | DOSAGGIO DELL'INTERLEUCHINA 6 | 84 |
| 3.2.11. | DOSAGGIO DEL TNF- α | 84 |
| 3.2.12. | DOSAGGIO DELL' IFN- α | 85 |
| 3.2.13. | COLORAZIONE CON DIFF-QUICK PER LA VALUTAZIONE DELLO STRISCIO EMATICO | 85 |
| 3.2.14. | ELABORAZIONE DEI RISULTATI | 87 |
| 3.3. | TEST ELISA ED ANALISI ANTICORPALE VERSO LE PROTEINE OSSIDATE | 89 |
| 3.3.1. | PREPARAZIONE DELLA AOPP-BSA | 89 |
| 3.3.2. | DETERMINAZIONE DEGLI AUTOANTICORPI | 89 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 3.3.3. | VALUTAZIONE DEI PARAMETRI DELL'ANTISIERO_____ | 90 |
| | A Titolo anticorpale o test di diluizione_____ | 90 |
| | B Test di ripetibilità_____ | 91 |
| | C Specificità anticorpale_____ | 91 |
| 3.3.4. | VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI ANTICORPI MEDIANTE WESTERN BLOTTING_____ | 91 |
| 3.3.5. | ANALISI DEI RISULTATI_____ | 92 |
| 4. | RISULTATI E DISCUSSIONE_____ | 93 |
| 4.1. | AOPP (Advanced Oxidation Protein Products): | |
| | ANALISI BIOCHIMICHE E SPETROFOTOMETRICHE_____ | 95 |
| 4.1.1. | IDENTIFICAZIONE DELLA SPECIE OSSIDANTE CHE INFLUISCE SULLA FORMAZIONE DELLE AOPP_____ | 95 |
| 4.1.2. | VALUTAZIONE DELL'INTEGRITA' DEI SUBSTRATI PROTEICI_____ | 103 |
| 4.1.3. | SPECIE PROTEICHE RESPONSABILI DELLE AOPP_____ | 109 |
| 4.2. | MONITORAGGIO DELLE AOPP NEL POST PARTO E NEL PROCESSO INFIAMMATORIO NELLA BOVINA DA LATTE_____ | 115 |
| 4.2.1. | CORRELAZIONE TRA I VARI PARAMETRI_____ | 115 |
| 4.2.2. | VARIAZIONI FISILOGICHE DELLE AOPP_____ | 117 |
| 4.2.3. | CONFRONTO TRA MANZE E ANIMALI ADULTI_____ | 123 |
| 4.2.4. | CONFRONTO TRA ANIMALI SANI E ANIMALI SOGGETTI A PROCESSO INFIAMMATORIO_____ | 124 |
| 4.3. | TEST ELISA ED ANALISI ANTICORPALE VERSO LE PROTEINE OSSIDATE_____ | 140 |
| 4.3.1. | PREPARAZIONE DELLO STANDARD_____ | 140 |
| 4.3.2. | TITOLO ANTICORPALE O TEST DI DILUIZIONE_____ | 141 |
| 4.3.3. | TEST DI RIPETIBILITA'_____ | 142 |
| 4.3.4. | SPECIFICITA' DEL SEGNALE_____ | 143 |
| 5. | CONCLUSIONI_____ | 149 |
| 5.1. | AOPP (Advanced Oxidation Protein Products): | |
| | ANALISI BIOCHIMICHE E SPETROFOTOMETRICHE_____ | 151 |
| 5.2. | MONITORAGGIO DELLE AOPP NEL POST PARTO E NEL PROCESSO INFIAMMATORIO NELLA BOVINA DA LATTE_____ | 153 |
| 5.3. | TEST ELISA ED ANALISI ANTICORPALE VERSO LE PROTEINE OSSIDATE_____ | 154 |
| 6. | BIBLIOGRAFIA_____ | 157 |

1. PREFERAZIONE E SCOPO

Negli ultimi anni la ricerca ha dimostrato sempre maggior interesse verso lo stress ossidativo e i prodotti dell'ossidazione ad esso correlati. Questi ultimi sono stati considerati di notevole importanza in medicina umana nell'ambito di patologie quali Alzheimer (Smith *et al.*, 1992), cancro (Loft *et al.*, 2008), aterosclerosi (Gounopoulos *et al.*, 2007), nefropatie (Witko-Sarsat, V. 1998) morbo di Parkinson (Jenner, 2003), diabete (Kalousova, 2002), artrite (Seven *et al.*, 2008), nonché meccanismi fisiopatologici come l'invecchiamento (Ames *et al.*, 1993).

Tuttavia alcune ricerche hanno anche evidenziato un ruolo fondamentale delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nel regolare alcune attività fisiologiche e fisiopatologiche dell'apparato riproduttivo femminile come lo sviluppo follicolare, l'ovulazione, la funzionalità del corpo luteo, la fecondazione e lo sviluppo embrionale (Fujii *et al.*, 2005).

Alla luce di questo e della possibile correlazione tra prodotti dell'ossidazione e mortalità embrionale postulati nella donna (Guerin *et al.*, 2001), lo stress ossidativo ha suscitato notevole interesse nell'ambito della medicina e dell'allevamento delle bovine da latte, dove i problemi di fertilità negli ultimi decenni sono notevolmente aumentati (Lucy, 2007) in buona parte per mancato mantenimento della gravidanza, causando grosse perdite economiche (Royal *et al.*, 2000b; De Vries, 2006). Nelle bovine da latte, infatti, è stata evidenziata una importante incidenza di riassorbimento embrionale nelle prime fasi della gravidanza, e solo il 40% degli animali risulta gravido a 28 giorni dall'inseminazione (Santos *et al.*, 2004). In maniera simile, nelle donne, il 30-50% dei concepimenti termina con un aborto spontaneo, che avviene nella maggior parte dei casi nella fase di impianto e risulta associato alla presenza di stress ossidativo (Gupta *et al.*, 2007).

In uno studio di Iborra *et al.* (2005) viene riportato che patologie dell'apparato riproduttore come l'endometriosi, la sindrome dell'ovaio policistico, gli aborti ripetuti e l'ostruzione delle tube, sono correlate alla presenza di citochine infiammatorie, oltre che di elevati livelli di specie reattive dell'ossigeno. Va inoltre ricordato che lo stabilirsi della gravidanza induce un meccanismo immunosoppressivo generato da una serie di citochine che operano in maniera coordinata e complessa sia a livello locale che sistemico; questo garantisce l'innescamento dei cambiamenti molecolari e cellulari che garantiscono l'impianto e lo

sviluppo embrionale (Orsi, 2008). L'alterazione di questo meccanismo di "comunicazione" tra madre e feto, data dalle citochine stesse, può essere associato a fenomeni che vanno dall'aborto spontaneo all'insorgenza di danni cerebrali del feto (Orsi and Tribe, 2008). A causa di tutto questo risulta di fondamentale importanza comprendere quale sia la relazione tra stress ossidativo e gravidanza ed eventuali processi infiammatori in corso.

In un recente studio (Celi *et al*, 2010) campioni di sangue sono stati prelevati ad intervalli regolari in bovine da latte dopo l'inseminazione artificiale (IA), valutandone in particolar modo alcuni indicatori plasmatici di stress ossidativo. Parallelamente venivano svolte diagnosi di gravidanza ecografica a partire dal venticinquesimo giorno dall'IA, in modo tale da poter differenziare animali positivi (in cui l'IA dava origine ad una gravidanza), negativi (in cui l'IA non dava origine ad una gravidanza) e con riassorbimento embrionale (ovvero animali in cui la diagnosi risultava positiva ad una prima indagine ma non esitava in gravidanza).

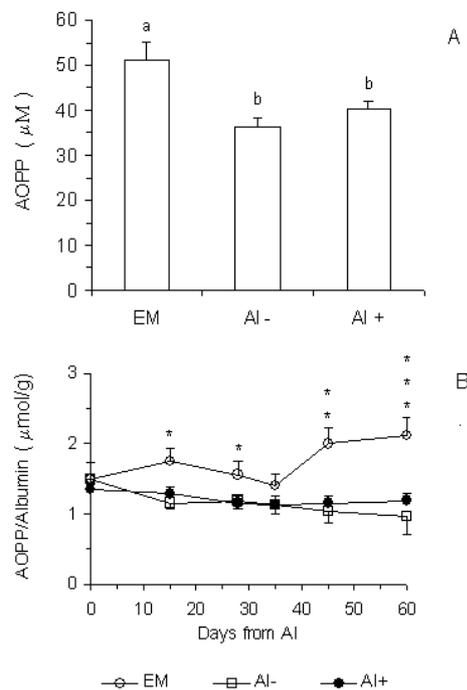


Figura 1.1 A: Variazioni dei livelli di AOPP in relazione all'esito della fecondazione artificiale. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. (P<0.01) B: Variazioni dei rapporti AOPP/albumina in relazione all'esito dell'inseminazione artificiale e al numero di giorni trascorsi da questa. Il valore AOPP/albumina è risultato significativamente più elevato negli animali in cui si riscontrava morte embrionale. Gli asterischi indicano medie significativamente differenti: *: P<0.05; **: P<0.01; ***: P<0.001. EM: morte embrionale; AI-: animali con diagnosi di gravidanza negativa dopo inseminazione artificiale; AI+: animali con diagnosi di gravidanza positiva dopo inseminazione artificiale. (Celi *et al.*, 2010)

Tra gli indici valutati è stato evidenziato che uno di questi, ovvero le *advanced oxidation protein products* (AOPP), risultava variare in maniera statisticamente significativa nel gruppo di animali che mostrava riassorbimento embrionale (fig. 1.1.).

Pertanto nel corso del triennio del dottorato l'attenzione è stata focalizzata sullo studio della natura chimica e del ruolo biologico delle AOPP nella bovina da latte.

Le AOPP sembrano derivare da reazioni tra proteine plasmatiche e ossidanti clorurati (Witko-Sarsat *et al.* 1999; Fialova *et al.*, 2006; Noyan *et al.*, 2006) ma, essendo lo studio di queste molto recente, il loro ruolo è ancora scarsamente compreso.

Questo lavoro di tesi si articola in tre parti.

- La prima parte dello studio ha lo scopo di acquisire informazioni sulla natura biochimica e molecolare delle *advanced oxidation protein products* (AOPP), individuando le possibili proteine che ne fanno parte, ed è caratterizzato da una messa a punto delle metodiche di laboratorio per identificare gli agenti ossidanti che maggiormente influiscono sulla formazione di queste proteine. Essendo l'albumina la proteina plasmatica maggiormente presente e con funzione di antiossidante endogeno (Himmelfarb e McMonagle, 2001; Davies, 1987) si è scelta come antigene da ossidare ad AOPP-BSA (Witko-Sarsat *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1996) per essere utilizzata come standard per l'applicazione di successive metodiche.
- Poiché in letteratura alcuni autori hanno evidenziato una correlazione tra stress ossidativo, capacità antiossidante totale plasmatica e stato metabolico e produttivo dell'animale (Bernabucci *et al.*, 2005; Gaal *et al.*, 2006; Castillo *et al.*, 2005), nella seconda parte si è cercato di correlare la variazione delle AOPP, come indicatore di stress ossidativo, nei vari stadi produttivi delle bovine da latte in modo da evidenziare se tali variazioni siano in qualche modo correlate alla variazione delle AOPP. Inoltre, poiché la formazione delle AOPP è tipica degli ossidanti clorurati che vengono prodotti per opera dell'enzima mieloperossidasi (MPO), si è valutata anche la reazione tra processi infiammatori acuti e cronici e livelli plasmatici di AOPP. Il fatto che le AOPP siano elevate negli animali che vanno incontro a riassorbimento embrionale potrebbe quindi essere giustificato da un processo infiammatorio subclinico che

determina sia l'aumento del parametro, sia i fenomeni che conducono all'incapacità di portare a termine la gravidanza.

- Come è noto, in seguito alle modificazioni strutturali operate dai ROS le proteine ossidate acquisiscono nuove proprietà antigeniche presentando gruppi funzionali in grado di determinare la produzione di anticorpi (Palinski *et al.*, 1989; Palinski *et al.*, 1995; Marsche *et al.*, 2002). Le proteine così modificate dai processi ossidativi possono manifestare attività pro-infiammatoria (Kalousova *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2008) ed anche se questo meccanismo non è ancora stato dimostrato, probabilmente stimolano la produzione di auto-anticorpi (Shanti *et al.*, 1999; Palinski and Witztum, 2000; Kurien *et al.*, 2006). Su queste indicazioni si è sviluppata l'ultima parte di questo lavoro che è caratterizzata da una messa a punto della metodica ELISA e da una ricerca di auto-anticorpi contro AOPP-BSA nel siero di animali affetti da patologie infiammatorie.

2. INTRODUZIONE

2.1. MODIFICAZIONI OSSIDATIVE DELLE PROTEINE

2.1.1. ASPETTI CHIMICI

2.1.1.1. Radicali

Si definisce radicale una specie chimica con vita media molto breve, che presenta un elettrone spaiato nell'orbitale più esterno. Tale elettrone rende il radicale una particella estremamente reattiva, in grado di legarsi ad altri radicali o di sottrarre un elettrone ad altre molecole vicine. I radicali giocano un ruolo importante in fenomeni come la combustione, la polimerizzazione e nella fotochimica, ed in molti altri processi chimici, compresi quelli che riguardano la fisiologia cellulare.

I più abbondanti radicali liberi nei sistemi biologici sono i radicali dell'ossigeno *Reacting Oxygen Species* (ROS) e i loro metaboliti *reactive oxygen metabolites* (ROMs) (Miller *et al.*, 1993).

| Radicale | ROS | Radicale | RNO |
|------------------------|------------------------|-------------------|-----------------|
| Ossigeno singoletto | $^1\text{O}_2$ | Monossido d'azoto | NO |
| Anione superossido | $\text{O}_2^{\cdot-}$ | Diossido d'azoto | NO_2 |
| Perossido d'idrogeno | H_2O_2 | Perossinitrito | NO_3^- |
| Radicale idrossile | $\text{HO}\cdot$ | | |
| Radicale idroperossido | $\text{HOO}\cdot$ | | |
| Acido ipocloroso | HOCl | | |
| Radicale perossile | $\text{LOO}\cdot$ | | |

Tab. 2.1. : radicali liberi nei sistemi biologici

2.1.1.2. Formazione dei ROS

I ROS sono le specie reattive a maggior diffusione e sono prodotti durante il normale metabolismo cellulare (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). Si possono formare per reazione diretta dell'ossigeno molecolare con cationi (generalmente ferro, zinco e rame) non chelati presenti nel circolo sanguigno, nell'interstizio cellulare o nei fluidi intracellulari, o enzimaticamente, mediante appunto

l'enzima NADPH ossidasi per poi andare incontro ad una serie di reazioni biochimiche.

La loro formazione può essere incrementata da particolari condizioni dell'ambiente esterno quali ad esempio l'esposizione a radiazioni ionizzanti, l'incremento della pressione dell'ossigeno o la presenza nel mezzo di agenti ossidanti.

I ROS avendo almeno un elettrone disaccoppiato sono particolarmente instabili e reattivi verso le altre biomolecole e si formano continuamente come normali prodotti del metabolismo cellulare (Reilly *et al.*, 1991).

In concentrazioni molto basse sono indispensabili per i processi fisiologici della cellula ed hanno solitamente un significato fisiologico, di "modulazione" viceversa concentrazioni maggiori finiscono facilmente per produrre disfunzioni a carico delle numerose proteine coinvolte nelle catene di trasduzione intracellulare dei segnali come le fosforilazioni delle proteine, attivazione dei fattori di trascrizione, differenziamento cellulare, immunità cellulare, difesa contro i microorganismi (Hoidal 2001, Agarwal *et al.*, 2005; Georgieva, 2005;) determinando disfunzioni gravi con inevitabile danno cellulare, apoptosi o necrosi.

2.1.2. STRESS OSSIDATIVO

Il termine "stress ossidativo", entrato negli ultimi anni nel lessico biomedico quotidiano, indica l'insieme delle alterazioni che si producono nei tessuti, nelle cellule e nelle macromolecole biologiche allorché queste rimangono esposte ad un eccesso di agenti ossidanti sia endogeni che esogeni. Un corretto bilanciamento tra sostanze ossidanti ed antiossidanti (il cosiddetto equilibrio ossido riduttivo o equilibrio redox) è essenziale per tutta una serie di funzioni fisiologiche, in quanto numerose proteine coinvolte nelle catene di trasduzione intracellulare dei segnali (recettori, chinasi e fosfatasi, fattori di trascrizione) sono sensibili ad alterazioni anche lievi di tale equilibrio (Castillo *et al.*, 2005; Sies 1991, Bernabucci *et al.*, 2002).

Lo stress ossidativo porta inevitabilmente ad un danno cellulare che si manifesta con alterazioni:

- 1) sui fosfolipidi delle membrane, fino alla distruzione delle stesse con perdita della compartimentazione e dei trasporti selettivi; (Reilly *et al.*, 1991)
- 2) sugli acidi nucleici, con accumulo di mutazioni ed alterazioni dell'espressione genica; (Imlay and Linn, 1988)
- 3) sulle proteine, dove l'ossidazione dei residui di cisteina e di altri aminoacidi finisce per causare alterazioni della struttura (Davies, 1987; Davies *et al.*, 1987) e perdita di funzione – enzimatica, di trasporto, recettoriale, ecc.

2.1.2.1. Ossidazione dei lipidi

Una notevole suscettibilità al danno da ROS è evidenziata dai fosfolipidi di membrana e dai trigliceridi nelle lipoproteine che subiscono un processo a catena noto come perossidazione lipidica (LPO).

Il processo di ossidazione dei lipidi ha inizio con la sottrazione di un atomo di idrogeno da un acido grasso polinsaturo (PUFA) da parte di qualsiasi specie radicalica.

A seguito di tale estrazione si forma un radicale che subisce una parziale stabilizzazione, trasformandosi nel radicale di un diene coniugato. Questo, a sua volta, reagisce con l'ossigeno molecolare formando il radicale perossilico (LOO•), il quale può estrarre un idrogeno da un acido grasso adiacente formando, così, un idroperossido lipidico e propagando il processo di perossidazione (Del Rio *et al.*, 2005)

L'ossidazione dei lipidi avviene anche per opera dell'acido ipocloroso (di derivazione neutrofila – infiammatoria) che reagisce con gli alcheni convertendo gli acidi grassi a cloridrine (Winterbourn, 1992) e il colesterolo ad una miscela di epossidi e idrossi-derivati (van den Berg *et al.*, 1993).

I perossidi lipidici possono reagire ulteriormente e fornire prodotti terminali di lipossilazione avanzata (ALEs, *Advanced Lipoxylation End products*) come perossidi ciclici, aldeidi α,β -insature come la 4-idrossi nonenale (4-HNE), la acroleina, e la malondialde (MDA) (Gutteridge, 1995). Oltre alle aldeidi per decomposizione si formano alcoli (pentano, etano), i dieni 2,3 trans-coniugati, gli isoprostani ed il colesterolo-ossidi.

L'effetto più evidente della perossidazione lipidica consiste nella diminuzione della fluidità della membrana, nell'alterazione della sua permeabilità con conseguente alterazione del trasporto ionico.

2.1.2.2. Ossidazione del DNA

Il DNA è danneggiato, principalmente, dal radicale ossidrilico che reagisce con le basi puriniche e pirimidiniche formando 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG) e con lo scheletro di ribosio-fosfato provocando cross-linking e scissione dell'elica. Durante il processo di riparazione in vivo del DNA, e soprattutto in seguito alla degradazione degli acidi nucleici conseguente alla morte cellulare, la 8-OHdG viene liberata e secreta nelle urine sia come base singola sia inclusa in oligomeri di DNA senza ulteriori modifiche.

Le modificazioni agli acidi nucleici inducono modificazioni genetiche che causano danni letali e/o mutageni per la cellula e che potrebbero essere alla base dei meccanismi di insorgenza del cancro (Loft *et al.*, 2008) e dell'invecchiamento cellulare (Imlay and Linn, 1988; Takahashi *et al.*, 2000).

Particolarmente suscettibile alle ROS è il DNA mitocondriale, sia perché esso si trova a stretto contatto con un'importante fonte di produzione delle ROS, sia perché non è associato, come quello nucleare, a proteine istoniche che possono fungere da sistema di cattura per tali specie (Sugino, 2006).

2.1.2.3. Ossidazione delle proteine

Anche le proteine rappresentano un target dell'attività ossidante dei ROS. Le alterazioni cui possono andare incontro a seguito della reazione con i radicali dell'ossigeno comprendono l'ossidazione delle catene laterali amminoacidiche, il cross-linking tra proteine, la degradazione dei legami peptidici, la formazione di legami covalenti con prodotti dell'ossidazione lipidica o glucidica e la frammentazione delle proteine stesse (Davies, 1987; Berlett and Stadtman, 1997; Davies *et al.*, 1999).

Studi condotti sull'albumina sierica bovina hanno permesso di evidenziare che la specie reattiva dell'ossigeno maggiormente coinvolta nell'ossidazione proteica risulta essere il radicale ossidrilico, mentre gli amminoacidi più sensibili all'ossidazione sono quelli contenenti gruppi aromatici, tiolici, ma anche i residui alifatici come il triptofano, la tirosina, l'istidina e la cisteina (Spiteller, 2006). L'alterazione della struttura primaria delle proteine si riflette quindi anche sulle altre strutture, causando alterazioni della conformazione proteica e alterando

così il normale processo proteolitico innescato dalle proteasi. In particolare una conformazione proteica lievemente aperta è soggetta ad una maggior attività proteasica. Allo stesso modo le proteine lievemente ossidate sono maggiormente sottoposte ad attività proteolitica, al contrario di quelle significativamente alterate che talvolta sono meno suscettibili alle proteasi (Moller *et al.*, 2004). Questa potrebbe quindi essere la causa dell'accumulo di alcune proteine nei tessuti.

I principali biomarcatori di ossidazione delle proteine sono:

a) i carbonili proteici

b) i prodotti di ossidazione della tirosina

2.1.3. CARBONILI PROTEICI

I carbonili proteici, PCO, (figura 2.1.) sono un generico prodotto di ossidazione delle biomolecole, sulle proteine possono essere generati tramite ossidazione diretta degli aminoacidi tirosina (Tyr), lisina (Lys), prolina (Pro), arginina (Arg), metionina (Met), e troptofano (Trp) da parte di radicali liberi (Dean *et al.* 1997), oppure in conseguenza a fenomeni di lipoperossidazione (LPO), legame di α - β -aldeidi insature su residui di istidina (His), lisina (Lys), cisteina (Cys) o di glicazione/glicossidazione (reazione tra un carboidrato e un amino-gruppo proteico) con formazione dei composti finali di glicazione (Stadtman *et al.*, 1997).

Come è indicato in figura 2.1. in seguito alle modificazioni strutturali e all'introduzione di nuovi gruppi funzionali (quali ossidrili, aldeidi o zuccheri), le proteine ossidate possono acquisire nuove proprietà antigeniche e divenire prodotti di lipoperossidazione *advanced lipoxidation end products* (ALEs) di glico-ossidazione *advanced glycation end products* (s) o di ossidazione diretta *advanced oxidation protein products* (AOPPs).

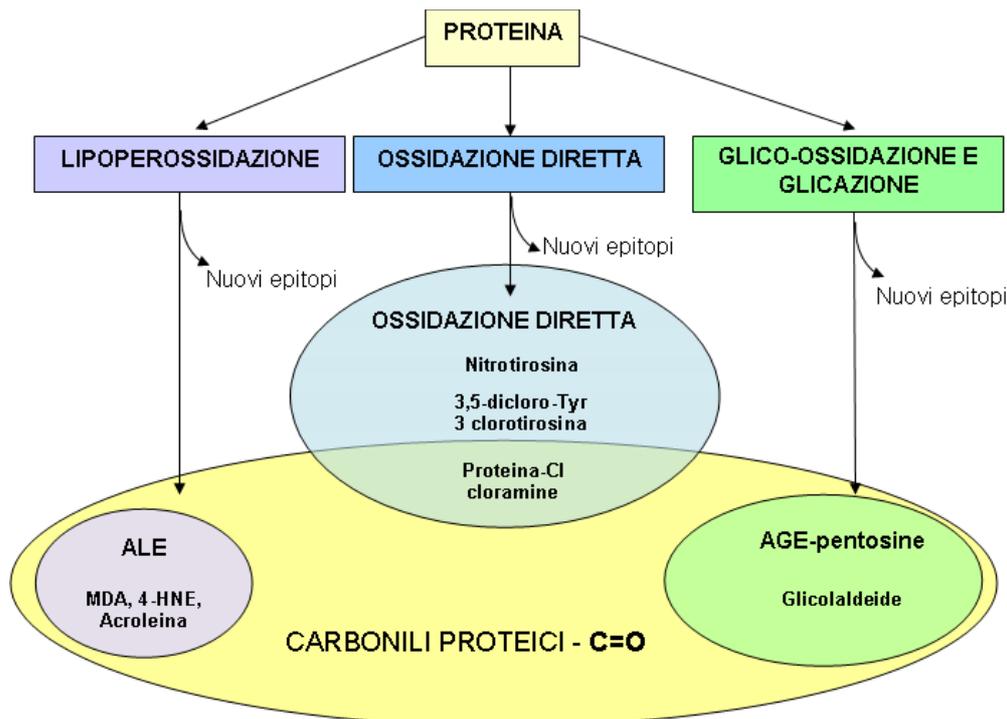


Fig. 2.1: Tre possibili vie di ossidazione delle proteine con conseguente introduzione di gruppi carbonilici e formazione di nuovi epitopi.

Un accumulo di carbonili proteici è stato dimostrato nell'invecchiamento cellulare, nel danno da ischemia/riperfusion, nelle infiammazioni croniche, nella fibrosi cistica (Dalle-Donne *et al.*, 2003), ma anche in disfunzioni patologiche croniche come il diabete mellito, aterosclerosi, patologie renali croniche, ed eventuali reazioni autoimmuni (Kalousova *et al.*, 2005; Shanti *et al.*, 1999).

Una fonte importante di produzione di ROS sono i neutrofili, cellule altamente specializzate che non solo hanno la capacità di eliminare la maggior parte dei microrganismi patogeni, ma sono citotossici verso i tessuti che li ricevono (Weiss, 1989). Se stimolati producono elevate quantità di specie ossidanti come lo ione superossido (O_2^-) che è catalizzato dalla superossido dismutasi (SOD) a formare perossido d'idrogeno (H_2O_2). La maggior parte di questa è convertita a acido ipocloroso (HOCl) dall'azione della mieloperossidasi. L'acido ipocloroso è un potente ossidante che reagisce prontamente con molte ed importanti molecole biologiche. E' particolarmente reattivo verso i tioli, ascorbato, e gruppi aminici, con le quali forma delle clorammine molto reattive (Thomas *et al.*, 1983; Winterbourn, 1985). Gli aminoacidi clorinati hanno una rapida decomposizione, viceversa le proteine clorinate presentano una resistenza alla degradazione più lunga e mantengono la loro capacità ossidativa. (Thomas, 1979)

Pertanto la formazione di gruppi carbonilici sulle proteine è considerato un marcatore di stress ossidativo severo e generalizzato, dalla sua analisi non è possibile estrapolare quale sia l'origine delle ROS/RNS responsabili delle reazioni pro-ossidanti, d'altra parte rappresentano un prodotto di ossidazione chimicamente stabile (Stadtman and Levine, 2003).

La misura totale dei carbonili proteici può essere condotta su campioni di plasma, siero, lisati cellulari, proteine purificate e prevede la derivatizzazione di tali gruppi con il composto dinitrofenil-idrazina (DNPH). Dalla reazione si genera un cromoforo idrazone con un picco di assorbimento a 360 nm e un coefficiente di estinzione molare di 22000 M⁻¹cm⁻¹ (Levine *et al.*, 1994; Reznick *et al.*, 1994). La determinazione spettrofotometrica diretta è poco utilizzata perché non fornisce informazioni sull'identità delle proteine ossidate, per questo è piuttosto associata a tecniche cromatografiche o elettroforetiche (SDS-PAGE, bidimensionale) per la separazione delle proteine.

2.1.4. OSSIDAZIONE DELLA TIROSINA

L'aggregazione proteica è una conseguenza frequente dei fenomeni di ossidazione, ad essa potrebbe contribuire alla formazione dei dimeri di Tyr (di-Tyr), tuttavia alcuni autori hanno dimostrato che la formazione del dimero è significativa solo nelle metallo-proteine nelle quali l'intermedio radicalico di reazione è stabilizzato dallo ione metallico associato. I principali prodotti di addizione all'anello fenolico della Tyr, sia come aminoacido libero che facente parte di una proteina, sono:

- a) L-DOPA, generata dalla reazione con il radicale idrossile;
- b) 3-cloro-Tyr e 3,5-dicloro-Tyr, prodotto di reazione con l'acido ipocloroso (HClO) (figura 2.1.);
- c) 3-bromo-Tyr e 3,5-dibromo-Tyr, prodotto di reazione con l'acido ipobromoso (HBrO);
- d) 3-nitro-Tyr (NO₂-Tyr), che si forma in seguito a reazione con il monossido di azoto (NO) o l'anione perossinitrito (NO₃⁻). I prodotti di ossidazione delle Tyr rappresentano un marcatore di danno radicalico diretto sulle proteine/aminoacidi a differenza dei gruppi carbonili che possono generarsi in

conseguenza a LPO e glico-ossidazione. D'altra parte l'analisi dei prodotti di ossidazione delle Tyr è più complicata perché solo le tecniche di cromatografia liquida o gas cromatografia associate a spettrometria di massa garantiscono una sufficiente specificità e sensibilità per la rivelazione e quantificazione di queste molecole. Inoltre è necessario utilizzare uno standard interno per valutare eventuali alterazioni dovute alla manipolazione del campione (Duncan, 2003; Dalle-Donne *et al.*, 2006).

La cloro-Tyr, bromo-Tyr e in parte la NO₂-Tyr rappresentano prodotti di ossidazione di origine infiammatoria in quanto i macrofagi e i neutrofilii attivati rilasciano sia l'anione superossido sia l'NO con successiva formazione di perossinitrito, e sono in grado di produrre HClO tramite una reazione catalizzata dall'enzima mieloperossidasi (Witko-Sarsat *et al.*, 1996; Witko-Sarsat *et al.*, 2000) mentre gli eosinofili attivati sono una fonte di HBrO.

2.2. CARBONILI PROTEICI E PRODUZIONE DI AUTOANTICORPI

L'ipotesi che le proteine ossidate possano essere riconosciute dall'organismo come sostanze non-self, e quindi in grado di stimolare la produzione di anticorpi, è nata da uno studio condotto sull'ossidazione dell'LDL in relazione all'aterosclerosi (Palinski *et al.*, 2000).

Durante i processi di stress ossidativo le molecole maggiormente coinvolte risultano essere i fosfolipidi e in particolar modo i PUFA: i prodotti dell'ossidazione di questi possono essere aldeidi estremamente reattive come la malondialdeide (MDA) o il 4-idrossinonenale (4-HNE), o fosfolipidi ossidati. Entrambi questi composti possono legarsi a proteine o lipidi creando quindi un insieme molto eterogeneo di prodotti: gli *advanced lipoxidation end products* (ALEs) (Palinski *et al.*, 2000). Considerato che i neoepitopi formati dalla modificazione dell'istidina e della lisina sono particolarmente immunogenici e che l'apoB contenuta nell'LDL è ricca di quest'ultimo amminoacido, si è dimostrato che anticorpi contro MDA-lisina o 4-HNE-lisina venivano prodotti in topi dopo la somministrazione di omologhi dell'LDL modificato in vitro (Palinski *et al.*, 1989). Così come alterazioni strutturali indotte dell'albumina (MDA-HSA)

rivelano la presenza di autoanticorpi in pazienti affetti da sindrome ovarica policistica (Palacio *et al.*, 2006). Risultati simili sono stati riscontrati in altre patologie umane come arterosclerosi, diabete e lesioni renali (Maggi *et al.*, 1994).

Anche gli *advanced glycation end products* (AGEs) introducono nuove strutture antigeniche tra le quali la più rappresenta è la N-epsilon-(carbossimetil)-lisina (Shi *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2009) che è in grado di indurre la formazione di autoanticorpi (Palinski *et al.*, 1995; Reaven *et al.*, 1997). Recenti studi hanno dimostrato che la glicosilazione delle IgG su pazienti affetti da diabete è correlata con un'alterata fissazione del complemento e con cambiamenti dell'immunoreattività e del legame antigene anticorpo (Goodarzi *et al.*, 2004).

L'ossidazione diretta delle proteine *advanced oxidation protein products* (AOPPs) con HClO porta alla formazione di nuovi epitopi (Cl-Tyr e cloroammine). Infatti le LDL modificate con HClO (Marsche *et al.*, 2002) sono state utilizzate per produrre anticorpi utilizzati poi in studi di immunostochimica su lesioni aterosclerotiche umane e nelle malattie infiammatorie degenerative renali (Malle *et al.*, 1997).

Ciò significa che l'organismo è in grado di produrre anticorpi nei confronti di lipidi o proteine che hanno subito un danno ossidativo: questo concetto, nell'ambito di questo lavoro, potrebbe rappresentare un fondamentale punto di partenza per ulteriori studi.

Si può quindi concludere che i prodotti derivanti dai processi ossidativi possono

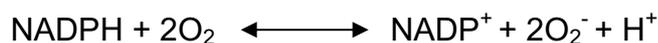
- accumularsi nei tessuti, essendo meno sensibili a meccanismi di riconoscimento e proteolisi (Moller *et al.*, 2004). Questo è ciò che accade nel processo di invecchiamento (Smith *et al.*, 1992; Ames *et al.*, 1993) nell'aterosclerosi (Matsuura *et al.*, 2008) o morbo di Alzheimer (Smith Greenwood, 2008)
- agire da neoepitopi con conseguente formazione di autoanticorpi che potenziano l'attivazione dei mediatori dell'infiammazione come accade nell'aterosclerosi (Palinski *et al.*, 2000) o nell'endometriosi (Shanti *et al.*, 1999; Segal *et al.*, 1978).

2.3. STRESS OSSIDATIVO INDOTTO DALL'INFIAMMAZIONE

La comparsa dello stress ossidativo può essere legata a vari fenomeni che comportano l'aumento dei ROS, come le alterazioni della pressione parziale dell'ossigeno a livello tissutale, l'attività di alcuni xenobiotici, la carenza di vitamine A, E e C, l'invecchiamento e le flogosi. In particolare, nei processi flogistici, le cellule in grado di fare fagocitosi (come i neutrofili e i macrofagi) riconoscono la sostanza estranea e la incorporano all'interno di vacuoli formando i *fagosomi*. A seguito della fusione di questi ultimi coi lisosomi prendono origine i *fagolisosomi* (Rosati *et al.*, 1997), mentre il processo di rilascio dei granuli nel fagosoma prende il nome di *de-granulazione*. I granuli lisosomiali contengono enzimi in grado di distruggere un'ampia gamma di sostanze biologiche comprese le membrane cellulari batteriche, collagene, elastina e mucopolisaccaridi (Fantone *et al.*, 1982). I neutrofili e i macrofagi, allo scopo di eliminare la sostanza estranea, attivano quindi dei meccanismi ossigeno-dipendenti, dando origine al fenomeno che prende il nome di *respiratory burst* con un aumento delle richieste di ossigeno da parte delle cellule coinvolte, glicogenolisi, aumento dell'ossidazione del glucosio attraverso la via dell'esoso monofosfato e produzione di ROS. Le specie reattive dell'ossigeno prodotte in misura maggiore sono l'anione superossido (O_2^-) e il perossido di idrogeno, derivanti dall'attività dell'enzima nicotinamide-adenina-dinucleotide-ossidasi (NADPH ossidasi) (Robinson *et al.*, 2004). La NADPH ossidasi è un complesso costituito da due componenti di membrana che formano la componente catalitica del flavocitocromo b_{588} (gp91^{PHOX} e p22^{PHOX}) (Segal, Jones 1978, Dinauer *et al.* 1987, Parkos *et al.* 1988), tre componenti citosoliche (p67^{PHOX}, p47^{PHOX} e p40^{PHOX}) (Wientjes *et al.*, 1996; Wientjes *et al.*, 1993; Zhan *et al.*, 1998; Lapouge *et al.*, 2002), e una GTP-asi a basso peso molecolare (rac1 o rac2) (Quinn *et al.*, 1993; Abo *et al.*, 1994; Bokoch, 1994, Kreck *et al.*, 1996). Vista la capacità della NADPH ossidasi di dare origine a composti tossici, esiste una fine regolazione nell'attivazione dell'enzima. Gli stimoli che sono in grado di attivarla comprendono le particelle che vengono fagocitate, alcune molecole chemotattiche, alcuni lipidi e gli anticorpi (Robinson, 2008). In questi casi la porzione citoplasmatica si unisce a quella del flavocitocromo b_{588} , mentre la rac2 si dissocia dal suo inibitore e lega il GTP

(Bokoch *et al.*, 2002). L'enzima così attivato trasporta elettroni dal NADPH del versante citoplasmatico all'ossigeno contenuto nel liquido extracellulare o all'interno del fagosoma (quando la membrana è invaginata) formando così anione superossido (Klebanoff, 2005).

La reazione catalizzata dalla NAPH ossidasi può essere così riassunta:



A questo punto la reazione di dismutazione di due molecole di anione superossido (in cui una viene ossidata, mentre l'altra viene ridotta) e 2 protoni, dà origine a perossido di idrogeno (H_2O_2) e ossigeno molecolare (O_2). Questa reazione può essere spontanea (soprattutto a pH acido) o mediata dall'enzima superossido dismutasi (SOD), anche se non esistono studi che dimostrino il rilascio della SOD neutrofilica all'interno del fagosoma e si suppone invece che questa possa essere una componente dell'organismo fagocitato (Klebanoff, 2005). Allo stesso tempo, a partire da anione superossido e perossido di idrogeno, possono essere prodotti altri ROS, come il radicale idrossile ($\text{OH}\cdot$) (Beckman *et al.*, 1990; Ramos *et al.*, 1992), ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$) (Corey *et al.*, 1987; Steinbeck *et al.*, 1992) e ozono (O_3) (Wentworth *et al.*, 2002).

Una buona parte del perossido di idrogeno prodotto dai neutrofili viene convertito ad acido ipocloroso, un potente microbicide, ad opera dell'enzima mieloperossidasi (MPO) (Klebanoff, 1970). La MPO è una glicoproteina costituita da 4 catene polipeptidiche, contenente un gruppo eme (responsabile del colore verde della molecola). Questo enzima rappresenta la maggiore costituente dei granuli azzurrofilici (Lemansky, 2003).

L'acido ipocloroso così prodotto può reagire con i composti contenenti azoto per formare derivati come le monocloramine e le dicloramine, che possono essere poi degradate alle corrispondenti aldeidi (Hazen *et al.*, 1998a; Hazen *et al.*, 1998b). La taurina che è presente ad alte concentrazioni nel citoplasma dei neutrofili reagisce con HOCl formando N-cloro taurina, meno tossica dell'acido ipocloroso: questo meccanismo permette ai neutrofili di proteggersi dal rilascio di HOCl nel citoplasma (Shuller-Levis and Park, 2003). Anche la tirosina può essere convertita ad opera dell'HOCl in 3-cloro-tirosina o 3,5-di-cloro-tirosina (Hazen *et al.*, 1996; Domigan *et al.*, 1995). Anche se non è noto se la

clorinazione della tirosina possa danneggiare microrganismi o tessuti, essa viene usata come marker dell'attività mieloperossidasi (Winterbourn, 2002). Inoltre MPO e H_2O_2 possono indurre alterazioni della tirosina senza mediazione dell'acido ipocloroso, formando dei radicali che, tramite fenomeni di cross-linking, danno origine a ditirosina (Savenkova *et al.*, 1994; Jacob *et al.*, 1996; Heinecke *et al.*, 1993b). Un ultimo composto derivante dall'alterazione della tirosina è la 3-nitro-tirosina, la cui presenza è stata dimostrata nelle aree sottoposte a flogosi (Ischiropoulos, 1998), tanto da poter essere usato come marker di infiammazione. I macrofagi attivati sono infatti in grado di stimolare l'azione dell'enzima ossido-nitrico sintetasi inducibile (iNOS) producendo così rilevanti quantità di ossido nitrico ($NO\cdot$), oltre che produrre superossido grazie all'attività della NADPH-ossidasi (Piroddi *et al.*, 2006). La combinazione di $NO\cdot$ e anione superossido dà origine a perossinitrito (ONO_2^-) (Saran *et al.*, 1990; Koppenol *et al.*, 1992; Huie *et al.*, 1993) in grado di ossidare i gruppi sulfidrilici proteici o non (Radi *et al.*, 1991). La reazione tra perossinitrito e anidride carbonica dà quindi origine a molecole che inducono processi di idrossilazione e nitratura delle proteine (Alvarez *et al.*, 2003). È stato inoltre dimostrato che la produzione di nitrotirosina può essere legata ad un meccanismo dipendente dalla MPO, in grado di produrre una potente specie reattiva dell'azoto, ovvero il diossido di azoto (NO_2) (Baldus *et al.*, 2001).

Anche le lipossigenasi (LOX) e le ciclossigenasi (COX) svolgono un ruolo fondamentale nel determinare lo stress ossidativo durante i processi infiammatori. L'acido arachidonico, contenuto nelle membrane cellulari, viene rilasciato grazie all'attività di una fosfolipasi e viene quindi metabolizzato da LOX e COX dando origine a una serie di eicosanoidi tra cui prostaglandine, trombossani e leucotrieni (Funk, 2001) (Samuelsson *et al.*, 1987). Durante le reazioni catalizzate dalla LOX possono essere generati alcuni prodotti dell'idroperossidazione dell'acido arachidonico che possono fungere da ROS (Schweiger *et al.*, 2007; Uchida 2003; Brash, 1999). Inoltre alcuni prodotti derivanti dall'attività della LOX (come l'acido 12-idrossieicosatetraenoico (12S-HETE), l'acido 15-idrossieicosatetraenoico (15S-HETE) e i leucotrieni) possono indurre l'attività della NADPH-ossidasi con conseguente generazione di ROS (Luchtefeld *et al.*, 2003; de Carvalho *et al.*, 2008). Similmente la COX, trasformando l'acido arachidonico in prostaglandina H_2 (PGH_2), innesca la

reazione che dà origine ad una serie di metaboliti (tra cui la prostaglandina F_{2α}) in grado di stimolare l'attività della NADPH-ossidasi (Katsuyama *et al.*, 2002). Alcuni studi (Kim and Dinnauer, 2006; Shiose Sumimoto, 2000) hanno dimostrato che l'acido arachidonico stesso è in grado di indurre l'attivazione della NADPH ossidasi.

Un ultimo enzima coinvolto nel meccanismo di stress ossidativo innescato dal processo infiammatorio sembra essere la xantina ossidasi. Questa è una flavoproteina contenente molibdeno e ferro in grado di ossidare l'ipoxantina a xantina ed acido urico. L'ossidante che viene utilizzato in entrambe le reazioni è l'ossigeno molecolare, che viene ridotto a perossido di idrogeno (Berg *et al.*, 2003). Anche se il ruolo della xantina ossidasi nelle cellule infiammatorie risulta poco chiaro, uno studio di Hellsten *et al.*, (1997) dimostrò l'esistenza di una correlazione tra processo infiammatorio e quantità di enzima presente in fibre muscolari dopo esercizio intenso. Questo aumento risultò essere legato prevalentemente al rilascio dell'enzima da parte delle cellule endoteliali e dei leucociti: i neutrofilii attivati in particolar modo sembrano essere in grado di stimolare la conversione della xantina deidrogenasi in xantina ossidasi nelle cellule endoteliali stesse (Wakabayashi *et al.*, 1995).

2.4. MARCATORI DELLO STRESS OSSIDATIVO

Un biomarcatore è definito come una sostanza quantificabile, particolarmente resistente alla degradazione, utilizzata quale indicatore di un particolare stato biologico, normale o patologico, o come indice di risposta a una terapia farmacologica. Secondo questa definizione possono essere considerati marcatori di stress ossidativo sia i prodotti di ossidazione delle biomolecole (acidi nucleici, lipidi, proteine) ma anche il consumo degli antiossidanti.

In questo lavoro di tesi sono stati scelti alcuni marcatori che possono dare un quadro generale dello stato fisiologico, ossidativo ed infiammatorio.

2.4.1. AOPP

Le *advanced oxidation protein products* (AOPP) sono i prodotti della reazione delle proteine plasmatiche con gli ossidanti clorurati prodotti dalla MPO (Fialova *et al.*, 2006; Noyan *et al.*, 2006). La mieloperossidasi è responsabile della produzione di AOPP in vari modi sia tramite l'attività del 2HOCl , sia dall'azione derivante dalla capacità propria dell'enzima (figura 2.2.).

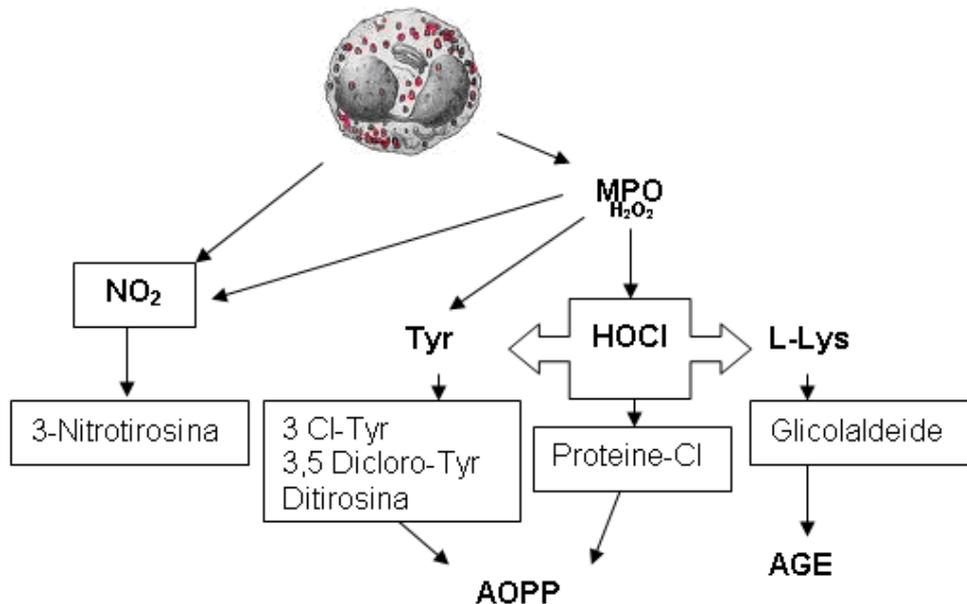


Fig. 2.2. Produzione delle AOPP tramite MPO.

L'azione diretta dell' HOCl sulle proteine plasmatiche è responsabile della produzione di proteine clorate e clorammine (Witko-Sarsat *et al.*, 1998). Alcuni di questi intermedi hanno una emivita molto breve e vengono facilmente idrolizzati a formare aldeidi, ammoniaca ed anidride carbonica con conseguente rapido incremento dei carbonili totali (Hawkins and Davies, 1998).

La MPO, invece, agendo direttamente sui residui di tirosina, contribuisce alla formazione dei dimeri di Tyr (di-Tyr) i cui principali prodotti di addizione all'anello fenolico sono 3,5-Cloro-Tyr che danno origine ad aggregazione proteica (Heinecke *et al.*, 1993a; Heinecke *et al.* 1993b; Fu *et al.*, 2000).

Inoltre la mieloperossidasi è in grado di convertire L-serina a glicolaldeide, che media la formazione di carbossi-metil-lisina, definita come un prodotto di glicazione delle proteine (AGE). In pazienti affetti da patologie renali croniche ma non diabetici si è osservato un innalzamento degli AGE che correlano con un aumento delle AOPP (Witko-Sarsat *et al.* 1998).

Le AOPP sono state studiate per la prima volta in pazienti con uremia e insufficienza renale cronica sottoposti a dialisi (Witko-Sarsat *et al.*, 1996, Witko-Sarsat *et al.*, 1998): la membrana da dialisi infatti attiva i neutrofili e li spinge a produrre grosse quantità di ROS (anione superossido, perossido di idrogeno, radicale idrossile e acido ipocloroso) (Nguyen *et al.*, 1985; Himmelfarb *et al.*, 1991) che, vista l'incapacità del sistema antiossidante plasmatico di rimuoverli efficacemente, inducono lo stress ossidativo (Loughrey *et al.*, 1994; Ceballos-Picot *et al.*, 1996). Witko-Sarsat *et al.* (1996) riscontrarono nel sangue di questi pazienti alti livelli di proteine ossidate, distinguibili dalle forme non ossidate grazie alle loro diverse caratteristiche spettroscopiche (derivanti ad esempio dall'ossidazione dei gruppi aromatici). Le AOPP così rilevate furono distinte in quelle con massa molecolare pari a 600 kDa e quelle da 60 kDa. Le prime vengono definite "ad alto peso molecolare" (HMW) e corrispondono all'albumina, che sembra formare aggregati derivanti da ponti disolfuro e/o cross-linking a causa della formazione di ditirosina. Il secondo gruppo "a basso peso molecolare" è invece costituito da albumina monometrica (Witko-Sarsat *et al.*, 1996).

In seguito a queste rilevazioni, è stato ipotizzato un possibile ruolo delle AOPP nella patogenesi di altre malattie. Il loro accumulo è stato quindi identificato in diabete mellito (Kalousova *et al.*, 2002), nefropatia diabetica (Shi *et al.*, 2008), coronaropatie (Kaneda *et al.*, 2002) e obesità (Atabek *et al.*, 2006).

Indagini successive hanno dimostrato che le AOPP sono in grado di innescare il *respiratory burst* in monociti e neutrofili, e stimolare l'attività monocitaria oltre che essere positivamente correlate agli indicatori di infiammazione (Witko-Sarsat *et al.*, 1998). Nello stesso studio fu evidenziato che l'aumento delle AOPP è seguito da un calo del GSH, mentre i valori della malondialdeide risultano invariati in casi e controlli: questo avvalorava l'ipotesi che le AOPP siano marker di stress ossidativo più sensibili rispetto alla MDA classicamente usata (Witko-Sarsat *et al.*, 1996).

La capacità delle AOPP di promuovere il processo infiammatorio è stata dimostrata anche nella nefropatia diabetica (Shi *et al.*, 2008) e sembra sia legata alla similitudine tra AOPP e AGE (*advanced glycation end products*).

Pertanto la capacità di stimolare i macrofagi deriverebbe quindi dalla comune possibilità di legare i RAGE (recettori per gli AGE), scatenando un rilascio di

citochine e una risposta proinfiammatoria paradossalmente più importanti di quelle indotte dagli AGE stessi (Kalousova *et al.*, 2005).

I monociti quindi sono al tempo stesso sia bersaglio delle AOPP, sia i promotori della loro formazione tramite la produzione di ROS.

2.4.2. MDA

La determinazione dei livelli di MDA, indice di danno perossidativo, può essere considerata come un primo ed indiretto approccio che permette di valutare la produzione di radicali liberi (Esterbauer *et al.*, 1990).

I metodi più comuni per la misurazione di questo processo si basano sulla misurazione dei T-BAR analoghi della Malondialdeide (MDA), che però sono addotti di reazione non stabili.

Uno dei metodi più frequentemente utilizzato per valutare il grado di LPO in vivo è la quantificazione della MDA nel plasma o nelle urine con il saggio dell'acido tiobarbiturico (TBA) (Yoshida *et al.*, 2005). Il saggio fu inizialmente sviluppato per determinare il grado di perossidazione lipidica nei cibi quale indicatore di rancidità. La determinazione spettrofotometrica è semplice, ma non specifica poiché il TBA può reagire con altre sostanze, quali l'acetaldeide, la biliverdina, zuccheri riducenti (Buege *et al.*, 1978; Moore *et al.*, 1998) che nel complesso costituiscono la sostanza TBA reattiva (TBA-reactive substance, TBARS). È, inoltre, necessario ricordare che la MDA è anche un prodotto secondario del metabolismo dell'acido arachidonico e che è velocemente metabolizzata a biossido di carbonio e acido acetico dalle aldeidi deidrogenasi, perciò la sola determinazione della MDA con il saggio TBA non può da sola essere considerata un test specifico per determinare in vivo il grado di LPO.

2.4.3. GLUTATIONE (GSH)

Il sistema glutatione-glutatione disulfide (GSH-GSSG) è il più abbondante sistema redox nelle cellule eucariote (Meister and Anderson, 1983). Questo svolge un ruolo fondamentale nell'omeostasi cellulare (Valko *et al.* 2007; Droge,

2002) e nella difesa della cellula dallo stress ossidativo (Berg *et al.*, 2003), oltre ad essere coinvolto nei processi di segnalamento associati alla morte cellulare programmata (apoptosi) (Sies, 1999; Filomeni *et al.*, 2002; Circu and Aw, 2008). Inoltre è coinvolto anche nella sintesi dei leucotrieni (Rouzer *et al.*, 1982) e rappresenta una fonte di cisteina per i linfociti, la cui attività è dipendente dalla disponibilità di questo amminoacido (Droge *et al.*, 1986).

Il GSH viene sintetizzato in due fasi a partire da L-glutamato, L-cisteina e glicina grazie agli enzimi γ -glutamyl-cisteina sintetasi e glutatione-sintetasi (Sies 1999).

Il gruppo sulfidrilico libero (contenuto nell'amminoacido cisteina) conferisce capacità riducente alla molecola (Parris, 1997), che quindi si può presentare in una forma ridotta (GSH) o in una forma ossidata (nota come glutatione disulfide o GSSG). Terminata la sua sintesi il GSH può essere trasportato attraverso la membrana plasmatica. Questo meccanismo è ampiamente utilizzato nel fegato che, oltre che eliminare il GSSG per via biliare, produce grosse quantità di GSH e lo immette nel torrente circolatorio in modo da rifornire gli altri tessuti, (Bartoli and Sies 1978; Kaplowitz *et al.*, 1996;).

Tra le varie funzioni del glutatione, una delle più importanti risulta essere il suo ruolo come cofattore nell'attività degli enzimi antiossidanti, come la glutatione perossidasi (GPx). Due molecole di glutatione e una di perossido di idrogeno, grazie all'attività della GPx, danno origine a GSSG e acqua (Berg *et al.*, 2003). La forma ridotta del glutatione quindi viene rigenerata a partire da quella ossidata grazie all'enzima glutatione reduttasi, sfruttando il NADPH come coenzima (Berg *et al.*, 2003).

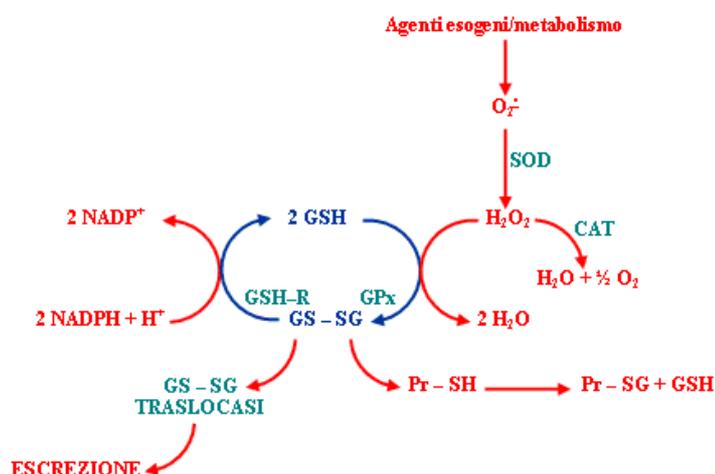


Fig. 2.3.: Sintesi del glutatione.

Fisiologicamente l'attività della glutatione reduttasi e la disponibilità di NADPH sono sufficienti a mantenere il valore GSSG:GSH tra 1:100 a 1:1000 (Wu *et al.*, 2004; Dalle-Donne *et al.*, 2009). Il ruolo del GSH nello stress ossidativo è amplificato poi anche dalla sua capacità di riportare alla forma ridotta altri antiossidanti ossidati come la vitamina E (Meister, 1994a; Meister, 1994b; Meister, 1995; Anderson *et al.*, 1997). Tuttavia, se lo stress ossidativo aumenta o l'attività della glutatione reduttasi diminuisce (ad esempio a causa di un calo della sintesi del NADPH), il GSSG si accumula e il rapporto GSSG/GSH aumenta.

Il GSSG formato può:

- formare ponti disolfuro con proteine cellulari
- essere rilasciato dalla cellula per mantenere costante il rapporto intracellulare GSH/GSSG ed essere quindi metabolizzato a livello extracellulare
- essere ridotto nuovamente a GSH ad opera della glutatione reduttasi

Di conseguenza la perdita complessiva di GSH viene compensata o dalla riduzione del GSSG o dalla sintesi *ex-novo* della molecola. (Giovannini *et al.*, 2006).

Per glutatione totale (GSx) si intende la somma delle concentrazioni della forma ridotta e il doppio di quella ossidata (poiché la riduzione del GSSG dà origine a due molecole di GSH), ovvero la concentrazione di GSH nel campione a seguito della completa riduzione del GSSG (Schafer and Buettner., 2001).

Durante lo stress ossidativo possono avvenire variazioni dei livelli di glutatione totale come esito della variazione dell'entità della sintesi e della perdita dell'indicatore stesso (Malmezat *et al.*, 2000). I livelli del GSx nei vari tessuti e nel plasma può cambiare in base all'alimentazione e allo stato clinico del soggetto: animali sottoposti a infezione sperimentale aumentano la sintesi di glutatione in tutti i tessuti (soprattutto il fegato), ma i livelli plasmatici di GSx tendono ad abbassarsi (Malmezat *et al.*, 2000). Rahman e MacNee (2000) riportano inoltre che lo stress ossidativo indotto dai mediatori di infiammazione causa una intensa deplezione del GSH, rendendo così le cellule maggiormente suscettibili all'amplificazione della risposta infiammatoria.

2.5. INFIAMMAZIONE

2.5.1. IL SISTEMA IMMUNITARIO NELLA RISPOSTA INFIAMMATORIA

Il sistema immunitario è un insieme di organi e cellule in grado di distinguere ciò che è proprio dell'individuo (ovvero *self*) da ciò che è estraneo o proprio ma alterato (*non-self*), operando in maniera coordinata per mantenere l'integrità dell'organismo (Delmann and Eurell, 2005).

A seguito del passaggio delle eventuali barriere fisiche, il primo ostacolo che i patogeni incontrano è rappresentato dalla cosiddetta "immunità innata" (Tizard, 2000), responsabile di una risposta immediata nei confronti dei patogeni (Chou *et al.*, 2008). Questa ha evoluto meccanismi di riconoscimento tra *self* e *non-self* basata su pattern molecolari di riconoscimento (*pathogen-associated molecular pattern* o PAMPs). Questi pattern vengono quindi riconosciuti da recettori (*pattern recognition receptor* o PRRs) che inducono o inibiscono la risposta immunitaria a seconda del tipo di segnale (Medzhitov and Janeway, 2002).

Il legame tra PRRs e PAMPs dà origine alla fagocitosi nelle cellule coinvolte (prevalentemente macrofagi) che, a loro volta, secernono citochine e chemochine che stimolano le altre cellule della risposta immunitaria (neutrofili, monociti, natural killer, eosinofili) (Si-Tahar *et al.*, 2009). I PRRs includono tre gruppi di recettori: *nucleotide-oligomerization domain-like receptors* (NLR), *retinoic acid-inducible gene* (RIG)-*I-like helicase* e i più noti *Toll-like receptors* (TLRs) (Si-Tahar *et al.*, 2009). Questi ultimi, dopo l'identificazione del microrganismo, inviano segnali che portano all'attivazione di fattori di trascrizione: in particolare viene attivato il *nuclear factor κ B* che stimola la produzione di citochine e di varie proteine responsabili dell'attività battericida dei fagociti (Kumar *et al.*, 2005). I macrofagi, le cellule dendritiche e altre cellule presentanti l'antigene, fagocitano e processano gli antigeni presentandoli ai linfociti T: questo rappresenta il punto di connessione tra immunità innata e acquisita (Chou *et al.*, 2008).

Il sistema immunitario acquisito è invece un organismo particolarmente complesso e sofisticato; esso interviene come ultima difesa e permette di fermare e eliminare il patogeno, ma anche di riconoscerlo nel momento in cui

dovesse ripresentarsi, in modo da dare origine ad una risposta ancora più rapida ed efficace. Questo sistema è costituito da anticorpi e linfociti (Tizard, 2000).

2.5.2. IL PROCESSO INFIAMMATORIO

L'infiammazione è una risposta dell'organismo ai danni legati a insulti chimici, fisici o a microrganismi e loro tossine; essa mira ad inattivare o distruggere il patogeno coinvolto, rimuovere le sostanze irritanti e porre le basi per la riparazione tissutale (Guzik *et al.*, 2003).

Il processo infiammatorio può essere differenziato in acuto o cronico. La forma acuta ha un esordio rapido (secondi o minuti), una durata breve (fino a qualche giorno) ed è contraddistinto dall'essudazione (formazione dell'edema) e dalla migrazione leucocitaria. L'infiammazione cronica ha una maggiore durata ed è associata alla presenza di linfociti e macrofagi, proliferazione dei vasi sanguigni, fibrosi e necrosi tissutale (Kumar *et al.*, 2005).

2.5.2.1. Il processo infiammatorio acuto: modificazioni vascolari

Le prime alterazioni che compaiono, a seguito del danno subito dai tessuti, coinvolgono la componente vascolare: il fenomeno vasodilatativo che prende origine interessa dapprima le arteriole e successivamente si risolve nell'apertura di nuovi letti capillari nella regione, causando un aumento del flusso ematico. La vasodilatazione è rapidamente seguita da un aumento della permeabilità vascolare del microcircolo. Questi due meccanismi, aumentando il flusso ematico e la permeabilità vascolare, danno origine al processo di essudazione (Kumar *et al.*, 2005). Le molecole coinvolte in questo meccanismo comprendono istamina, serotonina, monossido d'azoto (NO), ROS, chinine e prodotti di derivazione dall'acido arachidonico.

L'istamina è prevalentemente presente nei mastociti che, quando esposti al fluido extracellulare a seguito del danno tissutale, degranulano. L'istamina rilasciata è responsabile della dilatazione di capillari e venule, mentre causa la vasocostrizione di vasi specifici (negli erbivori i vasi polmonari, nel cane le vene epatiche). Inoltre questa molecola è in grado di aumentare la permeabilità

vascolare (Tizard, 2000) tramite un meccanismo legato alla separazione delle giunzioni intercellulari (Majno and Palade, 1961). Lo stesso effetto viene dato dalla serotonina: alcuni studi hanno dimostrato però un effetto più potente di quest'ultima amina vasoattiva rispetto all'istamina (Majno and Palade, 1961).

L'ossido nitrico svolge un ruolo fondamentale nella modulazione della risposta infiammatoria. Esistono tre tipi di enzimi coinvolti nella sua formazione ossido nitrico sintetasi (NOS): uno di tipo neuronale (nNOS), una forma inducibile attiva in particolare nei macrofagi a seguito della stimolazione infiammatoria (iNOS) e una forma costitutiva presente a livello endoteliale (eNOS) (Guzik *et al.*, 2003).

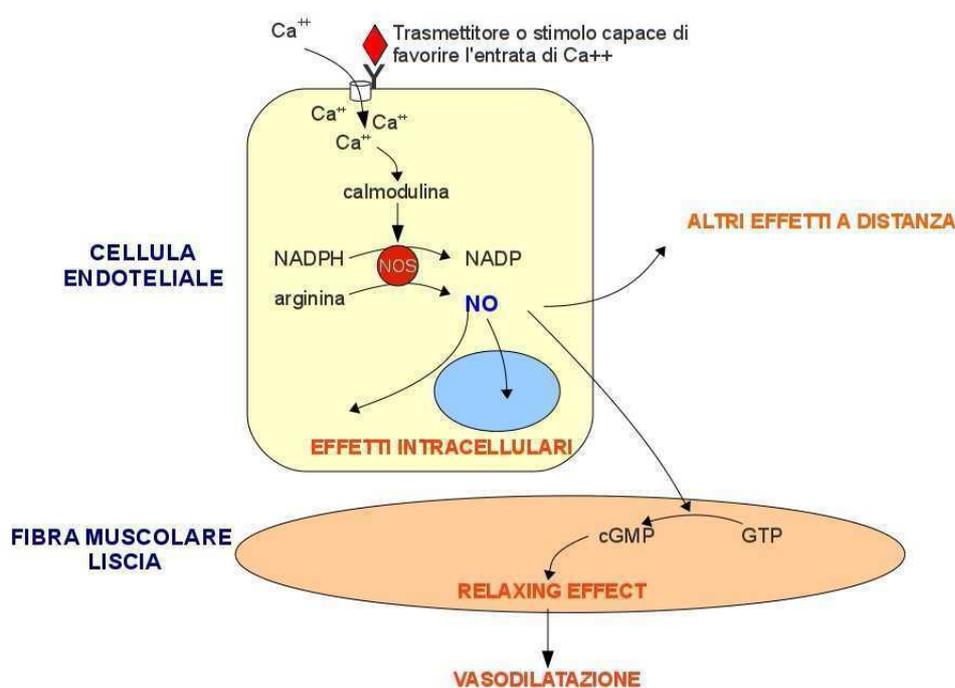


Fig. 2.4.: Formazione di ossido nitrico (NO) nelle cellule endoteliali

Risultano di particolare interesse la eNOS, responsabile del mantenimento di un basso tono vascolare e della prevenzione dall'adesione di leucociti e piastrine alla parete vasale (Ignarro, 2002) e la iNOS, che è ampiamente coinvolta nella risposta infiammatoria (Michel and Feron, 1997). Durante il corso del processo infiammatorio l'attività della iNOS fa aumentare notevolmente i livelli di NO oltre quelli presenti fisiologicamente (Xie and Nathan, 1994); l'NO così prodotto è responsabile della distruzione dei microrganismi (Guzik *et al.*, 2003). Quindi, oltre ad essere un potente vasodilatatore, l'ossido nitrico è anche responsabile della riduzione della risposta infiammatoria e dell'attività nei

confronti dei microrganismi. Nonostante sia stato recentemente dimostrato che l'NO può inibire l'espressione di numerose citochine in linfociti, eosinofili, monociti e altre cellule (Marcinkiewicz and Chain, 1993; Marcinkiewicz *et al.*, 1996; Marcinkiewicz, 1997; Giustizieri *et al.*, 2002), il ruolo di questa molecola nell'immunoregolazione è ancora poco chiaro e sembra che le sue azioni in questo ambito siano dipendenti dalla sua concentrazione, dall'ambiente cellulare e dalla avvenuta attivazione delle cellule coinvolte (Nathan, 2002).

I ROS sembrano avere un ruolo fondamentale nel meccanismo modulatorio di rilascio di altri mediatori dell'infiammazione (Guzik *et al.*, 2003) (per la produzione di ROS nell'infiammazione si rimanda al cap 2.3). I ROS possono regolare l'espressione di molecole di adesione a livello di cellule endoteliali e infiammatorie, influenzando quindi sul richiamo di cellule al sito di infiammazione (Niu *et al.*, 1994; Fraticelli *et al.*, 1996). Essi inoltre aumentano l'espressione di citochine e chemochine (Kimura *et al.*, 2003; Brzozowski *et al.*, 2003), stimolano l'attività della MAP-kinasi (che conduce all'attivazione di più fattori di trascrizione) e possono fungere da secondi messaggeri nella trasduzione del segnale infiammatorio (Guzik *et al.*, 2003). A loro volta alcune citochine possono aumentare l'attività della NADPH-ossidasi e quindi la produzione di ROS (Decleva *et al.*, 2002). Lo stato redox della cellula può influire sui meccanismi di trasduzione del segnale e quindi essere coinvolto nell'immunoregolazione. In particolare l'anione superossido può dare effetti diretti tramite la modificazione delle molecole coinvolte nel segnalamento e dei fattori di trascrizione, o indiretti tramite l'interazione con l'ossido nitrico. Questo dà origine ad una perdita di NO biodisponibile e formazione di perossinitrito (Guzik *et al.*, 2003). Inoltre i ROS, alterando le strutture cellulari, inducono un aumento della permeabilità vascolare tramite danno alle cellule endoteliali e inibiscono gli inattivatori delle proteasi (come l' α -antitripsina) con aumento della distruzione della matrice extracellulare e delle lesioni ad altri tipi di cellule (Kumar *et al.*, 2005).

Le chinine sono un gruppo di polipeptidi di cui la più importante è la bradichinina. Queste molecole vengono prodotte a partire da precursori (chininogeni) grazie all'attività di proteasi (callicreine) e sono responsabili dell'aumento della permeabilità vascolare, della stimolazione della contrazione del muscolo liscio, della dilatazione dei vasi sanguigni e della stimolazione dei recettori dolorifici (Tizard, 2000).

I metaboliti dell'acido arachidonico (o eicosanoidi) comprendono prostaglandine, trombossani e leucotrieni/lipossine. La loro biosintesi avviene prevalentemente a livello della membrana plasmatica: a seguito di uno stimolo idoneo (nervoso, endocrino o metabolico) vengono attivate delle fosfolipasi che liberano l'acido grasso precursore, ovvero l'acido arachidonico. Quest'ultimo, una volta rilasciato nel mezzo intracellulare, viene metabolizzato da particolari enzimi attivati: il sistema delle ciclossigenasi (COX) che dà origine alle prostaglandine e ai trombossani, e il sistema delle lipossigenasi (LOX) con produzione di leucotrieni (Aguggini *et al.*, 2006). Sono state identificate due isoforme di COX: la COX 1 è considerata normalmente espressa nei tessuti sani e produce le prostaglandine necessarie al mantenimento dell'omeostasi dell'organismo, mentre l'attività della COX2 (che risulta inducibile) aumenta negli stati infiammatori (Corletto, 2004). Tuttavia alcuni studi hanno dimostrato che l'iniziale aumento della produzione di prostanoidi (prostaglandine e trombossani) a seguito della stimolazione nociva, deriva dall'attività della COX1; solo in un secondo momento è la COX2 a divenire una maggiore fonte di questi composti (Tilley *et al.*, 2001). Gli enzimi che danno origine alle prostaciline (PGI_2) si trovano nelle cellule endoteliali, quelli che originano i trombossani prevalentemente nelle piastrine, mentre le altre prostaglandine possono essere generate in vari tipi di cellule nucleate. L'effetto di questi composti nel processo infiammatorio può essere molto complesso: la $\text{PGF}_{2\alpha}$ e i trombossani causano contrazione della muscolatura liscia e quindi vasocostrizione; PGE_1 , PGE_2 e prostacilina causano rilassamento della muscolatura liscia e vasodilatazione; PGI_2 , PGE_1 e $\text{PGF}_{2\alpha}$ inibiscono l'aggregazione piastrinica; PGE_2 e trombossani promuovono l'aggregazione piastrinica e il rilascio di mediatori come la serotonina, mentre la $\text{PGF}_{2\alpha}$ promuove il rilascio di mediatori dei mastociti (Tizard, 2000).

La produzione di leucotrieni avviene prevalentemente in neutrofili, eosinofili, monociti, macrofagi, mastociti, basofili e linfociti B (Reid *et al.*, 1990; Jakobsson *et al.*, 1991). Il leucotriene B_4 (LTB_4) è un potente agente chemotattico dei neutrofili: esso è in grado di stimolare l'adesione di queste cellule all'epitelio e il rilascio degli enzimi lisosomiali dai neutrofili stessi, oltre che essere un potente mediatore del dolore (Henderson, 1994). I leucotrieni C_4 , D_4 ed E_4 invece inducono vasocostrizione, aumento della permeabilità vascolare, aumento delle

secrezioni mucose e agiscono come immunomodulatori (Samuelsson *et al.*, 1987; Henderson, 1991).

Le lipossine sono prodotti piastrinici derivanti da intermedi prodotti dai neutrofili: le principali funzioni di queste sembrano essere l'inibizione del reclutamento leucocitario e delle componenti cellulari dell'infiammazione, inibendo la chemotassi dei neutrofili e la loro adesione all'endotelio (Levy and Serhan, 2002). Il loro ruolo sembra quindi essere quello di regolatore negativo endogeno dell'azione dei leucotrieni, meccanismo che risulta fondamentale nella risoluzione dell'infiammazione (Kumar *et al.*, 2005).

Un consistente aumento della permeabilità vascolare può essere legato infine al danno diretto sull'endotelio da parte dell'agente patogeno (Lentsch and Ward, 2000).

2.5.2.2. Il processo infiammatorio acuto: intervento cellulare

I leucociti, per poter raggiungere la sede di infiammazione, devono passare la barriera endoteliale. Questi devono affrontare quindi una fase di marginazione, una di rotolamento, l'adesione all'endotelio e quindi la diapedesi.

Le molecole che permettono l'adesione leucocitaria vengono distinte in selectine e integrine. Le selectine comprendono tre molecole: E-selectina e P-selectina sono espresse a livello dell'endotelio attivato, mentre la L-selectina è espressa costitutivamente nei leucociti (Mc Evere, 1994; Tedder *et al.*, 1995). Le integrine invece sono eterodimeri che riconoscono la matrice extracellulare, glicoproteine della superficie cellulare e altre molecole (come fibrinogeno e fattore del complemento C3bi). Tutti i leucociti producono la β_2 integrina, mentre eosinofili, monociti e linfociti esprimono sulla loro superficie anche la β_1, β_7 e α_4 integrina. La più importante famiglia di molecole responsabili dell'adesione endoteliale è data dalle immunoglobuline: in particolare ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) e VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) legano le integrine presenti sui leucociti (Springer, 1995; Kumar *et al.*, 2005).

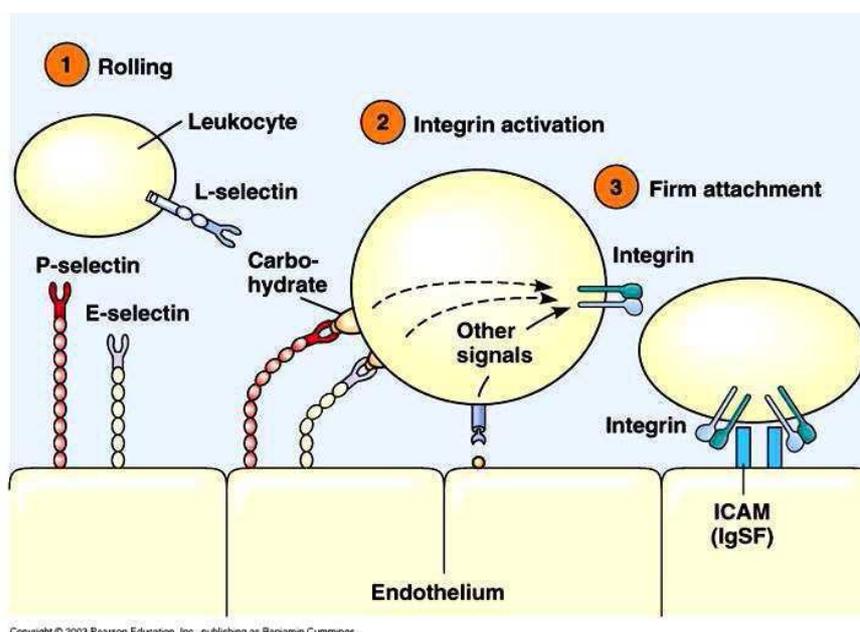


Fig.2.5.: Migrazione dei leucociti (http://www-3.unipv.it/webbio/anatcomp/freitas/2007-2008/biocell_LSBUSB07-08.htm)

Fisiologicamente la porzione centrale dei vasi sanguigni è occupata dai globuli rossi, che spostano i leucociti nella porzione aderente all'endotelio. Questo processo, amplificato nell'infiammazione a causa del rallentamento del flusso dovuto alla vasodilatazione, oltre che ai fenomeni di emocostrazione derivante dall'aumento della permeabilità, prende il nome di *marginazione* (Muller, 2002; Kumar *et al.*, 2005).

I leucociti prendono quindi contatto con l'endotelio tramite le selectine (Carlos and Harlan, 1994; Etzioni *et al.*, 1999; Vestweber and Blanks, 1999): il legame transitorio che si crea in questo modo, associato al rotolamento dei leucociti sull'endotelio, viene detto *rolling* (Kumar *et al.*, 2005). La P-selectina viene esocitata da parte delle cellule endoteliali a seguito della stimolazione con l'istamina, l'L-selectina si trova a livello dei microvilli dei leucociti, mentre le integrine sono collocate nel corpo del leucocita tra i microvilli (Von Adrian *et al.*, 1995). In questo modo le molecole che determinano l'adesione iniziale dei leucociti vengono a contatto per prime con l'endotelio; subito dopo i microvilli si retraggono permettendo il legame tra integrine e recettori endoteliali (Muller, 2002). Per prevenire l'insorgere di fenomeni infiammatori indesiderati, la E-selectina viene espressa solo dopo l'attivazione dell'endotelio da parte delle citochine infiammatorie e la P-selectina, stoccata all'interno della cellula, viene

portata alla superficie cellulare per degranolazione a seguito dell'interazione con l'istamina (Muller, 2002). In condizioni di infiammazione cronica la P-selectina può essere espressa stabilmente sulla superficie cellulare (Yao *et al.*, 1996, Pan *et al.*, 1998). L'L-selectina viene quindi espressa in modo costitutivo, la P selectina interviene nelle forme iniziali e croniche, mentre la E-selectina compare nella fase acuta: in questo modo ci sono molecole per supportare l'attività leucocitaria durante tutto il periodo evolutivo del processo infiammatorio (Muller, 2002).

A seguito del rolling, per evitare che i leucociti ritornino nel torrente circolatorio, risulta necessaria l'attivazione di legami ad alta affinità tra endotelio e leucociti stessi. Queste interazioni derivano da stimoli che originano dalla superficie endoteliale (sottoforma di molecole incorporate nella stessa) (Muller, 1999) o derivanti dal sito di infiammazione come le chemochine. Queste ultime, dopo aver legato i glicosaminoglicani della superficie endoteliale, vengono presentate ai leucociti (Tanaka *et al.*, 1993).

Le chemochine sono piccole molecole (8-14 kDa) che interagiscono con i leucociti (prevalentemente neutrofili, monociti, linfociti e eosinofili) tramite legami con diversi tipi di recettori (Zlotnik and Yoshie, 2000). Esse vengono divise in 4 famiglie in relazione alla posizione dei legami disolfuro nella catena peptidica e tendono ad essere più efficaci nei confronti di alcune classi di leucociti piuttosto che altre (Muller, 2002). Al pari delle citochine, le chemochine sono proteine prodotte e secrete da leucociti e tessuti in maniera costitutiva o a seguito di induzione, manifestando efficacia a livello locale (con effetto autocrino o paracrino) (Baggiolini, 2001). Le due sottofamiglie principali sono le chemochine CXC (o α chemochine) e le CC (o β chemochine) (Baggiolini, 2001), mentre le altre due componenti sono rappresentate dalle chemochine C (γ chemochine) e le chemochine CX₃C (Kumar *et al.*, 2005). L'interleuchina 8 (IL-8) è un esempio di chemochina CXC prodotta da fibroblasti, macrofagi, linfociti, granulociti, cellule endoteliali, epatociti e cheratinociti: essa possiede attività chemotattica nei confronti di neutrofili, basofili e alcuni linfociti T. In particolare essa attiva i neutrofili (con stimolazione al rilascio di granuli citoplasmatici), il *respiratory burst* e il rilascio di leucotrieni. In modo simile un'altra chemochina CXC (proteina infiammatoria dei macrofagi 2 o MIP-2) viene secreta dai macrofagi e presenta attività chemotattica sui neutrofili (Tizard,

2000). Le chemochine CC comprendono la proteina chemotattica per i monociti (MCP-1), la eotassina, la proteina infiammatoria dei macrofagi 1 α , e la RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*). Queste attraggono monociti, eosinofili, basofili e linfociti, ma non sono attive sui neutrofili. L'eotassina recluta invece selettivamente gli eosinofili (Kumar *et al.*, 2005). Infine la linfoactina (una chemochina C) è chemotattica per i linfociti, mentre la fractalina (una CX₃C chemochina) stimola l'adesione di linfociti T e mastociti all'endotelio (Tizard, 2000).

Il legame delle chemochine ai glicosaminoglicani delle cellule endoteliali attivano i leucociti, convertendo le integrine di questi in integrine ad alta affinità: queste ultime possono quindi legare i ligandi ICAM-1, ICAM-2 e VCAM-1 a livello endoteliale (Muller, 2002). L'espressione di ICAM e VCAM viene aumentata drasticamente dalle citochine rilasciate durante il processo infiammatorio (Pober and Cotran, 1990). A questo punto i leucociti "scivolano" sulla superficie endoteliale verso le giunzioni intercellulari endoteliali (Muller, 2002). I prodotti rilasciati dai leucociti innescano l'aumento delle concentrazioni di calcio citosolico delle cellule endoteliali (Gautam *et al.*, 2000) che, retraendosi, facilitano il passaggio dei leucociti stessi (Hixenbaugh *et al.*, 1997). Interazioni omofiliche tra molecole che prendono il nome di *platelet/endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1/CD31) e CD99 (presenti sia sui leucociti che sull'endotelio a livello delle giunzioni cellulari), intervengono nel processo detto di *diapedesi*, che consiste nella migrazione dei leucociti attraverso l'endotelio (Muller, 2002). Una volta avvenuto ciò, i leucociti devono passare attraverso la lamina basale e quindi nella matrice extracellulare per raggiungere la sede interessata dal danno: il modo con cui questo avviene non è ancora completamente chiarito, ma sembra siano coinvolte le PECAM dei leucociti e alcune componenti non note della lamina basale (Liao *et al.*, 1995). Risulta invece che la migrazione nella matrice extracellulare sia dovuta ad un sinergismo nell'azione tra integrine β_1 e integrine β_2 (Werr *et al.*, 1998). Le integrine β_2 legano inoltre il fibrinogeno e alcuni prodotti derivanti dalla scissione proteolitica di questo, noti per essere importanti componenti della matrice extracellulare, in particolar modo nella sede d'infiammazione (Forsyth *et al.*, 2001).

Una volta raggiunta la matrice extracellulare, i leucociti migrano verso la sede da cui è originato lo stimolo infiammatorio secondo un processo definito *chemiotassi*. Nei mammiferi i segnali extracellulari responsabili della migrazione leucocitaria sono dati dalle chemochine stesse. Queste legano i recettori presenti a livello dei leucociti (GPCR) stimolando una complessa cascata di reazioni che comporta la polimerizzazione dell'actina: questo meccanismo dà origine alla formazione di pseudopodi che spingono la cellula verso la regione a maggiore concentrazione di chemochine (Jin *et al.*, 2008). Oltre alle chemochine, anche fattori esogeni (come i prodotti di origine batterica) piuttosto che endogeni (come il sistema del complemento e i prodotti della via della lipossigenasi) sembrano agire come chemioattrattori legando i GPCR (Kumar *et al.*, 2005). I microbi, i prodotti delle cellule necrotiche, i complessi antigene-anticorpo e le citochine inducono nei leucociti diverse risposte tra cui la produzione dei metaboliti dell'acido arachidonico, la degranulazione e la secrezione di enzimi lisosomiali (con attivazione della cascata ossidativa nel processo della fagocitosi), la modulazione delle molecole di adesione leucocitaria e la secrezione di citochine. Tutto questo prende il nome globale di *attivazione leucocitaria* (Kumar *et al.*, 2005).

Le citochine sono glicoproteine che regolano la risposta immunitaria tramite un meccanismo di segnalamento tra le cellule e comprendono le interleuchine, gli interferoni, il *tumor necrosis factor* (TNF), i *growth factors* (o *colony stimulating factors*) e le chemochine (Tizard., 2000). Le citochine vengono prodotte da cellule circolanti nel torrente circolatorio (come linfociti e monociti), cellule endoteliali e fibroblasti (Nicod, 1993). Le proprietà di queste molecole e le loro interazioni con altre popolazioni cellulari sono particolarmente complesse: saranno quindi accennate in questo lavoro solo quelle delle due più importanti citochine che mediano il processo infiammatorio, ovvero il tumor necrosis factor (TNF) e l'interleuchina 1 (IL1). Queste ultime condividono diverse proprietà biologiche e la loro interazione esita in un effetto più importante di quello che sarebbe ottenuto dalla loro singola attività (Beutler and Cerami 1986; Dinarello 1986). L'IL1 è un polipeptide prodotto a seguito di infezione, danno cellulare e, nonostante venga prodotta prevalentemente dai macrofagi, essa può derivare anche da cellule epiteliali, linfociti ed endotelio (Dinarello, 1988). Anche il TNF viene principalmente secreto dai macrofagi, ma possono essere coinvolti nella

sua produzione anche linfociti B, T e fibroblasti. Questa molecola è inoltre in grado di aumentare la sintesi di altre citochine da parte dei macrofagi stessi come l'IL1, l'IL6 e alcuni colony stimulating factors (Tizard, 2000). L'IL1 è responsabile di fenomeni a carico del sistema nervoso centrale (febbre, aumento nella secrezione di ACTH e neuropeptidi, sonnolenza e calo dell'appetito), metabolici (aumento della sintesi delle proteine di fase acuta, alterazioni elettrolitiche, calo dell'attività del citocromo P450 e alterazioni dei livelli di insulina), ematici (neutrofilia, linfopenia, aumento dell'attività di eliminazione delle cellule tumorali, aumento dei fattori di crescita del midollo osseo) e dell' endotelio (aumento dell'adesione leucocitaria, della sintesi di PGI_2 , PGE_2 e fattore attivante le piastrine e ipotensione) (Dinarello, 1988).

Il fattore attivante le piastrine (PAF) (prodotto da piastrine, basofili, neutrofilii, monociti/macrofagi e cellule endoteliali) stimola l'aggregazione piastrinica, la vasodilatazione, l'aumento della permeabilità delle venule e facilita il legame delle integrine nel processo di adesione dei leucociti all'endotelio, la chemiotassi, la degranolazione e la cascata ossidativa. Esso risulta quindi in grado di evocare la maggior parte delle caratteristiche essenziali dell'infiammazione (Kumar *et al.*, 2005).

Il processo infiammatorio ha come esito la *fagocitosi*, ovvero il processo tramite il quale i neutrofilii e i macrofagi eliminano gli agenti lesivi. Esistono tre stadi in questo meccanismo: il riconoscimento e l'adesione della particella da fagocitare, la sua ingestione e quindi la degradazione del materiale ingerito (Underhill and Ozinsky, 2002). L'adesione dei leucociti sulla superficie batterica non può avvenire in quanto entrambi portano una carica negativa: questa viene neutralizzata tramite il "rivestimento" della superficie cellulare con proteine cariche positivamente, come alcuni componenti del sistema del complemento (p.e.: C3b), che permettono così l'interazione del microrganismo coi neutrofilii carichi negativamente (Tizard, 2000).

Il sistema del complemento è costituito da 20 proteine seriche che cooperano nella via classica e nella via alternativa (Egwang and Befus, 1983) (figura 2.6.). La via classica è attivata da immunocomplessi contenenti IgM e IgG (Loos, 1982) o proteine di fase acuta come la proteina C reattiva (Kaplan and Volanakis, 1974), mentre la via alternativa non richiede la presenza di anticorpi ma è stimolata dalla presenza di batteri, virus, funghi, elminti, protozoi e cellule

linfoblastoidi (Hirsch, 1982; Kazatchkine and Nydegger, 1982; Santoro, 1982; Sundsmo, 1982). Entrambe le vie, tramite una cascata di reazioni che coinvolge i vari componenti del complemento, terminano nell'attivazione della proteina C3 nelle forme C3a e C3b, che a loro volta attivano il complesso C5 (Egwang and Befus, 1983). Viene inoltre descritta una terza via *della lectina*, in cui la lectina plasmatica si lega ai carboidrati presenti sui microrganismi e attiva direttamente il C1 (Kumar *et al.*, 2005). Il complesso C5 si scinde quindi in C5a e C5b: questo lega i componenti C6, C7, C8 e C9 dando origine ad un complesso che prende il nome di MAC (*membrane attack complex*) che, inserendosi sulla membrana dei microrganismi, dà lisi osmotica di questi (Tizard, 2000).

I frammenti che derivano dall'attivazione del complemento, oltre a formare la MAC, sono anche responsabili della mediazione dei fenomeni infiammatori quali:

- opsonizzazione: i fagociti possiedono recettori (CR1) nei confronti del C3 che si lega ai microrganismi. Questo permette la fagocitosi dei patogeni.
- chemiotassi: alcuni derivati della cascata del complemento risultano avere attività chemiotattica. C5b67 è chemiotattico per neutrofili e eosinofili; C5 per neutrofili, eosinofili, macrofagi e basofili. Quest'ultimo peptide è responsabile della stimolazione del respiratory burst nei neutrofili e della up-regulation di alcuni recettori per i fattori del complemento in queste cellule.
- infiammazione: C3a e C5a, dette *anafilotossine*, fanno contrarre la muscolatura liscia bronchiale e intestinale. Inoltre questi peptidi causano la degranolazione delle mastociti e stimolano il rilascio di istamina e serotonina da parte delle piastrine. Questi danno aumento della permeabilità vascolare e causano il rilascio degli enzimi lisosomiali da parte dei neutrofili e di trombociti da parte dei macrofagi.
- immuno-regolazione: C3 e i suoi recettori regolano il sistema immunitario. C3d si combina con alcuni antigeni e lega i recettori CR2 dei linfociti B, causando un aumento della risposta immunitaria. Il calo delle concentrazioni di C3 dà infatti origine al calo della formazione di anticorpi. (Tizard, 2000)

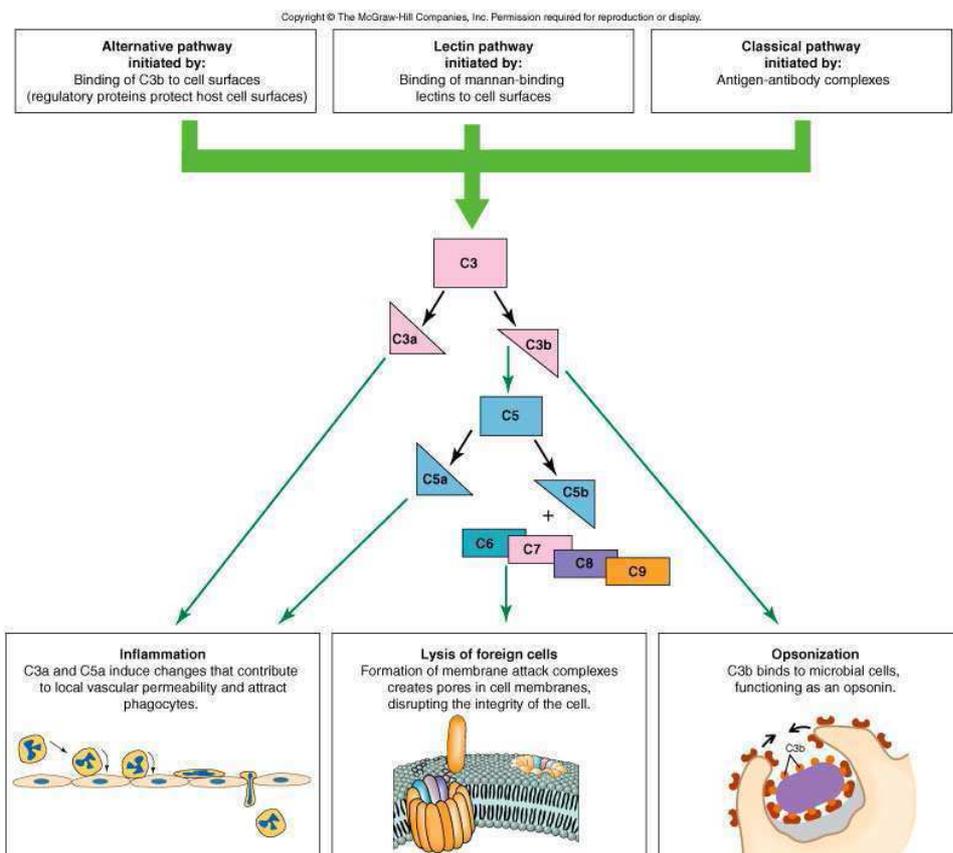


Fig. 2.6.: Attivazione del sistema del complemento tramite le vie classica, alternativa e della lectina. Si rimanda alla spiegazione nel testo. MAC: membrane attack complex; MASPs: mannosè-binding-lectin-associated serine proteases; MBL: mannosè-binding lectin Rappresentazione schematica della cascata di reazioni del complemento. Tratta da tonyslieman.com/Micro_Immune1.htm

Il riconoscimento e l'adesione dei leucociti sui microrganismi avviene quindi quando questi sono opsonizzati da C3b, ma anche IgG e alcune lectine plasmatiche che vengono riconosciute da specifici recettori (Kumar *et al.*, 2005). Inoltre, sulla superficie leucocitaria, esistono recettori quali i *recettori per il mannosio* e i *recettori scavenger*. I recettori per il mannosio sono presenti prevalentemente sulla superficie macrofagica e sono in grado di riconoscere mannosio, fucosio o residui di N-acetilglucosamina sulla superficie dei microrganismi (Largent *et al.*, 1984), risultando attivi nei confronti di *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii*, *Leishmania donovani*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pneumoniae* (Ezekowitz *et al.*, 1991; Marodi *et al.*, 1991; Schlesinger, 1993; O'Riordan *et al.*, 1995; Chakraborty *et al.*, 2001; Zamze *et al.*, 2002). I recettori scavenger, invece, sono stati studiati primariamente per la loro capacità di legare e internalizzare le lipoproteine modificate, meccanismo che suggerisce un loro importante ruolo nell'aterosclerosi. Tuttavia alcuni di questi recettori sono in grado di legare

un'ampia varietà di patogeni e quindi sono coinvolti anche nelle difese nei confronti dei microrganismi (Gough and Gordon, 2000). Similmente anche le integrine macrofagiche come la Mac-1 possono legare i microbi per la fagocitosi (Kumar *et al.*, 2005).

Una volta avvenuti riconoscimento e adesione, la membrana plasmatica della cellula fagocitaria inizia ampi movimenti avvolgenti sollevandosi in pliche o in pseudopodi che circondano la particella da fagocitare; contemporaneamente l'area tra particella e citoplasma leucocitario si introflette avvolgendo la particella stessa e trasportandola gradualmente all'interno della cellula. Questi processi di internalizzazione coinvolgono vari elementi del citoscheletro e richiedono energia rilasciata dall'idrolisi dell'ATP (Rosati and Colombo, 1997).

L'ultimo passaggio che consente quindi di terminare il processo fagocitotico è l'uccisione e la degradazione del materiale fagocitato. I maggiori responsabili di questo fenomeno sono i ROS prodotti dalla NADPH ossidasi e dalla MPO (per le caratteristiche e i meccanismi d'azione di questi due enzimi si rimanda al capitolo 2.2.4 "stress ossidativo indotto dall'infiammazione"). Le molecole prodotte da questi due enzimi (come perossido di idrogeno e ipoclorito) sono responsabili dell'uccisione dei microbi: in particolar modo il sistema della mieloperossidasi è il meccanismo battericida più efficiente a disposizione dei neutrofili, anche se le cellule con deficit di MPO sono in grado di uccidere i batteri (anche se più lentamente) grazie alla formazione di superossido, radicali idrossili e ossigeno singoletto (Kumar *et al.*, 2005). Esistono tuttavia anche dei sistemi ossigeno indipendenti di degradazione batterica, come la proteina permeabilizzante battericida (BPI), il lisozima, la lattoferrina, la proteina basica maggiore, le defensine e le serina proteasi.

La BPI, una proteina espressa primariamente nei neutrofili, dimostra grande attività antimicrobica nei confronti dei Gram negativi, oltre che una spiccata attività di neutralizzazione delle tossine (Schultz and Weiss, 2007); tramite attivazione di una fosfolipasi essa degrada i fosfolipidi causando aumento della permeabilità della membrana esterna dei microrganismi (Kumar *et al.*, 2005).

Il lisozima è una proteina che catalizza l'idrolisi dei legami 1-4 glicosidici tra acido N-acetilmuramico e N-acetilglucosamina dei peptidoglicani di parete cellulare (Proctor and Cunningham, 1988). Quindi, l'attività antimicrobica del

lisozima è attribuita primariamente alla lisi enzimatica dei peptidoglicani che compongono la parete cellulare dei microrganismi (Branen and Davidson, 2004). La lattoferrina è una glicoproteina che deriva per la maggior parte dai neutrofili (Iyer and Lönnerdal, 1993). Nonostante la sua presenza venga utilizzata per identificare i granuli specifici in cui è contenuta, è stato dimostrato che questa molecola può anche essere ritrovata in altri granuli, seppur a concentrazioni inferiori (Saito *et al.*, 1993). La lattoferrina ha un ruolo fondamentale sia nel metabolismo del ferro sia nella difesa dell'organismo: essa, oltre ad avere un effetto batteriostatico, può anche esercitare un effetto battericida e limitare la proliferazione di altri microrganismi come funghi e virus (Levay and Viljoen, 1995).

La proteina basica maggiore (MBP) è uno dei principali costituenti dei granuli degli eosinofili e il suo rilascio è coinvolto nell'uccisione dei parassiti mediata da queste cellule (Butterworth *et al.*, 1979; Wassom and Gleich, 1979). Elevati livelli di MBP sono stati riscontrati nel siero di pazienti con eosinofilia (Wassom *et al.*, 1981) e nei siti che presentavano infiammazione con consistente presenza di eosinofili (Filley *et al.*, 1982). Alcuni studi hanno evidenziato che la MBP umana è inoltre in grado di indurre rilascio non citolitico di istamina da parte dei basofili e, nel caso del ratto, anche dei mastociti (O'Donnell *et al.*, 1983).

Le defensine comprendono un gruppo di polipeptidi ricchi in cisteina che presentano attività antimicrobica: questi sono composti da 29-42 aminoacidi e contengono tre legami disolfidici (formati da tre paia di residui di cisteina) (Patterson *et al.*, 1980; Selsted *et al.*, 1983; Lehrer *et al.*, 1993; Garzia-Olmedo *et al.*, 1999). Alcuni studi hanno dimostrato che le defensine hanno potente attività antibatterica, antifungina e antivirale nei confronti di un'ampia varietà di microrganismi (Selsted, 1984; Lehrer *et al.*, 1989; Weinberg *et al.*, 1998). L'attività antibiotica di queste molecole potrebbe coinvolgere sia la membrana cellulare sia alcuni target intracellulari (Xiong *et al.*, 1999). Oltre alla loro attività microbica, le defensine risultano coinvolte nella chemiotassi per monociti, linfociti T e cellule dendritiche (Chertov *et al.*, 1996; Territo *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 1999), inibiscono il legame dell'ACTH ai suoi recettori (da cui il nome "corticostatine" dato talvolta alle defensine) (Tominaga *et al.*, 1990), sopprimono l'attivazione della via classica del complemento (van den Berg *et al.*, 1998),

inducono il rilascio di istamina da parte dei mastociti (Befus *et al.*, 1999) e promuovono il legame della lipoproteina(a) alla matrice vascolare (Higazi *et al.*, 1997; Bdeir *et al.*, 1999).

Le serina proteasi neutre (come la catepsina G, l'elastasi, l'azurocidina e la proteinasi3) sono invece contenute nei lisosomi dei neutrofili, strutture specializzate che prendono il nome di *granuli azzurrofilii*. Queste molecole sono coinvolte nell'uccisione e digestione dei microrganismi oltre che nella distruzione delle proteine della matrice extracellulare (Havemann *et al.*, 1978; Elsbach and Weiss, 1988).

Il processo infiammatorio acuto, se in grado di neutralizzare gli stimoli lesivi (in caso di danno lieve e di breve durata, con mantenimento della possibilità rigenerativa delle cellule parenchimali), esita nel ritorno alla normalità nella sede in cui la flogosi era presente; se le lesioni sono di grave entità o il processo ha colpito tessuti che non possono rigenerare, la guarigione avviene per sostituzione con tessuto connettivo (Kumar *et al.*, 2005). L'ultima possibilità è che il processo esiti in un'inflammazione cronica.

2.5.2.3. Il processo infiammatorio cronico

L'inflammazione cronica può originare da un processo acuto o essere tale fin da subito (Dianzani, 1995) e viene definita come "un'inflammazione di durata prolungata in cui procedono contemporaneamente l'inflammazione attiva, la distruzione di tessuto e i tentativi di riparazione" (Kumar *et al.*, 2005).

Nel passaggio tra infiammazione acuta e cronica i granulociti neutrofili diminuiscono e vengono sostituiti da macrofagi, linfociti e plasmacellule. Il passaggio tra accumulo neutrofilico e monocitario potrebbe essere secondario ad un cambiamento nel tipo di chemochine prodotte da cellule stromali, macrofagi o neutrofili (Kaplanski *et al.*, 2003).

Le cellule dell'inflammazione cronica si raggruppano quindi "a manicotto" intorno ai vasi e danno origine a strutture che prendono il nome di *infiltrati o manicotti parvicellulari* (Dianzani, 1995). Questi ultimi contraddistinguono l'inflammazione cronica e sono accompagnati dal danno tissutale (dato dall'agente lesivo o dalle cellule infiammatorie stesse), angiogenesi e fibrosi (Kumar *et al.*, 2005).

L'interleuchina 6 (IL-6) svolge un ruolo fondamentale nell'innesco del processo cronico a partire da quello acuto. In particolare, dopo aver legato il suo recettore (*soluble IL-6 receptor α* o sIL-6R α), essa aumenta la secrezione cellulare dell'IL-6 stessa e del *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), ma non quella dell'IL-8, favorendo così la transizione da richiamo neutrofilico a monocitario (Hurst *et al.*, 2001; Marin *et al.*, 2001). Inoltre i neutrofili apoptotici vengono riconosciuti e fagocitati dai macrofagi grazie ad antigeni di membrana: questo comporta un aumento della secrezione di MCP-1 e una riduzione di quella di IL-8, ovvero eventi che stimolano il richiamo monocitario. Quindi ad una diminuzione dei neutrofili nel sito infiammatorio si accompagna un aumento dei monociti (Ryan and Majno, 1977; Doherty *et al.*, 1988; Melnicoff *et al.*, 1989).

Le molecole che possono risultare chemotattiche per i monociti sono molto variabili e dipendenti dalla circostanza specifica. Queste comprendono l'MCP-1, C5a, fattore di crescita derivato dalle piastrine, *transforming growth factor α* , frammenti di degradazione del collagene e della fibronectina oltre che chemochine rilasciate da macrofagi attivati o altre cellule (Kumar *et al.*, 2005).

L'attivazione macrofagica è invece dovuta all'attività dell' IFN- γ e del TNF esogeno o prodotto dai macrofagi stessi a seguito dell'attivazione dei Toll like receptors (TLR) (Nathan, 1991; Mosser 2003). Una volta migrati nella sede infiammatoria, i macrofagi attivati sono in grado di eliminare i patogeni grazie alla produzione di specie reattive dell'ossigeno e monossido d'azoto (NO) (Mosser 2003). Queste sostanze sono contemporaneamente responsabili anche del danno ai tessuti dell'ospite e vengono rilasciate assieme a molecole che determinano l'innesco del processo ripartivo, che accompagna il danno tissutale e il processo infiammatorio stesso (Kumar *et al.*, 2005).

Esiste inoltre un'attivazione macrofagica tramite la via alternativa: la stimolazione con IL-4 attiva queste cellule che però non sono in grado di produrre NO, alterando così la loro capacità di distruzione dei microrganismi. Queste cellule sembrano invece essere coinvolte nella riparazione tissutale, angiogenesi e deposizione di matrice extracellulare (Stein *et al.*, 1992; Mosser, 2003).

Inoltre i macrofagi cooperano con le plasmacellule tramite il sistema di presentazione dell'antigene e coi linfociti T tramite espressione di molecole di

membrana e citochine; a loro volta questi ultimi secernono IFN- γ , che rappresenta uno dei più importanti attivatori dei macrofagi (Kumar *et al.*, 2005). L'infiammazione cronica può presentare un aspetto *diffuso* (detto anche *interstiziale* e contraddistinto da un numero di macrofagi non abbondante, infiltrazione di linfociti e plasmacellule e proliferazione dei fibroblasti), o uno *granulomatoso* (circoscritto e con reazione cellulare esuberante) (Dianzani, 1995).

Nel processo infiammatorio cronico si possono inoltre formare cellule giganti multinucleate (derivanti dalla fusione di più macrofagi) o cellule epiteliodi (macrofagi attivati simili a cellule epiteliali tipiche del processo granulomatoso) (Delmann and Eurell, 2005; Kumar *et al.*, 2005).

2.5.3. INFIAMMAZIONI PIU FREQUENTI NELLA BOVINA DA LATTE

In questo lavoro sono stati presi in considerazione alcuni stati infiammatori tra i più frequenti nella bovina da latte, ovvero mastiti, infiammazioni uterine postparto e patologie podali. Di seguito si descrivono brevemente i meccanismi eziopatogenetici e gli aspetti clinici di queste forme.

2.5.3.1. Le mastiti

Il termine "mastite" viene utilizzato per descrivere un processo infiammatorio della ghiandola mammaria; essa rappresenta la patologia infettiva con i risvolti economici più rilevanti nell'allevamento della bovina da latte (Zhao and Lacasse, 2007).

Dovuta ad agenti patogeni quali streptococchi, stafilococchi, coliformi, arcanobatteri, micoplasmi, leptospire o funghi, può essere trasmessa durante i processi di mungitura (*forme contagiose*, spesso subcliniche, date da stafilococchi e streptococchi, ad eccezione di *S. uberis*) o dovuta all'imbrattamento della mammella nel tempo che intercorre tra le mungiture (*forme ambientali*, spesso clinicamente manifeste) (Edmondson and Bramley, 2004).

La cheratina che si trova a livello del dotto papillare rappresenta una barriera fisica e chimica nei confronti degli agenti patogeni (Capuco *et al.*, 1992); una volta oltrepassato questo primo ostacolo, i microrganismi devono superare i

meccanismi di difesa cellulare e umorale della ghiandola stessa per poter dare origine ad un processo infettivo (Sordillo and Streicher, 2002). Se l'infezione persiste il danno cellulare del tessuto mammario peggiora: questo comporta la perdita di integrità della barriera emato-mammaria con conseguente miscelazione del liquido extracellulare col latte (Zhao and Lacasse, 2007).

A seguito dell'invasione da parte dei microrganismi, il tessuto rilascia sostanze chemotattiche che richiamano leucociti polimorfonucleati: questi hanno il compito di distruggere l'agente patogeno tramite meccanismi ossigeno-dipendenti e ossigeno-indipendenti. L'attivazione del respiratory burst e il rilascio di enzimi contenuti nei granuli può contribuire a peggiorare il danno tissutale e ad alterare la normale funzionalità della ghiandola mammaria (Paape *et al.*, 2002).

Nelle mastiti clinicamente evidenti si notano gonfiore, dolore e aumento di consistenza della mammella, spesso associate a risentimento sistemico con pirolessia e anoressia fino al decubito nelle forme più gravi. Inoltre le secrezioni latte possono presentare coaguli o addirittura striature di sangue (Edmondson and Bramley, 2004).

Diversamente, nelle forme subcliniche, l'unico indice che può confermare la presenza di un'infiammazione a carico della ghiandola mammaria è il numero di cellule somatiche nel latte: queste comprendono neutrofilii, macrofagi e linfociti, e nella maggior parte delle vacche sane questo valore risulta essere inferiore a 50.000 cellule per millilitro di latte (Edmondson and Bramley, 2004).

Nonostante la maggior parte della popolazione leucocitaria normalmente presente nel latte sia rappresentata da linfociti e macrofagi, spetta ai neutrofilii il sistema più efficace di difesa della ghiandola mammaria: il numero di questi ultimi tende ad aumentare infatti rapidamente nelle prime fasi di infezione (Hibbit *et al.*, 2004).

2.5.3.2. Infiammazioni uterine post parto

Tra i processi infiammatori che colpiscono l'utero post parto si ricordano la metrite puerperale (con rilevamento di risentimento sistemico, febbre e utero dilatato con presenza di materiale fetido rosso-bruno entro 21 giorni dal parto), la piometra (se presenti pus all'interno dell'utero contemporaneamente alla presenza di un corpo luteo persistente e cervice chiusa) e le metriti ed

endometriti cliniche o subcliniche (Sheldon *et al.*, 2006). Sheldon e colleghi (2006) descrivono la metrite clinica come una forma di dilatazione uterina, non necessariamente accompagnata da risentimento sistemico, con presenza di pus in vagina entro 21 giorni dal parto: la persistenza di questa situazione oltre le tre settimane post parto o la presenza di materiale mucopurulento (circa 50% di pus e 50% di muco) fa definire la patologia come endometrite clinica. La diagnosi di forme subcliniche è invece basata su rilievi citologici.

L'endometrite, ovvero l'infiammazione dell'endometrio che spesso esita in forme di subfertilità o infertilità, deriva da una contaminazione uterina da parte di batteri a seguito di fenomeni predisponenti quali ritenzione degli invogli fetali, distocia, taglio cesareo, parto gemellare, morte fetale, parto indotto o scarsa igiene dell'ambiente in cui avviene il parto (Sheldon *et al.*, 2004). La ritenzione degli invogli fetali tende a dare le forme più gravi di endometrite (Sheldon e Noakes, 1998), mentre la scarsa igiene della zona parto è responsabile di un importante aumento del rischio di insorgenza della patologia (Noakes *et al.*, 1991).

Poiché clinicamente le endometriti si manifestano con scolo vaginale mucopurulento associato a scarsa involuzione uterina (Sheldon *et al.*, 2004), la tecnica più utilizzata per la diagnosi è la valutazione dello scolo vaginale (colore, presenza di pus, quantità, odore e presenza di flocculazioni) e la palpazione dell'utero tramite ispezione rettale (allo scopo di evidenziare il diametro di cervice e corna uterine e quindi il livello di involuzione uterina) (Sheldon and Noakes, 1998).

L'impatto delle patologie uterine post parto sulla fertilità degli animali è legata all'alterazione del profilo progestinico, che indica ovulazione ritardata, cisti ovariche e prolungamento della fase luteale (Opsomer *et al.*, 2000; Royal *et al.*, 2000a). Questo comporta perdita economica dovuta all'eliminazione degli animali a causa dell'infertilità, al calo della produzione latte e ai costi del trattamento (Sheldon *et al.*, 2009).

2.5.3.3. Le patologie podali

La più rilevante manifestazione clinica comune alle patologie podali è la zoppia, ovvero l'alterazione della locomozione che gli animali sfruttano per alleviare o eliminare il dolore derivante da lesioni o infiammazioni dell'arto colpito (Scott,

1989; Hardie, 2000). Oltre a diminuire il benessere animale, essa ha un impatto economico rilevante sottoforma di costi di trattamento e misure di controllo (Moore *et al.*, 2001), peggioramento delle performance riproduttive (Sprecher *et al.*, 1997), calo della produzione latte (Warnick *et al.*, 2001), aumento del numero di capi eliminati e calo del valore della carcassa dei capi macellati (van Arendonk *et al.*, 1984).

La maggior parte delle patologie responsabili di zoppia colpiscono il piede e possono essere classificate in quattro gruppi: ulcere soleari e lesioni della linea bianca, altre patologie minori dell'unghione, patologie cutanee e patologie della terza falange e dell'osso navicolare (Blowey, 2004).

Le ulcere soleari e i difetti della linea bianca (che comprendono la formazione di ascessi sterili, separazione della linea bianca e infezioni penetranti che sfociano a livello della corona) sono causate da un indebolimento del tessuto corneo derivante da una patologia del corion (ovvero la componente responsabile della formazione della scatola cornea) che prende il nome di coriosi o podoflemmatite asettica o, meno correttamente, laminite (Blowey, 2004).

Tra i fenomeni responsabili dell'insorgenza della coriosi vengono riportati fattori alimentari (come il rilascio di istamina dalle fonti proteiche della dieta (Nillson 1963) o assorbimento di endotossine responsabili di forme trombotiche (Andersson and Bergman, 1980)) e fattori manageriali (come il tipo di pavimentazione (Bergsten, 1994), la stazione prolungata per scarso comfort d'allevamento (Leonard *et al.*, 1994) e il corretto svolgimento del pareggiamento dei piedi (Manson and Leaver, 1988b)).

Secondo Ossent (1995) la coriosi evolve in tre stadi: in una prima fase l'alterazione del flusso sanguigno nel corion comporta una scarsa ossigenazione e quindi una scarsa sintesi di cheratina. Nella seconda fase viene alterata la sospensione della terza falange a causa dell'alterazione della componente lamellare dell'unghione, con conseguente rotazione della falange stessa. Infine la compressione dell'osso sul corion (in particolare al di sotto della tuberosità su cui si inserisce il tendine flessore) comporta un'ulteriore necrosi ischemica e alterazione nella produzione di tessuto corneo, che esita quindi nell'ulcera soleare. La teoria più probabile dell'iniziale modificazione vascolare resta quella del "ristagno" di sangue all'interno del piede a causa della vasodilatazione e dell'apertura degli shunt artero-venosi presenti

fisiologicamente a questo livello. Una volta che la terza falange è ruotata non è in grado di tornare alla posizione di partenza; oltre a questo il corion va incontro a processi di fibrosi che alterano perennemente la capacità di produrre tessuto corneo di buona qualità, creando così una maggiore predisposizione all'insorgenza di altre coriosi (Blowey, 2004).

Altre cause di zoppia che possono derivare da alterazioni dell'unghione comprendono la penetrazione da parte di corpi estranei, *slurry heel* (in cui il mancato corretto appoggio sui talloni comporta una rotazione della terza falange e quindi compressione del corion), fessure verticali (a causa di danni a carico della benda perioplica) o fessure orizzontali (dovute ad un periodo di mancata produzione dell'unghione in animali che soffrono di patologie debilitanti come mastiti, metriti o qualsiasi forma di tossiemia) (Blowey, 2004).

Un altro tipo di patologia podale è dato dalla necrobacillosi interdigitale, una dermatite necrotizzante acuta o subacuta in cui *Fusobacterium necrophorum* sembra giocare un ruolo centrale; essa origina dalla cute dello spazio interdigitale e crea quadri clinici contraddistinti da piressia, anoressia, calo della produzione latte e presenza di essudato nauseabondo. Questi sintomi spesso peggiorano a causa di infezioni secondarie (Greenough *et al.*, 1981; Alban *et al.*, 1994).

La dermatite digitale, probabilmente dovuta alla presenza contemporanea di più patogeni, si presenta invece sottoforma di alterazioni nella parte caudale del piede, in prossimità dello spazio interdigitale. Inizialmente le lesioni sono di tipo ulcerativo a margini definiti, umide, molto dolenti e talvolta sanguinanti (Shearer, 1996).

Altre forme di patologie cutanee che conducono a zoppia sono la dermatite interdigitale (che sembra essere una combinazione di dermatite digitale cronica e *slurry heel*); l'iperplasia interdigitale cutanea (che dà zoppia quando la lesione assume dimensioni rilevanti o quando subisce infezioni secondarie); *la mud fever* (con desquamazione cutanea a seguito di esposizione al freddo) (Blowey, 2004).

Le ulcere soleari, i difetti della linea bianca, la necrobacillosi interdigitale o la penetrazione di corpi estranei, soprattutto se trascurate, possono dare origine a patologie secondarie delle strutture più profonde come tendini, articolazioni e componenti ossee sottostanti come l'osso navicolare e la terza falange:

quest'ultima nella bovina può essere colpita da una particolare forma osteomielitica detta "necrosi apicale della terza falange" (Blowey, 2004)

2.6. MARCATORI DI INFIAMMAZIONE

2.6.1. APTOGLOBINA (Hp)

L'aptoglobina (Hp) è una proteina di fase acuta positiva che ha come ruolo fondamentale quello della rimozione dell'emoglobina presente nel torrente circolatorio a seguito di fenomeni emolitici o del fisiologico turnover dei globuli rossi (Quaye, 2008). L'innalzamento della concentrazione di questa molecola avviene primariamente grazie al meccanismo di induzione dato dall'IL-6, prodotta grazie alla stimolazione da parte di altre citochine come TNF- α e IL-1 (Oliviero *et al.*, 1987).

La concentrazione dell'aptoglobina tende ad aumentare abbondantemente durante i processi infiammatori, in particolare tra le 24 e le 48 ore che seguono un intervento chirurgico o un'infezione batterica o virale (mastiti, polmoniti, enteriti, peritoniti, endocarditi, ascessi, traumi, endometriti). Il suo innalzamento è però riscontrato anche in situazioni non associate ad infiammazione quali il parto nelle bovine, lo stress da trasporto nei vitelli o la lipidosi epatica, probabilmente a causa dell'induzione degli epatociti alla secrezione dell'aptoglobina a seguito di stimolazione da parte dei glucocorticoidi o dell'estradiolo (Thomas, 2000). In un recente studio di Huzzey *et al.* (2009) si evidenzia infatti che bovine nella fase del parto, in assenza di segni clinici di metrite, presentano un picco nella concentrazione di aptoglobina il terzo giorno dopo il parto. Questo parametro tende poi a diminuire gradualmente fino a raggiungere valori basali stabili intorno al dodicesimo giorno post parto. Nello stesso studio si dimostra inoltre che nelle bovine con forme lievi e gravi di metrite, nello stesso intervallo di tempo, si rilevano valori più elevati di aptoglobina rispetto al gruppo senza segni clinici (Fig. 2.7.).

Una delle più importanti proprietà dell'aptoglobina è quella di riduzione dello stress ossidativo. Tseng *et al.* (2004) hanno dimostrato che il suo potere antiossidante supera di gran lunga quello della vitamina C: questa caratteristica

contribuisce in maniera rilevante al mantenimento dello stato redox cellulare tramite la mitigazione del *respiratory burst*, con conseguente riduzione del danno ai tessuti circostanti. Inoltre l'aptoglobina limita i danni indotti dalle specie reattive dell'ossigeno grazie al legame con l'emoglobina libera (che rappresenta una potenziale responsabile di danno ossidativo) e alla riduzione nel rilascio del gruppo eme (Quaye, 2008). È stato infine dimostrato (Salvatore *et al.*, 2007) che questa proteina di fase acuta è coinvolta nel meccanismo di protezione dell'Apo A-1 dal danno mediato dai radicali liberi e nella prevenzione della formazione di addotti tra HDL e altre lipoproteine: la corretta attività dell'Apo A-1, che consiste nel trasportare il colesterolo al fegato per la sua successiva degradazione, garantisce quindi benefici nell'ambito dell'insorgenza delle patologie cardiovascolari.

Oltre alle proprietà antiossidanti, l'aptoglobina possiede importanti proprietà immunomodulatorie: essa promuove l'apoptosi dei neutrofilii nella fase di richiamo di monociti e macrofagi alla sede infiammata (Kim *et al.*, 1995), è in grado di sedare il processo infiammatorio tramite l'inibizione dell'attività degli enzimi COX e LOX (meccanismo che limita ulteriormente il danno ai tessuti) (Saeed *et al.*, 2007) ed è coinvolta nelle fasi riparative (Gabay, 2006).

La concentrazione di aptoglobina nei bovini sani risulta spesso non misurabile (Makimura and Suzuki, 1982; Conner *et al.*, 1986; Eckersall and Conner, 1988), mentre durante la reazione di fase acuta essa può aumentare fino a 50-100 volte (Conner *et al.*, 1988; Conner *et al.*, 1989; Gruys *et al.*, 1993; Godson *et al.*, 1996), rendendola così la più importante proteina di fase acuta nella specie bovina (Alsemgeest *et al.*, 1994).

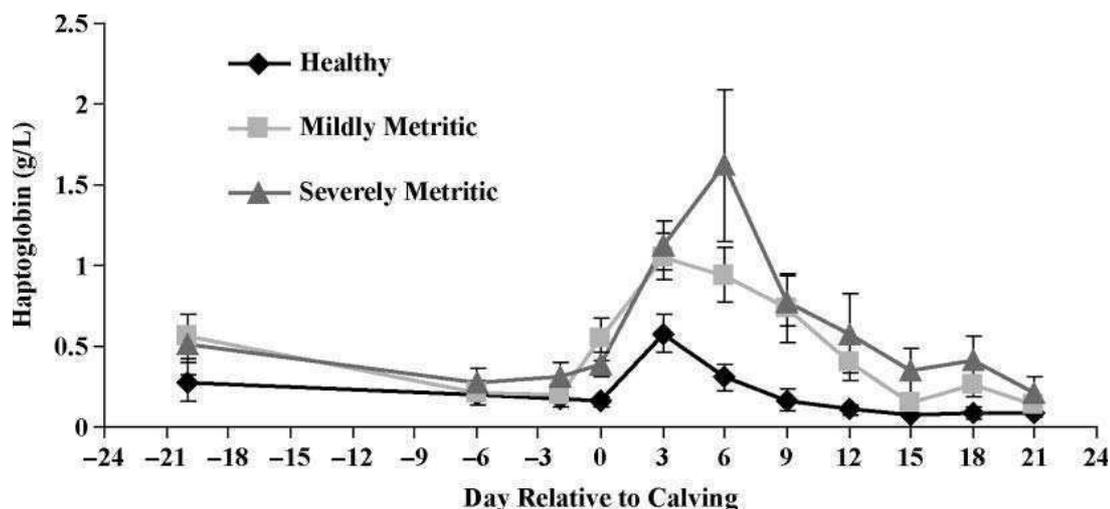


Fig. 2.7.: Concentrazioni medie di aptoglobina in animali sani (n=23), con lieve metrite (n=32) e grave metrite (n=12) durante il periparto. (Huzzey *et al.*, 2009)

2.6.2. VARIAZIONE DEI PARAMETRI LEUCOCITARI NEI PROCESSI INFIAMMATORI NEL BOVINO

La valutazione dello striscio di sangue è di notevole importanza per osservare eventuali alterazioni che indicano la presenza di una turbativa ambientale che induce un tentativo di adeguamento omeostatico di entità diversa. E' possibile, infatti, osservare alterazioni del normale rapporto mono/polinucleati indice di veri e propri fenomeni settici. Oltre a questa condizione, si può talora osservare soprattutto nelle bovine da latte una cospicua monocitosi, possibile indice di stati infiammatori cronici. Tuttavia il valore dei monociti nella bovina da latte ad alta produzione risulta essere spesso superiore alla norma. Tale condizione è molto più rara negli animali da carne.

I parametri ematici possono aiutare nell'individuazione del *disease stress*, cioè dello stress collegato ad uno stato patologico: uno stato infiammatorio, infatti, può essere esso stesso causa di minor benessere, accentuando il rischio di malattia nell'animale (Cowell *et al.*, 2008)

I leucociti sono cellule nucleate del sangue capaci di partecipare all'eliminazione di diversi elementi estranei, con lo scopo di difendere adeguatamente l'organismo. Si suddividono in granulociti, (neutrofili, basofili ed eosinofili) ed agranulociti (linfociti e monociti) in base a particolari caratteristiche citoplasmatiche (presenza di granuli).

I neutrofili presentano un nucleo allungato e polilobato con segmentazione variabile a seconda del grado di maturazione assumendo una colorazione viola

scuro con il citoplasma leggermente roseo. Nei ruminanti corrispondono alla seconda specie della linea bianca presente.

Gli eosinofili presentano un nucleo polilobato e sono in numero minore dei neutrofili, sono facilmente identificabili per la presenza di numerosi e piccoli granuli acidofili rosa-arancio.

I basofili, rari nel sangue, presentano dei granuli rosso-porpora che riempiono tutto il citoplasma

I linfociti si distinguono per il loro nucleo rotondo di cromatina addensata con citoplasma moderatamente basofilo (leggermente azzurro). Sono la forma predominante espressa nei ruminanti.

I monociti si presentano più grandi dei linfociti con il tipico nucleo di aspetto variabile (ovale, reniforme, spesso ameboide) con cromatina reticolare. Il citoplasma è abbondante, azzurro vacuolizzato e con leggere granulazioni rosate.

La variazione del numero dei leucociti totali assume particolare significato clinico. L'aumento del loro numero può essere secondario a stati infettivi acuti, stress, gravidanza, lavoro muscolare, infezioni localizzate, intossicazioni esogene ed endogene, post-emorragie e forme leucemiche. La diminuzione del loro numero diventa invece secondaria a malattie virali, anemie aplastiche, stati anafilattici, tossicosi croniche e stati di malnutrizione.

Inoltre bisogna tener presente che esiste una stretta relazione che lega i parametri ematici allo stadio fisiologico ed all'attitudine produttiva dell'animale (lattifere: asciutta, transizione, fresche, lattazione e tarda lattazione, ma anche primipare e pluripare; vitelli: 3-4 mesi, 12-14 mesi e 18-24 mesi) (Goff and Horst 1997).

I valori di riferimento per le varie popolazioni leucocitarie sono indicate in tabella 2.2.

| Bovino | |
|---------------|---------|
| Neutrofili | 15-45 % |
| Linfociti | 45-75 % |
| Monociti | 2-7 % |
| Eosinofili | 0-20 % |
| Basofili | 0-2 % |

Tab. 2.2.: Valori di riferimento nel sangue bovino
(da Feldman B.F. et al., 2000)

Un significato maggiore assume la variazione del loro numero in riferimento alle singole popolazioni cellulari, come riportato nella seguente tabella 2.3. (Feldman B.F. et al 2000; Duncan JR, et al 1994.).

| LEUCOCITI | CAUSE DI AUMENTO | CAUSE DI DIMINUZIONE |
|----------------|--|--|
| Neutrofili (N) | Corticosteroidi, emolisi, emorragie, infiammazioni acute, necrosi, miositi ed infarto | Ipoplasia o necrosi del midollo osseo, malattie |
| Linfociti (L) | Stimolazione cronica da agenti esterni (actinomicosi, brucellosi, babesiosi e pneumocisti) | Patologie batteriche acute, stress somministrazione di glucocorticoidi, sindromi da immunodeficienza |
| Monociti (M) | Lesioni infiammatorie, setticemia, miocarditi e lesioni piogranulomatose | |
| Eosinofili (E) | | Somministrazione di corticosteroidi, infiammazioni acute, stress |

Tab. 2.3.: Principali cause di aumento o diminuzione delle varie popolazioni cellulari (Feldman B.F. et al., 2000).

2.6.3. INTERLEUCHINA 6 (IL-6)

L'interleuchina 6 svolge un importante ruolo come regolatore della risposta di fase acuta, fattore di stimolazione linfocitaria e mediatore della transizione tra risposta immunitaria innata e acquisita (Kishimoto *et al.*, 1995; Jones and Rose-John, 2002; Kaplanski *et al.*, 2003). La risposta classica all'IL-6 è data da un complesso recettoriale costituito da due subunità legate alla membrana: una catena chiamata IL-6R α e un recettore (gp130) espresso in modo ubiquitario (Murakami *et al.*, 1993). La risposta all'IL-6 normalmente prende origine dall'interazione di questa molecola col recettore gp130 (Heinrich *et al.*, 2003; Ernst and Jenkins, 2004). Questo avviene classicamente tramite il legame dell'interleuchina con il suo recettore legato alla membrana IL-6R α ; esiste tuttavia un'analogia forma solubile di quest'ultimo (sIL-6R α) che permette all'IL-6

di usufruire di un meccanismo alternativo di attivazione del gp130 chiamato *trans-signaling*. Quest'ultimo risulta dalla formazione di un complesso sIL-6R/IL-6 che è in grado di legare direttamente il gp130 (Jones and Rose-John, 2002). Questo tipo di interazione permette di attivare cellule che non sarebbero in grado di rispondere direttamente all'IL-6, visto che il gp130 è espresso in maniera ubiquitaria (Jones and Rose-John, 2002).

Il meccanismo del *trans-signaling* è il responsabile della clearance neutrofilica nella sede infiammata e della sostituzione di questa componente cellulare con quella mononucleata (Hurst *et al.*, 2001; Mc Loughlin *et al.*, 2003); questa regolazione del tipo di infiltrato infiammatorio avviene tramite il controllo dell'apoptosi leucocitaria e l'espressione di chemochine infiammatorie e molecole di adesione. Tutto questo è fondamentale nel passaggio tra risposta immunitaria innata e acquisita nella sede infiammata e quindi nella risoluzione del processo flogistico stesso (Modur *et al.*, 1997; Romano *et al.*, 1997; Atreya *et al.*, 2000; Hurst *et al.*, 2001; Marin *et al.*, 2001; Mc Loughlin *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004).

IL-6 è coinvolta nei meccanismi di differenziazione cellulare monocito-macrofagica (Chomarat *et al.*, 2000; Bleier *et al.*, 2004; Jenkins *et al.*, 2004), nella polarizzazione dei linfociti T (Romani *et al.*, 1996; Ohshima *et al.*, 1998; Diehl *et al.*, 2000), nella proliferazione cellulare mediata dall'IL-2 (Baroja *et al.*, 1998; La Flamme and Pearce, 1999), nell'adesione dell'L-selectina (Chen *et al.*, 2004), nell'attivazione dei linfociti B e produzione anticorpale (La Flamme and Pearce, 1999) e infine nel preservare i linfociti T dal meccanismo apoptotico (Atreya *et al.*, 2000; Teague *et al.*, 2000; Narimatsu *et al.*, 2001; Takeda *et al.*, 1998; Curnow *et al.*, 2004). Quest'ultimo sembra essere un meccanismo di fondamentale importanza nella progressione dell'infiammazione cronica.

2.6.4. TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF α)

Il TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) è una citochina di fase acuta che interviene in una grande varietà di attività biologiche che includono l'apoptosi, la proliferazione cellulare, l'immunomodulazione, l'infiammazione, la replicazione virale, l'allergia, l'artrite, lo shock settico, la resistenza insulinica, le patologie

autoimmuni e altre condizioni patologiche (Aggaval, 2000; Dziegielewska *et al.*, 2000). Con particolare riferimento al processo infiammatorio, il TNF- α , similmente all'IL-1, induce l'espressione di molecole di adesione a livello endoteliale; queste molecole interagiscono quindi coi leucociti nel torrente circolatorio e innescano il processo di migrazione (Burger and Dayer, 2002).

Prodotto primariamente da cellule del sistema immunitario, il TNF- α interagisce con due tipi di recettori, ovvero il TNF- α receptor 1 (TNFR1 o p55) e il TNF- α receptor 2 (TNFR2 o p75) (Abe *et al.*, 1994). Il TNF-R1 è espresso costitutivamente nella maggior parte dei tessuti, mentre l'espressione di TNF-R2 è finemente regolata e limitata alle cellule del sistema immunitario (Wajant *et al.*, 2002).

Il TNF- α viene prodotto primariamente da macrofagi, ma anche da cellule linfoidei, mastociti, cellule endoteliali, fibroblasti e tessuto nervoso; insieme ad altre citochine assume un ruolo centrale nello shock settico e viene rilasciato in grande quantità in risposta ai lipopolisaccaridi o altri prodotti di origine batterica (Mannel and Echtenacher, 2000; Wajant *et al.*, 2002). Alcuni studi hanno dimostrato che l'insieme delle risposte infiammatorie dell'ospite, tipiche dell'endotossitemia mortale o batteriemia da gram-negativi, può essere riprodotto in animali sani somministrando TNF- α (Beutler *et al.*, 1986; Tracey *et al.*, 1987; Tracey *et al.*, 1988). Tuttavia Echtenacher *et al.* (1990) dimostrarono che il blocco nella secrezione di TNF- α endogeno rende letale un quadro di peritonite di per sé non mortale, mentre altri studi conclusero che il blocco della secrezione della molecola non ha nessun impatto sull'esito della peritonite (Bagby *et al.*, 1991; Eskandari *et al.*, 1992; Remick *et al.*, 1995). Quindi, in talune condizioni, il rilascio di TNF- α endogeno potrebbe risultare essenziale, mentre i tentativi di diminuire le concentrazioni della molecola darebbero esito sfavorevole.

Il TNF- α induce direttamente l'espressione e il rilascio di fattori umorali inclusi IL-10 (Platzer *et al.*, 1995; Wanidworanun and Strober, 1996), corticosteroidi (van der Pollet *et al.*, 1991) e prostanoidi (Dayer *et al.*, 1985) che agiscono con un meccanismo a feedback negativo che sopprime la produzione e la processazione del TNF- α . Questi meccanismi permettono di garantire un'iniziale risposta innata e pro-infiammatoria garantita dal TNF- α e al tempo stesso di limitare in seguito la durata e l'intensità del processo flogistico. Inoltre

il TNF- α è coinvolto nel meccanismo apoptotico in varie popolazioni cellulari: questo sembra spiegare la distruzione programmata di parte della componente cellulare immunitaria durante il processo infiammatorio (Ayala *et al.*, 1996), come la rimozione di linfociti T durante i processi settici (Wang *et al.*, 1994) o di neutrofili dai siti infiammati (Liles and Klebanoff, 1995).

Il TNF- α può però anche indurre l'attivazione di citochine pro-infiammatorie che antagonizzano il meccanismo apoptotico, come l'IL-1, IL-6 e *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*: recenti studi hanno infatti dimostrato che il TNF- α non solo stimola la morte programmata cellulare, ma allo stesso tempo induce meccanismi che proteggono la cellula stessa dall'evento apoptotico (Beg and Baltimore, 1996).

2.6.5. INTERFERONE ALFA (INF- α)

Il gruppo degli interferoni (IFN) viene classicamente diviso in due famiglie: gli interferoni di tipo I (che comprendono IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- τ , IFN- δ , IFN- κ e IFN- ϵ) e l'interferone di tipo II (che comprende il solo IFN- γ) (Platanias, 2005).

L'IFN- α , la cui secrezione è innescata primariamente dalla stimolazione di recettori citoplasmatici da parte di prodotti di origine virale, è stato inizialmente studiato per le sue spiccate attività antivirali; tuttavia risulta ormai evidente che esso è in grado di intervenire sull'attività del sistema immunitario e in particolare di determinare il passaggio tra immunità innata e acquisita (Biron, 2001).

L'attività dell'IFN- α è dovuta al suo legame con particolari recettori (IFNAR) che a loro volta interagiscono con due molecole denominate *tyrosine kinase 2* (TYK2) e *Janus-activated kinase 1* (JAK1), responsabili dell'attivazione delle cosiddette *signal transducers and activators of transcription* (STAT): le successive interazioni di questo gruppo di molecole esita nella formazione di un complesso ISGF3 (*IFN-stimulated genes factor 3*) responsabile dell'attivazione dei meccanismi di trascrizione (Taniguchi *et al.*, 2001; Platanias, 2005). In questo modo L'IFN- α potenzia l'attività dell'IL-6 e induce la sintesi di chemochine (in particolare CXCL10), recettori per le chemochine, transforming growth factor- β , antagonisti recettoriali dell'IL-1 e recettori per il TNF

(Theofilopoulos *et al.*, 2005). Gli interferoni di tipo I inducono la citotossicità delle cellule natural killer, lo sviluppo e la maturazione macrofagica e la produzione di iNOS (Taniguchi *et al.*, 2001).

È stato inoltre suggerito il fondamentale ruolo che gli interferoni di classe I potrebbero avere nel determinare il passaggio tra immunità innata e acquisita: alcune citochine (come IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15) sono interessate nella proliferazione dei linfociti T, in modo da ricostituire il pool destinato alla memoria immunitaria, oltre che nell'inibizione dell'apoptosi di queste stesse cellule (Vella *et al.*, 1998). Gli interferoni di tipo I sembrano coinvolti nella proliferazione dei linfociti T CD8⁺ memoria indirettamente, tramite la secrezione indotta di IL-15 (Tough and Sprent, 1994, 1998; Tough *et al.*, 1999). In alcuni studi è risultato però evidente che la maggior parte di queste cellule si trovano in uno stato di quiescenza e non di ciclicità (Tough and Sprent, 1994; Tough *et al.*, 1999). Un modo con cui può essere prevenuta l'apoptosi dei linfociti CD4⁺ e CD8⁺, senza innescare un meccanismo di proliferazione cellulare, è quello di metterli in coltura con fibroblasti, cellule stromali o i prodotti derivanti dalle loro secrezioni (Akbar and Salmon, 1997). In questo meccanismo sembrano appunto coinvolti primariamente l'IFN-β (Pilling *et al.*, 1999), ma anche l'IFN-α che previene l'apoptosi direttamente e senza riattivare la ciclicità cellulare (Marrack *et al.*, 1999; Pilling *et al.*, 1999). A causa di questo meccanismo, si suppone che la produzione esuberante di queste citochine possa indurre un'eccessiva sopravvivenza dei linfociti T e quindi innescare il processo dell'infiammazione cronica (Akbar *et al.*, 2000).

2.6.6. CORTISOLO

La funzione principale di questo steroide è quella di controllare le attività cataboliche e anaboliche nell'arco delle 24 ore, adattandole ai ritmi di attività dell'animale. La liberazione di cortisolo segue ritmi circadiani: durante i periodi di attività il tasso circolante è elevato (prevale il catabolismo), al contrario durante i periodi di riposo i livelli sono al minimo (prevale l'anabolismo).

Il cortisolo riveste un ruolo fondamentale in tutte le situazioni di stress sacrificando le funzioni anaboliche mette a disposizione più energia per le

funzioni vitali, permettendo all'animale di reagire più rapidamente agli stimoli esterni.

Si capisce perché l'attivazione cronica della risposta allo stress possa essere dannosa alla salute in vari modi. Se il glucosio viene costantemente mobilizzato invece di essere immagazzinato, si verifica atrofia dei tessuti sani ed affaticamento muscolare (Casadevall et al. 1999). Dopo un certo tempo i cambiamenti nel sistema cardiovascolare provocano ipertensione che, a sua volta, può danneggiare il cuore, i vasi sanguigni e i reni. Inoltre possono esserci compromissione della crescita e della riparazione dei tessuti, riduzione della fecondità.

L'assunzione che lo stress influenzi il sistema immunitario deriva dall'osservazione di un aumento delle malattie in animali esposti ad ambienti molto stressanti e come indicano i risultati di Selye (1974), la diminuzione della funzionalità del sistema immunitario causa un aumento della suscettibilità alle ulcere peptiche (Sapolsky, 1990).

In particolare agisce sugli elementi ematici e sul tessuto linfoide: i glucocorticoidi causano un lieve aumento del numero di globuli rossi e del loro contenuto in emoglobina, molto più evidenti sono gli effetti sulle cellule della linea bianca. Alti livelli di cortisolo infatti inducono il cosiddetto leucogramma da stress caratterizzato da leucocitosi neutrofila, linfocitopenia, monocitopenia ed eosinopenia. Deprimono la formazione di linfociti da parte del tessuto linfoide, determinandone l'atrofia (Cowell *et al.* 2008)

Il cortisolo ha un'influenza specifica molto importante sulle reazioni provocate da traumi tissutali, da sostanze chimiche irritanti, da proteine estranee ed alle infezioni. Questo steroide ha l'effetto di inibire tutti i processi che si verificano in caso di un danno tissutale. I meccanismi attraverso cui il cortisolo inibisce queste risposte sono qui schematizzate (Langhoff *et al.*, 1985):

inibizione delle risposte infiammatorie acute:

- Induce la sintesi di lipocortina che inibisce l'enzima fosfolipasi A₂ riducendo la sintesi di prostaglandine, trombossani e leucotrieni dell'acido arachidonico con conseguente diminuzione delle reazioni infiammatorie acute.
- Dilatazione capillare.

- Stabilizza i lisosomi e riduce la liberazione di enzimi proteolitici e di ialuronidasi capaci di degradare sostanze estranee.
- Riduce l'attrazione chemotattica e l'aderenza dei neutrofili.

inibizione delle risposte infiammatorie croniche:

- proliferazione dei fibroblasti.
- sintesi e deposizione di fibrille di collagene.

inibizione delle risposte immunitarie:

- mobilitazione, circolazione e trasporto dei linfociti T.
- riduce la sintesi di interleuchina IL-1 da parte dei macrofagi reprimendo l'espressione del suo gene; si blocca così l'intera cascata dei processi di immunità cellulo- mediata.
- Rallenta la produzione di anticorpi da parte dei linfociti B.

2.6.7. DHEA

Il deidroepiandrosterone (DHEA) è uno dei prodotti della steroidogenesi. Questo androgeno deriva dall'attività del citocromo P450_{scc} che converte il colesterolo in pregnenolone e, successivamente, del P450_{c17} che converte quest'ultimo a 17-idrossi-pregnenolone e quindi DHEA. Questo steroide può essere presente anche nella sua forma di solfato (DHEAS): la reazione di solfatazione è mediata dall'enzima idrossisteroide sulfotransferasi (HST), mentre la reazione opposta è dovuta alla steroido-solfatasi (Maninger *et al.*, 2009).

Il DHEA viene trasformato a livello dei tessuti periferici in estrogeni e androgeni, essendone un fondamentale precursore (Labrie *et al.*, 2005). Oltre a questo, nonostante sia lo steroide maggiormente presente nel torrente circolatorio umano, il suo ruolo nella fisiologia, il suo meccanismo d'azione e il suo possibile coinvolgimento nelle patologie è ancora poco compreso (Maninger *et al.*, 2009). Studi condotti sull'uomo hanno dimostrato che i livelli di DHEA plasmatici variano nel corso della vita. La concentrazione dell'ormone (sia DHEA che DHEAS), prodotto dalla zona reticolare del surrene, inizia ad aumentare intorno ai 6-8 anni (Parker and Odell, 1980; Havelock *et al.*, 2004); successivamente anche testicoli/ovaie iniziano a produrre DHEA (Nieschlag *et al.*, 1973). Il picco

di secrezione avviene intorno ai 20 anni oltre i quali la concentrazione diminuisce gradualmente fino ad arrivare al minimo valore intorno ai 65-70 anni, età in cui aumenta l'incidenza di patologie legate all' invecchiamento (Azuma *et al.*, 1993; Regelson and Kalimi, 1994; Guazzo *et al.*, 2006).

I dati riguardanti la secrezione del DHEA nella bovina sono invece molto più scarsi. Wise *et al.* (1982) evidenziarono che non esiste una correlazione tra concentrazione di DHEA/altri androgeni e giorno del ciclo ovarico o flusso sanguigno ovarico. Studi più recenti hanno dimostrato la capacità della ghiandola mammaria di convertire il DHEA in androstene-3 β ,17 β -diolo (Belvedere *et al.*, 1996) alterando così i livelli circolanti dell'androgeno. È stato inoltre evidenziato che esiste un incremento della concentrazione di DHEA nella fase terminale della gravidanza, seguito da un brusco calo dopo il parto (Gabai *et al.*, 2004). Almeida *et al.* (2007) dimostrarono che le concentrazioni sieriche del DHEA tendono a diminuire in animali in cui si evidenziano lesioni infiammatorie podali. Questo può essere giustificato dal fatto che, nonostante sia il cortisolo che il DHEA abbiano proprietà antinfiammatorie, il primo è responsabile di un importante fenomeno immunosoppressivo (Cupps and Fauci, 1982), mentre il secondo ha proprietà "immuno-protettive" (Sacco *et al.*, 2002). Il DHEA infatti dà origine ad aumento delle resistenze nei confronti di infezioni virali e batteriche (Loria *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1999), inibisce la produzione di IL-6 ed è quindi coinvolto nei disordini immunitari legati all' invecchiamento (Daynes *et al.*, 1993; Du *et al.*, 2001), ristabilisce le normali funzioni immunitarie dopo insulti termici o traumatico-emorragici e riduce la mortalità nei fenomeni settici (Ben-Nathan *et al.*, 1999; Marx *et al.*, 2003). Le concentrazioni di DHEA sembrano diminuire nei processi infettivi gravi (Rook *et al.*, 1997), nei processi infiammatori cronici (Masi *et al.*, 1984; Lahita *et al.*, 1987; Deighton *et al.*, 1992; Straub *et al.*, 1998; Dillon, 2005) e nell'invecchiamento nell'uomo, con conseguente aumento del rischio di insorgenza di disfunzioni immunitarie e patologie infiammatorie (Buckingham, 1996; Bauer, 2005). Il motivo del calo della concentrazione di DHEA negli animali con patologie podali dello studio di Almeida *et al.* (2007), va quindi ricercato probabilmente nella cronicità dei casi trattati, anche se il reale motivo della diminuzione dei livelli dell'ormone nei processi infiammatori cronici non è ancora compreso. Tuttavia, un calo di questo ormone potrebbe causare un

aumento del danno tissutale, visto che il DHEA normalmente inibisce l'espressione di potenti citochine pro-infiammatorie (come il TNF- α e l' IL-6) (Daneberg, 1992; Di Santo *et al.*, 1996; Araghi-Niknam *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1998).

Infine recenti studi hanno dimostrato che l'ACTH non è un fondamentale secretagogo del DHEA e che la ghiandola surrenale contribuisce scarsamente alla quantità di DHEA nel torrente circolatorio; sembra invece che negli animali gravidi la maggiore fonte di DHEA sia la placenta, responsabile dell'aumento della concentrazione dello steroide nella fase terminale della gravidanza e della discesa rapida di questo valore dopo il parto (Marinelli *et al.*, 2007).

Si suppone esista inoltre un'importante correlazione tra DHEA e stato infiammatorio. Il DHEA è in grado di inibire la secrezione di citochine proinfiammatorie come quella del tumor necrosis factor (TNF) (Daneberg *et al.*, 1992; Di Santo *et al.*, 1996; Araghi *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1998; Padgett and Loria 1998). Contemporaneamente questo steroide può favorire l'attività dei linfociti T-helper 1 (Th1) e inibire quella dei T-helper 2 (Th2) (Wilder, 1996). A causa di questo meccanismo il DHEA può svolgere un ruolo anti-infiammatorio nelle infiammazioni guidate dai Th2 e un effetto pro-infiammatorio in quelle guidate dai Th1.

Queste proprietà immunomodulatorie hanno suggerito il possibile ruolo del DHEA nelle patologie infiammatorie e giustificano l'effetto positivo dell'ormone nel miglioramento di patologie quali colite ulcerativa (Andus *et al.*, 2000) e lupus eritematoso sistemico (van Vollenhoven *et al.*, 1995; van Vollenhoven *et al.*, 1999), sottoforma di una riduzione della progressione della patologia (van Vollenhoven *et al.*, 1995; Andus *et al.*, 2000), aumento della densità ossea (Labrie *et al.*, 1997; Villareal *et al.*, 2000) e miglioramento del benessere e della salute mentale (Arlt *et al.*, 1999).

Alcuni studi condotti sull'uomo hanno messo in relazione i livelli di cortisolo e DHEA in pazienti sani e con presenza di processi infiammatori acuti o cronici (Straub *et al.*, 2002): nelle infiammazioni acute i livelli di DHEA e cortisolo aumentano, al contrario nelle croniche i livelli di DHEA diminuiscono in maniera netta, mentre il cortisolo non mostra differenze significative rispetto ai soggetti sani. Probabilmente nelle infiammazioni acute le proprietà antiflogistiche del cortisolo (Karck *et al.*, 1988; Kern *et al.*, 1988) e del DHEA (Daneberg *et al.*,

1992; Di Santo *et al.*, 1996; Araghi-Niknam *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1998; Padgett and Loria, 1998) risultano fondamentali nello smorzare il processo infiammatorio alla periferia (Munck and Guyre, 1986), riducendo i potenziali effetti deleteri dell'infiammazione stessa. Il motivo delle alterazioni del DHEA nei pazienti con infiammazione cronica invece non ha ancora una spiegazione. Il DHEA, nonostante stimoli la β -ossidazione dando così origine a ROS (Mohan and Cleary, 1991; Yamada *et al.*, 1992, Hayashi *et al.*, 1994), sembra avere capacità antiossidanti (Schauer *et al.*, 1990). Uno studio condotto su topi ha dimostrato che la somministrazione di DHEA può rendere i tessuti più resistenti alla perossidazione lipidica indotta dall'iperglicemia: tuttavia i livelli tissutali di DHEA raggiunti nell'indagine erano molto più elevati rispetto a quelli che si trovano fisiologicamente nell'uomo, indicando che l'effetto protettivo del DHEA potrebbe essere farmacologico più che normalmente presente nell'organismo in questa specie (Aragno *et al.*, 1997). Tuttavia nello stesso studio si evidenziava che il DHEA non modifica i livelli citosolici di antiossidanti quali α -tocoferolo o glutatione, né l'attività della glutatione perossidasi, reduttasi o transferasi: questo porta a concludere che sia il DHEA stesso (o i suoi metaboliti) ad avere un effetto antiossidante diretto, nonostante sia ancora poco chiaro il meccanismo di protezione contro la perossidazione lipidica.

3. MATERIALI E METODI

3.1. AOPP (*Advanced Oxidation Protein Products*): ANALISI BIOCHIMICHE E SPETTROFOTOMETRICHE

3.1.1. PREPARAZIONE DEGLI STANDARD

La prima parte di questa tesi ha lo scopo di acquisire informazioni sulla natura biochimica e molecolare delle *advanced oxidation protein products* (AOPP). Pertanto l'attenzione si è focalizzata sull'albumina (BSA) la proteina maggiormente presente a livello plasmatico e con funzione di importante antiossidante endogeno (Davies 1987, Himmelfarb e McMonagle, 2001), sulle γ -globuline bovine (gGG) anch'esse presenti in quantità rilevante a livello plasmatico e collegate alla risposta immunitaria. Entrambe le specie proteiche sono state diluite in PBS alla concentrazione di 15 mg/ml. Inoltre si è utilizzato plasma bovino prelevato da animali clinicamente sani come matrice naturale su cui testare i vari sistemi ossidanti e per la validazione dei differenti protocolli sperimentali.

3.1.2. OSSIDAZIONE CON ACIDO IPOCLOROSO (HOCl)

L'acido ipocloroso (HOCl) è un composto clorinante che è prodotto in seguito all'attivazione dei fagociti. L'enzima responsabile della sua formazione è la mieloperossidasi (MPO), che è particolarmente abbondante nei neutrofili. La quale converte il perossido d'idrogeno (H_2O_2) in acqua reagendo con lo ione cloro e formando il radicale $OCl\cdot$.

La concentrazione commerciale di acido ipocloroso è stata calcolata mediante lettura allo spettrofotometro utilizzando il coefficiente di estinzione molare ($\epsilon_{290}=350M^{-1} cm^{-1}$) (Yan *et al.* 1996). Le soluzioni di BSA e di γ -globuline 15 mg/ml in PBS 10 mM è stata incubata per 30 minuti a 37 °C con diluizioni scalari di HOCl pari a 0, 6, 12 e 24 mM (Yan *et al.* 1996).

L'ossidazione è stata bloccata con 100 μ l metionina (Concentrazione finale di 1 mM).

Il medesimo protocollo è stato applicato anche al plasma bovino: 1 ml di plasma è stato incubato per 30 minuti a 37 °C con diluizioni scalari di HOCl pari a 0, 6,

12, 24 e 48 mM e l'ossidazione è stata bloccata con 100 µl metionina (concentrazione finale 1 mM).

3.1.3. OSSIDAZIONE CON CUMENE IDROPEROSSIDO (Cum-OOH)

Alcune molecole organiche come il cumene (isopropilbenzene, Cum-OOH) possono reagire con l'ossigeno anche a bassa temperatura producendo un radicale benzilico ed un idroperossido di cumene senza che la reazione porti alla formazione di CO₂ e H₂O. Essa è una notevole fonte di radicali liberi contenenti più del 8,5% di ossigeno attivo. (utilizzando tale substrato è possibile analizzare l'ossidazione dovuta ad un idroperossido).

Le soluzioni di BSA e di γ -globuline (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 15 mg/ml e il plasma bovino (1 ml) sono state incubate con concentrazioni scalari di Cum-OOH (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) diluito in etanolo assoluto con concentrazioni da 0, 1, 10 e 100 mM (Özaydin *et al.* 2001).

La soluzione è stata conservata per 60 minuti a 37 °C in costante agitazione e l'ossidazione bloccata ponendo le provette in ghiaccio per 10 minuti.

3.1.4. RIDUZIONE CON SODIO BORO IDRIDE (NaBH₄)

Per valutare il livello basale di ossidazione dei prodotti commerciali impiegati si sono effettuate delle reazioni di riduzione con concentrazioni scalari di sodioboroidride. Le soluzioni di BSA e di γ -globuline di 15 mg/ml in PBS 10 mM sono state incubate per 30 minuti a 37 °C con diluizioni scalari di NaBH₄ pari a 0, 2,5, 25, e 75 mM in NaOH 0.1 N mentre 1 ml di plasma bovino è stato incubato per 30 min. a 37 °C con diluizioni scalari di NaBH₄ da 0, 25, 50 e 150 mM (Yan e Sohal 1998)

L'ossidazione è stata bloccata incubando le provette in ghiaccio per 10 minuti.

3.1.5. ANALISI BIOCHIMICHE DEGLI STANDARD

I campioni trattati con agente ossidante e riducente sono stati processati per il calcolo delle proteine totali con il metodo Bradford, per il dosaggio delle AOPP e dei carbonili totali secondo le metodiche descritte successivamente.

Successivamente i campioni sono stati derivatizzati con DNPH, identificati con SDS-PAGE ed analizzati tramite densitometria dell'IMB per quantificare la formazione di gruppi carbonilici.

3.1.6. SAGGIO BRADFORD

I campioni precedentemente diluiti con PBS sono stati sottoposti a saggio Bradford per determinarne la concentrazione proteica, seguendo il protocollo indicato dalla casa produttrice (Bradford Reagent, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Inizialmente è stata allestita la curva di taratura (0.25-2 mg/ml) diluendo in acqua volumi crescenti di siero albumina bovina (BSA). A 25 µl di standard sono stati addizionati con 750 µl di reagente Bradford. Dopo agitazione, gli standard sono stati incubati a 15-30 °C per 45 minuti e successivamente sottoposti a lettura dell'assorbanza a 595 nm mediante spettrofotometro (V-630, Jasco Europe, Italia).

Successivamente, sono stati processati i campioni per effettuare una lettura in doppio. A 25 µl di ciascun campione opportunamente diluito sono stati addizionati 750 µl di reagente e incubato a 15-30 °C per 45 minuti. I campioni così processati sono stati sottoposti a lettura allo spettrofotometro (V-630 Jasco Europe, Italia) a 595 nm.

Le letture ottenute sono state plottate nella curva di taratura determinando la diluizione ottimale da effettuare e la concentrazione proteica di ciascun campione al fine di standardizzare il protocollo.

3.1.7. DOSAGGIO DELLE AOPP

Le AOPP sono misurate utilizzando il metodo spettrofotometrico di Witko-Sarsat con alcune modifiche (Witko-Sarsat *et al.* 1996, Witko-Sarsat *et al.* 1998), su lettore di micropiastre (Packard Instrument, Meriden, CT, USA) utilizzando la curva di calibrazione con chloramina-T (N-cloro-p-toluensulfonamide sale di sodio). La chloramina-T 10 mM, diluita in PBS (20 mM, pH 7.4), è utilizzata per allestire la curva di taratura con un intervallo di diluizione da 0 a 100 µmol/litro (Fluka, St. Louis, MO, USA) che, dopo l'aggiunta di ioduro di potassio, assorbe a 340 nm. Su una piastra da 96 pozzetti (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) sono caricati 200 µl di proteina standard ossidata e 200 µl di plasma diluito 1:5 in PBS, con 20 µl di acido acetico; 10 µl di potassio ioduro 1.16 M (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) sono stati aggiunti i 200 µl di chloramine-T standard. Dopo agitazione l'assorbanza della reazione è letta allo spettrofotometro a 340 nm contro il bianco contenente solo PBS, potassio ioduro, acido acetico.

La chloramine-T standard assorbe a 340 nm in modo lineare con un intervallo da 0-100 µmol/litro con una sensibilità di 3.125 µM e la concentrazione delle AOPP è espressa come micromoli per litro di chloramina-T equivalenti. I campioni emolitici non possono essere utilizzati di questo saggio spettrofotometrico poiché la presenza di emoglobina nella soluzione che altera la lettura allo spettrofotometro.

Per la messa a punto della metodica si sono eseguiti i test di diluizione e ripetibilità.

Per verificare che a diluizioni seriali del campione corrisponda una proporzionale riduzione della concentrazione delle AOPP si sono considerate tre concentrazioni proteiche (35, 15, 1 mg/ml di plasma) ossidate con concentrazioni scalari di HOCl (0, 3.8, 15 mM).

L'assenza di interferenti nel sistema è dimostrata quando la retta interpolante ($y=ax+b$) mostra un coefficiente di determinazione "R²" che tende a 1 (deve essere superiore a 0,98, indicativo di una ridotta dispersione dei valori) e l'intercetta all'origine "a" passa per il "punto zero".

La precisione è l'indice di riproducibilità del sistema di analisi e si verifica inserendo fra i campioni incogniti dei campioni di controllo.

Questo test permette di valutare la riproducibilità all'interno dello stesso saggio (*intra-assay*) calcolando il coefficiente di variazione (C.V.% = Deviazione Standard x 100 / valore medio dei risultati). Un sistema di analisi si ritiene presenti una buona riproducibilità se il C.V.% *intra-assay* è minore del 10%.

3.1.8. DETERMINAZIONE DEI CARBONILI TOTALI

La misura dei carbonili proteici in seguito alla loro derivatizzazione con DNPH è stata iniziata da Levine *et al.* (1990) ed è divenuta la metodica più utilizzata per la determinazione delle proteine ossidate.(Levine *et al.* 1990, Dalle-Donne *et al.* 2003) .

I campioni con proteina standard sono stati opportunamente diluiti con PBS pH 7.4, in due aliquote da 1.8mg/0.5ml mentre il siero è stato diluito 1:40 con PBS 10 mM a pH 7.4, e centrifugato a 15.000 g per eliminare eventuale particolato. Una serie di aliquote è stata processata per la derivatizzazione mentre l'altra come controllo negativo.

In entrambe le aliquote le proteine sono state precipitate con 0.5 ml di acido tricloroacetico 20% e centrifugate per 3 minuti a 15.000 g.

Scartato il surnatante, al pellet proteico si sono aggiunti 0.5 ml di DNPH 10 mM in acido cloridrico 2.5 N, mentre 0.5 ml di HCl 2.5 N sono stati aggiunti alla serie dei controlli.

I campioni sono stati posti al buio per un'ora ed agitati ogni 10 minuti; poi precipitati con 0.5 ml di TCA 20%. Il pellet proteico è stato lavato tre volte con etanolo/etile acetato (1:1, v:v) per rimuovere l'eccesso di DNPH.

I campioni sono poi stati ripresi con PBS 20 mM pH 2.3 e lasciati 37°C per 15 minuti.

Il contenuto in carbonili è stato determinato allo spettrofotometro ad una assorbanza di 380 nm usando il coefficiente di estinzione molare $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Levine *et al.* 1994).

La determinazione del contenuto proteico nel pellet, dopo la serie di lavaggi, è stata determinata mediante lettura a 280 nm dei campioni in PBS 20 mM

derivatizzati con HCl 2.5 N, utilizzando una curva standard allestita con BSA (0.06 - 2 mg/ml) disciolta in PBS 20 mM pH 2.3 (Reznick e Paker 1994).

L'equazione della curva standard è $[D.O._{280}] = 1.36[Conc.Prot.mg/ml] - 0.09$ con un coefficiente di determinazione R^2 di 0.98.

3.1.9. ANALISI DEI RISULTATI

L'analisi statistica è stata condotta per le AOPP ed i carbonili totali mediante il test di Mann-Whitney (SPSS 15.0). I risultati riportati in seguito sono stati espressi come media \pm errore standard (ES) e sono stati considerati significativi quando il p-value era inferiore allo 0,05.

3.1.10. DERIVATIZZAZIONE PER SDS-PAGE

La misurazione dei gruppi carbonilici è stata condotta sulle proteine plasmatiche utilizzate come standard di ossidazione (BSA e γ -globuline) e prevede la derivatizzazione di tali gruppi con il composto 2,4-dinitrofenil-idrazina (DNPH) con successiva separazione elettroforetica mediante SDS-PAGE delle proteine (Levine *et al.* 1994, Keyse, 2000; Dalle-Donne *et al.* 2003, Capeillere-Blandin *et al.* 2004).

I campioni sono stati diluiti con PBS 0.01M pH 7.4 a 0.25 mg/ml in due aliquote. Ad un'aliquota di campione si sono addizionate SDS 12% e DNPH 20 mM in acido trifluoroacetico al 10% in rapporto 1:1:2, all'altra, utilizzata come bianco, solamente acido trifluoroacetico al 10% senza la DNPH.

Dopo un'incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente è stato aggiunto TRIS 2M con 30% glicerolo fino al viraggio del campione dal giallo all'arancio, indice di neutralizzazione del pH indispensabile per la corsa elettroforetica.

I campioni sono stati agitati e centrifugati a 12.700 g per 1 min ed addizionati di β -mercaptoetanololo alla concentrazione finale del 5 % se analizzati per gel eseguiti in condizioni riducenti.

I campioni così ottenuti sono stati processati tramite SDS-PAGE e IMB in concentrazione pari a 5 µl/lane per gel di controllo colorati con *comassie brilliant blu* (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) e 2.5 µl/lane per gel destinati al trasferimento e successivo sviluppo con anticorpi.

I campioni, così preparati, possono essere conservati a +4°C per una settimana.

3.1.11. WESTERN BLOT

Separazione elettroforetica

I campioni di standard proteico, dopo opportuna diluizione in PBS, sono stati addizionati di *2X Sample Buffer* (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) nel rapporto 1:1 (volume:volume). Successivamente, sono stati agitati ed incubati a 95 °C per 2 minuti, per essere poi congelati a -20 °C fino al momento delle analisi.

La separazione delle proteine è stata eseguita mediante SDS-PAGE 10% o a gradiente 6-12% secondo il protocollo di Laemmli (1970) (tabella 3.1.1.).

| | STACKING GEL 3% | RESOLVING GEL 10% | RESOLVING GEL 6% | RESOLVING GEL 12% |
|------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| H ₂ O | 3,895 ml | 6,000 ml | 2,895 ml | 2,145 ml |
| TRIS HCl | 0,625 ml 1M pH 6.8 | 3,125 ml 1.5M pH 8.8 | 1,250 ml 1.5M pH 8.8 | 1,250 ml 1.5M pH 8.8 |
| SDS 10% | 0,050 ml | 0,125 ml | 0,050 ml | 0,050 ml |
| Acilamide 40 % | 0,375 ml | 3,125 ml | 0,750 ml | 1,500 ml |
| AMPS 10% | 0,050 ml | 0,125 ml | 0,050 ml | 0,050 ml |
| Temed | 0,005 ml | 0,013 ml | 0,005 ml | 0,005 ml |

Tab. 3.1.1.: volumi di reagente per la preparazione dell' SDS-PAGE

I campioni sono stati caricati (5 µg/lane) con il marker (*Wide Range-Molecular Weight* 6,5-200 KDa; Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA), diluito in glicerolo 20%, in gel dello spessore di 0.75 mm polimerizzati su Hoefer SE 245-Dual Gel Caster (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA). I gel a gradiente sono stati polimerizzati con l'impiego di un formatore di gradiente (Vetrotecnica,

Padova, Italia) e della pompa peristaltica (MINIPULS 3, Millipore, Bliberica, MA) a velocità costante 10 ml/min.

La separazione elettroforetica è stata eseguita utilizzando un mini-vertical gel Hoefer SE 260 (GE Healthcare, UK) e power supply 1001 (Amersham Biosciences, NJ, USA) a 30 e 60 mA con tampone di corsa (TRIS base 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS 0.1 %)

Per ciascuna prova sono state allestite due corse elettroforetiche: una è stata trasferita su membrana di nitrocellulosa; l'altra è stata utilizzata per testare le condizioni di corsa e l'integrità dei campioni mediante colorazione con *EZBlue Gel Staining Reagent* (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA).

L'immagine del gel stata acquisita con ImageScanner (Amersham Biosciences, NJ, USA).

Trasferimento e colorazione

Le proteine, separate in base al peso molecolare, sono state trasferite dal gel alle membrane di nitrocellulosa 0,45 µm (GE Healthcare, UK) mediante immersione in vasca trans-blot (Elettrofor, Rovigo, Italia) in tampone di trasferimento (TRIS-base 25mM, Glicina 192m, Metanolo 20%; pH 8.3) di Laemmli (1970), come descritto da Towbin *et al.* (1979). Il trasferimento è avvenuto a 350 V a 4 °C per un'ora.

Al termine del trasferimento, le membrane di nitrocellulosa sono state immerse per 2 minuti nella soluzione colorante di Ponceau (Rosso ponceau 0.2% in acido Trifluoro acetico al 3%) per rendere visibili i pesi molecolari del marker e le proteine totali trasferite.

Successivamente le membrane sono state lavate con abbondante acqua deionizzata e incubate con *skin milk* al 3% *overnight* per bloccare i siti di legami non specifici.

Incubazione con anticorpo

Le membrane sono state incubate su agitatore orizzontale con l'anticorpo primario anti DNPH (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) 1:35.000 diluito con tampone PBS addizionato di Triton x100 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis,

MO, USA) allo 0,1%. La diluizione dell'anticorpo specifico è stata scelta dopo opportune prove di diluizione e di cross-reazione tra anticorpo secondario coniugato alla perossidasi (GAR-HRP).

Al termine dell'incubazione, le membrane sono state sottoposte a 3 lavaggi di 10 minuti con tampone PBS allo 0,1% di Triton x100 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA).

Terminati i lavaggi, le membrane sono state incubate su agitatore orizzontale per un'ora a 15-30 °C con anticorpo secondario Anti IgG-rabbit (BIO RAD, USA) coniugato con HRP (*horseradish peroxidase*) 1:100.000.

Prima di procedere allo sviluppo, le membrane sono state sottoposte a 3 lavaggi di 10 minuti con tampone PBS allo 0,1% di Triton x100 per eliminare l'eccesso di GAR-HRP.

Reazione chemiluminescente

Il complesso antigene-anticorpo è stato visualizzato mediante reazione chemiluminescente indotta dall'utilizzo del substrato HRP che catalizza l'ossidazione del luminolo in presenza di perossido d'idrogeno (MILLIPORE, Billerica, MA, USA). L'immagine luminescente del blot è stata impressa su lastra autoradiografica (GE Healthcare, UK) utilizzando soluzioni di sviluppo e di fissaggio (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA). Tale reazione è stata condotta in una stanza buia.

Analisi densitometrica

L'immagine del blot su lastra è stata acquisita su computer tramite ImageScanner (Amersham Biosciences, NJ, USA). Le immagine così ottenute sono state elaborate tramite il programma di analisi d'immagine ImageMaster TotalLab (Amersham Biosciences, NJ, USA). I risultati sono stati normalizzati rispetto al campione non trattato (considerato come controllo) e rapportati al valore basale di proteina standard (0 mM di ossidante o riducente).

3.2. MONITORAGGIO DELLE AOPP NEL POST PARTO E NEL PROCESSO INFIAMMATORIO NELLA BOVINA DA LATTE.

La seconda parte del lavoro si è focalizzata sullo studio della variazione delle AOPP, come indicatori di stress ossidativo, nei vari stadi produttivi delle bovine da latte in modo da evidenziare se l'aumento della richiesta energetica possa alterare l'equilibrio tra metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROMs) e capacità antiossidante nel sangue. A questo scopo si sono raccolti campioni di sangue da animali sani suddivisi a seconda dello stato fisiologico in 6 gruppi:

- n = 8 Animali in fase di asciutta con parto previsto dopo un periodo tra 1/3 settimane successive al prelievo
- n = 5 Animali in fase di lattazione nella prima settimana post-parto
- n = 7 Animali in fase lattazione nelle 4-6 settimane post-parto
- n = 8 Animali in fase lattazione nelle 16-20 settimane post-parto
- n = 6 Animali in fase tarda lattazione a più di 24 settimane post-parto
- n = 6 Manze con età compresa tra i 13-15 mesi.

Allo stesso tempo per valutare una possibile correlazione tra processi infiammatori acuti e cronici più frequenti nelle bovine da latte e livelli plasmatici di AOPP, il campionamento si è stao effettuato anche su animali affetti da patologie infiammatorie in fase acuta e cronica (Tab. 3.2.1.).

| <i>Patologie infiammatorie</i> | <i>ACUTE</i> | <i>CRONICHE</i> |
|---------------------------------------|---------------------|------------------------|
| Mastiti | n = 7 | n = 4 |
| Patologie uterine post-parto | n = 4 | n = 1 |
| Patologie podaliche | n = 1 | n = 6 |
| Totale | n = 12 | n = 12 |

Tab. 3.2.1.: Soggetti affetti da patologie infiammatorie.

I prelievi sono stati effettuati nei periodi di novembre 2008, e marzo-maggio 2009, giugno-luglio 2010 da allevamenti eterogenei di bovine da latte dislocati nelle province di Treviso (n=11), Vicenza (n=1) e Padova (n=1). I capi sani sono stati selezionati da allevamenti che dimostravano buone caratteristiche per i parametri sopracitati. I capi malati sono stati invece selezionati sulla base della richiesta di intervento veterinario da parte dell'allevatore a seguito di anamnesi,

visita clinica e eventuali tecniche diagnostiche aggiuntive (conta delle cellule somatiche nel latte da tabulati APA, *California mastitis test*).

Ad ogni bovina è stato effettuato un prelievo di sangue dalla vena giugulare in vacutainer contenente EDTA e in vacutainer adibite alla raccolta del siero. Entrambe le provette sono state conservate fino alla centrifugazione in una borsa termica refrigerata in cui veniva impedito il contatto diretto del vacutainer con la fonte di freddo. Una piccola aliquota di sangue è stata utilizzata per l'allestimento di uno striscio di sangue per il calcolo della formula leucocitaria.

Il sangue raccolto è stato centrifugato a 1400 g per 15 minuti ottenendo così il plasma o il siero, che è stato successivamente suddiviso in due aliquote e conservate a -20° fino al momento delle analisi.

3.2.1. DOSAGGIO DELL'APTOGLOBINA

I sieri sono stati inviati in ghiaccio secco e processati presso il laboratorio di "Substrati cellulari e immunologia cellulare" dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia (sede di Brescia). È stato utilizzato un kit immuno-enzimatico (Tridelta Development Ltd. Ireland), seguendo le istruzioni del produttore.

3.2.2. TITOLAZIONE DEL LISOZIMA

Il lisozima (β -1,4 glicano idrolasi) è un potente enzima antibatterico a diffusione pressoché ubiquitaria. Esso è in grado di svolgere anche un'azione sinergica con la risposta immunitaria umorale e i fattori del complemento. La sua determinazione permette quindi di conoscere lo stato di funzionalità del sistema monocitario-macrofagico ed è indice della presenza di stati flogistici.

La titolazione del lisozima è stata effettuata dal siero di sangue prelevato dagli animali considerati nello studio.

Il principio su cui si basa la titolazione è dato dal contatto del siero con un microrganismo particolarmente sensibile all'attività litica del lisozima incorporato in un gel di agar. La presenza del lisozima viene evidenziata, dopo un opportuno periodo di incubazione, dalla comparsa attorno al pozzetto di

deposizione del campione di un alone di lisi di diametro proporzionale alla concentrazione del lisozima stesso.

La titolazione del lisozima richiede i seguenti reagenti e terreni:

- Acqua distillata.
- Tampone sodio fosfato monobasico-bibasico 1/15 M p/v, pH 6,3, ottenuto miscelando 7,9 parti di soluzione monobasica con 2,1 parti di soluzione bibasica.
- Lisozima (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) da conservare a -20°C. La soluzione di Lisozima Standard si ottiene diluendo 32 mg di lisozima in 1 ml di tampone sodio fosfato. Sono distribuiti 15 µl della soluzione in microprovette conservate a -80°C.
- Agarose type II Medium EEO (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) da conservare a +4°C.

Il sistema di saggio utilizzato è: *Micrococcus Lysodeikticus* (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) da conservare a -20°C. La sospensione batterica è stata ottenuta diluendo 0,5 g di *Micrococcus Lsodeikticus* in 20 ml di tampone sodio-fosfato. Tale sospensione viene conservata in congelatore a -20°C in microprovette al volume di 150 µl .

I campioni sono stati aliquotati in microprovette e conservati a -80°C; sono stati quindi scongelati prima dell'analisi.

Successivamente sono state preparate le piastre sciogliendo 1 g di Agarose in 100 ml di tampone sodio fosfato mediante ebollizione in bagnomaria per 15 minuti fino ad ottenere una soluzione omogenea (mantenuta alla temperatura di 60°C e in costante agitazione su un agitatore magnetico preriscaldato), sono stati aggiunti 200µl della sospensione d'uso del *Micrococcus Lysodeikticus*.

Su ogni piastra piastra sono stati distribuiti, con una pipetta in vetro graduata, 20 ml della sospensione ottenuta, che è stata quindi lasciata solidificare. Infine, mediante ago in acciaio collegato alla pompa a vuoto, sono stati praticati 25 fori equidistanti tra loro in ogni piastra creando dei pozzetti, contrassegnati con il numero identificativo del campione sul retro della piastra (2 pozzetti per campione).

La preparazione del lisozima standard è stata ottenuta distribuendo in provette di vetro le seguenti quantità di tampone fosfato: 5 ml nella provetta denominata A, 1 ml in ognuna delle altre 7 provette denominate con lettere dalla B alla H.

Quindi sono stati aggiunti:

- alla provetta A: 10 μl della soluzione standard di lisozima per ottenere la soluzione standard di 64 $\mu\text{g/ml}$.
- alla provetta B: 1 ml della soluzione contenuta nella provetta A per ottenere la soluzione standard di 32 $\mu\text{g/ml}$.
- alla provetta C: 1 ml della soluzione contenuta nella provetta B per ottenere la soluzione standard di 16 $\mu\text{g/ml}$.
- alla provetta D: 1 ml della soluzione contenuta nella provetta C per ottenere la soluzione standard di 8 $\mu\text{g/ml}$.
- alla provetta E: 1 ml della soluzione contenuta nella provetta D per ottenere la soluzione standard di 4 $\mu\text{g/ml}$.
- alla provetta F: 1 ml della soluzione contenuta nella provetta E per ottenere la soluzione standard di 2 $\mu\text{g/ml}$.
- alla provetta G: 1 ml della soluzione contenuta nella provetta F per ottenere la soluzione standard di 1 $\mu\text{g/ml}$.
- alla provetta H: 1 ml della soluzione contenuta nella provetta G per ottenere la soluzione standard di 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Sono stati distribuiti 10 μl /pozzetto di ogni diluizione della soluzione standard di lisozima nei pozzetti corrispondenti (3 per ogni grado di diluizione). Similmente sono stati depositi i campioni di siero al volume di 10 μl /pozzetto, in due pozzetti per campione.

Le piastre sono state incubate a 37°C in camera umida per 16 h. La lettura è stata eseguita misurando il diametro degli aloni (compreso il diametro del pozzetto) utilizzando un calibro. È stato quindi calcolato per ogni campione e per ogni diluizione standard di lisozima il valore medio dei diametri di inibizione. La curva dello standard è stata disegnata mettendo in ascissa il valore del logaritmo in base 10 delle diverse concentrazioni della soluzione standard di lisozima, e in ordinata i diametri medi degli aloni di inibizione in mm. I risultati sono stati ottenuti direttamente da questa curva di calibrazione introducendo i valori medi degli aloni di inibizione dei campioni in esame.

3.2.3. SAGGIO BRADFORD

I campioni di plasma e di siero sono stati sottoposti al calcolo della concentrazione proteica tramite il saggio Bradford precedentemente descritto nel paragrafo 3.1.6.

3.2.4. DOSAGGIO DELLE AOPP

Le AOPP sono state misurate in 200 µl nel plasma diluito 1:5 in PBS utilizzando il metodo spettrofotometrico su micropiastra come da metodica descritta nel paragrafo 3.1.7.

3.2.5. DOSAGGIO DEI T-BARS

Le aldeidi prodotte dalla lipoperossidazione lipidica sono molecole chimicamente reattive in grado di reagire formando legami covalenti con le proteine e gli acidi nucleici contribuendo ad aumentare il danno radicalico. La loro misurazione può essere considerata un buon indice di lipoperossidazione lipidica. Il metodo più frequentemente utilizzato è il saggio con l'acido tiobarbiturico (TBA) (Yoshida *et al.* 2005). In condizioni acide e ad elevata temperatura la MDA reagisce con il TBA in rapporto di 1 a 2 e la concentrazione dell'addotto che si forma è determinata con una lettura spettrofotometrica a 532 nm.

La reazione è stata innescata mescolando:

- 0,2 ml di Sodio Dodecil Solfato (SDS) 8,1%
- 1,5 ml di Acido Acetico 20% pH 3,5
- 1,5 ml di Acido Tiobarbiturico 1%
- 0,550 ml d'acqua
- 0,05 ml di Butil idrossitoluene 0,8% in etanolo

- 0,250 ml di plasma di bovino

I campioni così ottenuti sono stati brevemente agitati ed incubati a 100 °C per un'ora. Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati raffreddati in ghiaccio ed agitati con l'aggiunta di 1 ml d'acqua e 5 ml di alcool n-butilico e piridina, in rapporto 15/1. Infine, i campioni sono stati centrifugati a 1400 g a 0 °C per 10 minuti, fino ad ottenere una soluzione limpida. Il surnatante è stato prelevato e sottoposto a lettura dell'assorbanza a 535 nm mediante spettrofotometro (V-630, Jasco Europe, Italia).

Il tetrametossipropano è stato utilizzato come standard (0-5 µM/10 ml) per stimare la formazione di TBARS come nanomoli equivalenti di MDA per ml di plasma bovino.

3.2.6. DETERMINAZIONE DEL GSH TOTALE

La concentrazione del glutathione totale (GSH) a livello plasmatico è stata determinata seguendo il metodo descritto da Tietze (1969) con alcune modifiche per adattarlo alle micropiastre (Baker *et al.* 1990).

Il GSH presente nel plasma e nello standard è stato ossidato a GS-SG dall'aggiunta di acido ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB). I campioni e lo standard sono stati incubati a 37°C per 10 minuti fintanto che la reazione raggiungeva l'equilibrio. A questo punto si è fatta una prima lettura che viene utilizzata come bianco. L'aggiunta dell'enzima Glutathione reduttasi trasforma il GS-SG in 2 GSH con la formazione di NADP⁺ che ha proprietà cromogeniche. La lettura della piastra è stata protratta per 10 minuti fintanto che il segnale diveniva costante. Il bianco è stato sottratto dall'ultima lettura e la densità ottica ottenuta è stata utilizzata per calcolare il GSH totale plasmatico usando la curva standard.

Le soluzioni (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), preparate per il saggio enzimatico sono:

- Tampone fosfato con EDTA (F-E): NaH₂PO₄ 0.1M + EDTA 0.6 mM (pH 7.4)
- Standard GSH solution: 325.42 µM
- GSH reduttasi (1.7 U/ml TF-E pH 7.4)
- NADPH 10mM (8.3 mg/ml H₂O)

- TRIS buffer 0.1M
- DTNB 10mM (3.96 mg/ ml in TRIS buffer; pH 7.4 – 8)
- Soluzione di reazione: 12ml TF-E + 180ml DTNB + 300 ml NADPH

La curva standard è stata ottenuta diluendo GSH con TF-E a partire da 21.69 a 0.339 $\mu\text{mol/L}$.

Duecento μl di soluzione di reazione e 30 μl di soluzione standard o di campione (diluito 1:60) sono stati caricati su piastre a 96 pozzetti (PS microtiter plate con 96 pozzetti a fondo piatto; Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) in duplicato. Dopo 10 minuti di incubazione il valore di assorbanza è stato misurato spettrofotometricamente a 405 nm. Venticinque μL di soluzione con l'enzima reduttasi sono stati aggiunti ad ogni pozzetto. La lettura è stata raccolta ogni minuto per dieci minuti consecutivi. La concentrazione di GSH è stata calcolata come descritto precedentemente.

Il valore ottenuto è stato poi moltiplicato per il fattore di diluizione (= 0.033 μM poiché sono stati caricati 30 μl di plasma per pozzetto).

3.2.7. DETERMINAZIONE DEI CARBONILI TOTALI

Il siero diluito 1:40 con PBS 10 mM a pH 7.4 è stato centrifugato a 15.000 g per eliminare eventuale particolato che potrebbe interferire con la reazione e suddiviso in 2 aliquote da 0.5 ml una delle quali da utilizzare come controllo negativo. I campioni così preparati sono stati processati seguendo la metodica descritta nel paragrafo 3.1.8.

3.2.8. ANALISI RADIOIMMUNOLOGICA (RIA)

Il dosaggio del DHEA e del cortisolo plasmatico è stato effettuato mediante analisi radioimmunologica (*Radioimmunoassay* - RIA), un sistema analitico ad elevata specificità e sensibilità. La specificità è raggiunta mediante l'utilizzo di un reattivo, l'anticorpo specifico, capace di riconoscere e legare selettivamente

la sostanza da dosare. La sensibilità è garantita dall'affinità dell'anticorpo per l'antigene.

Il principio generale, su cui si basa il dosaggio radioimmunologico, corrisponde alla competizione tra un antigene libero marcato con un tracciante radioattivo e l'analita che si vuole quantificare per un anticorpo specifico comune. La competizione fra antigene marcato e analita si determina perché l'anticorpo è presente in difetto: ciò significa che maggiore è la concentrazione dell'analita presente, minore sarà la quantità del tracciante radioattivo che si lega all'anticorpo.

3.2.9. RIA SU MICROPIASTRA

Il RIA su micropiastra è una variante solida del tradizionale RIA e prevede l'utilizzo di micropiastre in poliestere da 96 pozzetti (Packard, optiplat 96 well Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA). Inizialmente un anticorpo anti- γ globuline di coniglio prodotto nella capra è stato utilizzato come anticorpo secondario, diluito 1:1000 con tampone sodio acetato 0,15mM pH 9,0. L'antisiero è stato distribuito nei 96 pozzetti della micropiastra (200 μ l/pozzetto). Dopo un'incubazione a 4 °C *overnight* la piastra è stata svuotata e sono stati aggiunti, ad ogni pozzetto, 200 μ l di tampone RIA ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 61mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 Mm, NaCl 154 Mm, pH 7,2) contenente albumina bovina serica (BSA) allo 0,1%. In seguito ad un'ulteriore incubazione di 1 ora a 4 °C la piastra è stata nuovamente svuotata e conservata a -20 °C (non più di 4 settimane) fino al momento dell'utilizzo.

Ogni piastra è stata quindi caricata con 200 μ l dell'anticorpo specifico opportunamente diluito.

Le caratteristiche di specificità dell'anticorpo sono riportate di seguito in tabella 3.2.2.:

| anticorpo | | Specificità |
|--|--|-------------|
| Anti deidroepiandrosterone-17-CMO (centro medico diagnostico Emilia s.r.l., Bologna, Italy) diluizione 1:32.000 | deidroepiandrosterone | 100% |
| | 5-androsten -3 β , 17 β -diol | 9,2% |
| | epiandrosterone | 2,8% |
| | 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol | 0,6% |
| | testosterone | 0,1% |
| | androstenedione | 0,1% |
| | deidroepiandrosterone solfato | 0,04% |
| | cortisolo | < 0,001% |
| Anti cortisol-3-CMO (centro medico diagnostico Emilia s.r.l., Bologna, Italy) diluizione 1:20.000 | cortisolo | 100% |
| | Prednisolone | 44.3% |
| | 11-deoxycortisol | 13.9% |
| | Cortisone | 4.9% |
| | Corticosterone | 3.5% |
| | Prednisone | 2.7% |
| | 17-hydroxyprogesterone | 1% |
| | 11-deoxycorticosterone | 0.3% |
| | Progesterone | <0.01% |
| | 17-hydroxypregnenolone | <0.01% |
| | deidroepiandrosterone solfato | <0.01% |
| | Androsterone solfato | <0.01% |
| | Pregnenolone | <0.01% |

Tab. 3.2.2.: Specificità degli anticorpi anti DHEA e cortisolo

In ogni pozzetto, tranne in quelli destinati alla determinazione di alcuni parametri di controllo, quali: Attività Totale (AT) e Non Specific Bound (NSB), sono stati dispensati 200 μ l di antisiero e la piastra è stata lasciata incubare a 4 $^{\circ}$ C overnight.

La curva di taratura si ottiene dosando quantità note di ormone non marcato a concentrazioni crescenti. I punti della curva sono stati preparati partendo dalla concentrazione di 100 ng/ml di steroide diluito in etanolo come indicato in tabella 3.2.3.

| Ormone | Range di concentrazione |
|-----------|-------------------------|
| DHEA | 200-1.5 pg/50 μ l |
| CORTISOLO | 200-3 pg/50 μ l |

Tab. 3.2.3.: Intervalli di concentrazione delle curve di taratura.

Per stimare l'affidabilità e l'accuratezza del dosaggio, in ciascun piastra sono stati allestiti alcuni pozzetti di controllo. In questi pozzetti sono stati valutati parametri quali: l'Attività Totale (AT), il legame non specifico con l'anticorpo

(NSB), il controllo dell'adesione dell'anticorpo primario (C0) ed il dosaggio di una quantità nota di analita (Ctrl).

- AT: è stato caricato solamente il tracciante radioattivo e non sono stati effettuati risciacqui per stimarne la radioattività totale.

- NBS: non è stato caricato l'anticorpo specifico, ma solo il tampone RIA ed il tracciante radioattivo per stimare la componente di legame aspecifico.

- C0: sono stati caricati l'anticorpo primario, il secondario, il tampone RIA ed il tracciante radioattivo. Essendo l'unico antigene presente, l'antigene marcato occuperà tutti i siti di legame dell'anticorpo esprimendo la radioattività massima misurabile dal sistema.

- CTRL: sono stati caricati l'anticorpo primario, il secondario, il tampone RIA ed il tracciante. E' presente un estratto di plasma bovino con concentrazione nota dell'analita per verificare l'affidabilità dell'elaborazione.

Dopo l'incubazione con l'anticorpo specifico, ciascun pozzetto della piastra (tranne AT) è stato lavato con 200 µl di tampone RIA.

Successivamente la piastra è stata svuotata, asciugata e quindi caricata (come da tabella 3.2.4.) in doppio con 20 µl di plasma diluito con tampone RIA in modo da raggiungere un volume complessivo di 200 µl/pozzetto. In tutti i pozzetti, sono stati infine aggiunti 10 µl di tracciante radioattivo, diluito precedentemente con etanolo assoluto (stock solution), ulteriormente diluito con tampone RIA (working solution) per ottenere una soluzione da 5000 cpm/10 µl: [1,2,6,7-³H]deidroepiandrosterone e [1,2,6,7-³H]cortisolo (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA).

| | AT | NSB | Co | Curva | Campioni DHEA | Campioni C |
|-------------|-------|--------|--------|--------|---------------|------------|
| Buffer RIA | - | 200 µl | 200 µl | 150 µl | 180 µl | 190 µl |
| Standard | - | - | - | 50 µl | - | - |
| Campione | - | - | - | - | 20 µl | 10 µl |
| Tracciante* | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl |

Tab. 3.2.4.: Schema di carico piastra

La piastra è stata fatta agitare su agitatore orizzontale a bassa velocità per 3 minuti, coperta con pellicola e lasciata incubare *overnight* a 4 °C al fine di indurre la reazione immunologica.

A seguito dell'incubazione, la piastra è stata lavata, tranne i pozzetti di controllo (AT e NSB), per 4 volte con tampone RIA (200 µl/pozzetto) per separare l'antigene marcato libero dall'antigene marcato legato all'anticorpo.

Infine ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 200 µl di liquido scintillante (Microscint, Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) per il conteggio della frazione di radioattività legata. La piastra è stata sigillata con pellicola termosaldabile (TOPSEAL S, Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) e messa ad agitare per 3 minuti a bassa velocità.

La frazione di radioattività legata è stata determinata mediante lettura al β -counter (Top-Count, Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) che, con apposito programma (Riasmart, Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA), elabora una curva di taratura e fornisce direttamente le concentrazioni ormonali dei campioni (pg/pozzetto).

3.2.10. DOSAGGIO DELL'INTERLEUCHINA 6

I sieri sono stati inviati in ghiaccio secco e processati presso il laboratorio di "Substrati cellulari e immunologia cellulare" dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia (sede di Brescia). È stato utilizzato un saggio biologico di proliferazione di cellule 7TD1 (Grenett *et al.* 1991).

3.2.11. DOSAGGIO DEL TNF- α

I sieri sono stati inviati in ghiaccio secco e processati presso il laboratorio di "Substrati cellulari e immunologia cellulare" dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia (sede di Brescia). È stato utilizzato un saggio biologico di citotossicità su cellule WEHI164 (Asai *et al.* 1993).

3.2.12. DOSAGGIO DELL' IFN- α

I sieri sono stati inviati in ghiaccio secco e processati presso il laboratorio di "Substrati cellulari e immunologia cellulare" dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia (sede di Brescia). È stato utilizzato un saggio biologico su cellule di rene bovino in linea continua (Meager 1987).

3.2.13. COLORAZIONE CON DIFF-QUICK PER LA VALUTAZIONE DELLO STRISCIO EMATICO

Il campione di sangue è stato strisciato su un vetrino, lasciato asciugare all'aria a temperatura ambiente e colorato mediante Diff-Quick, metodo di colorazione rapido e poco costoso per ematologia, citologia e batteriologia.

Le soluzioni utilizzate sono:

Soluzione fissativa

1. Fast green 2.5 μ M
2. Metanolo 1 L

Soluzione di colorazione acida (Soluzione I)

1. Eosina G 1.76 mM
2. Tampone fosfato 0.1 M pH 6.6 1 L

Preparare la soluzione e filtrare con carta da filtro.

Soluzione di colorazione basica (Soluzione II)

1. Azzurro II (Blu di metilene) 2.94 mM
2. Tampone fosfato 0.1 M pH 6.6 1 L

Preparare la soluzione e filtrare con carta da filtro.

La procedura prevede che i vetrini siano dapprima immersi per 10 volte in una soluzione di fissaggio (Fast green-metanolo Fluka, St. Louis, MO, USA) e quindi asciugati all'aria. Essi sono stati successivamente immersi per 10 volte in una soluzione di colorazione acida di Eosina G (Carlo Erba Spa, Milano, Italia) in

tampone fosfato 0.1 M pH 6.6, sciacquati delicatamente con acqua distillata, immersi 10 volte in una seconda soluzione di colorazione basica Azzurro II (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) in tampone fosfato 0,1 M pH 6.6 e nuovamente sciacquati con acqua distillata. Dopo asciugatura all'aria, i preparati sono stati chiarificati in xilolo e coperti con un vetrino coprioggetto montato con un montante non acquoso (balsamo) per conservarli più a lungo. I vetrini così ottenuti sono stati osservati al microscopio ottico (OLYMPUS, Vanox photomicroscope, Japan) in luce diretta ad un ingrandimento 40x (Fig. 3.2.1.).

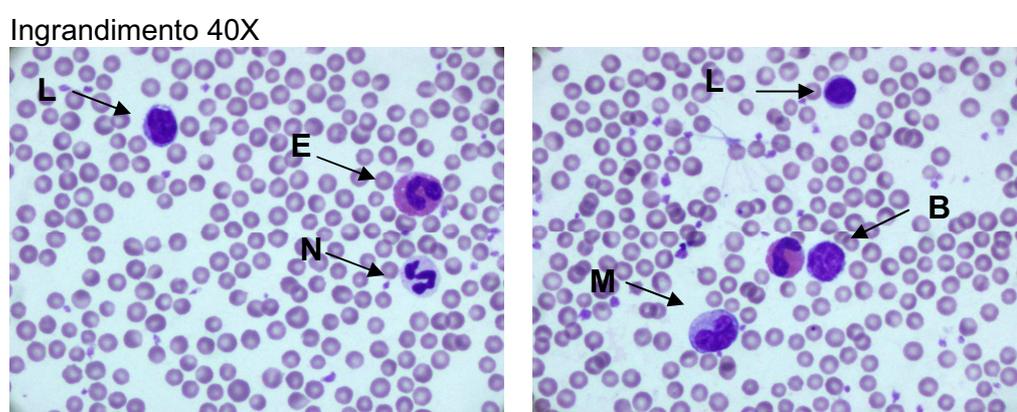


Fig. 3.2.1.: Striscio di sangue bovino con le varie popolazioni cellulari (colorazione eosina-azzurro II)

I neutrofili (N) presentano un nucleo allungato e polilobato con segmentazione variabile a seconda del grado di maturazione e una colorazione viola scuro. Il citoplasma risulta invece leggermente roseo. Nei ruminanti corrispondono alla seconda specie più numerosa della linea bianca presente.

Gli eosinofili (E) presentano un nucleo polilobato e sono in numero inferiore ai neutrofili; essi risultano facilmente identificabili per la presenza di numerosi e piccoli granuli acidofili rosa-arancio.

I basofili (B), rari nel sangue, presentano dei granuli rosso-porpora che riempiono tutto il citoplasma.

I linfociti (L) si distinguono per il loro nucleo rotondo di cromatina addensata con citoplasma moderatamente basofilo (leggermente azzurro). Sono la forma predominante espressa nei ruminanti.

I monociti (M) si presentano più grandi dei linfociti con nucleo di aspetto variabile (ovale, reniforme, spesso ameboide) con cromatina reticolare. Il

citoplasma è abbondante, azzurro vacuolizzato e con leggere granulazioni rosate.

3.2.14. ELABORAZIONE DEI RISULTATI

Gli animali sono stati raggruppati secondo due diversi criteri di classificazione: il primo di questi si è basato sulla valutazione clinica dei soggetti. Gli animali sono stati suddivisi in tre gruppi in questo modo:

1. Animali sani: se non si evidenziavano segni di patologia in atto né erano riportati in anamnesi dall'allevatore episodi o sintomi che potessero far supporre patologie recenti. Questi animali sono stati a loro volta suddivisi in sottopopolazioni secondo lo schema definito nel paragrafo 3.4.
2. Animali affetti da infiammazione cronica: se presenti al momento del prelievo manifestazioni di segni clinici di mastite, infiammazioni uterine post-parto o patologie podali presenti da più di tre giorni.
3. Animali affetti da infiammazione acuta: se presenti al momento del prelievo manifestazioni di segni clinici di mastite, infiammazioni uterine post-parto o patologie podali presenti da meno di tre giorni.

Il secondo criterio si è basato sulle concentrazioni ematiche dell'aptoglobina, valutata come indicatore di processo infiammatorio acuto. Come tale, in questo caso, non è stato possibile creare tre gruppi di animali bensì due:

1. Animali di controllo: se le concentrazioni di aptoglobina risultavano inferiori a 0,4 mg/ml.
2. Animali in fase acuta: se le concentrazioni di aptoglobina risultavano superiori a 0,4 mg/ml.

Il limite è stato stabilito sulla base di due studi condotti su bovini con forme di metrite e polmonite (Skinner *et al.* 1991, Huzzey *et al.* 2009).

Il grado di associazione tra i due criteri di classificazione è stato studiato mediante la procedura delle tabelle di contingenza (SPSS 15.0) ed è stato espresso dal coefficiente di contingenza. Questo valore oscilla tra 0 e 1, dove 0

indica la totale assenza di associazione tra le variabili considerate, mentre valori prossimi ad 1 indicano elevati livelli di associazione tra le variabili stesse.

Le differenze tra le concentrazioni dei parametri ematici osservate nelle fasi fisiologiche, e le differenze osservate tra le manze e le bovine adulte sono state valutate mediante il test di Kruskal-Wallis (SPSS 15.0). Il test di Kruskal-Wallis è stato utilizzato anche per valutare le differenze delle concentrazioni dei parametri ematici osservate tra gli animali clinicamente sani, gli animali con processo infiammatorio cronico e gli animali con processo infiammatorio acuto. Le differenze delle concentrazioni dei parametri ematici tra gli animali di controllo e i soggetti con valori di aptoglobina indicativi di infiammazione acuta sono state studiate mediante test di Mann-Whitney (SPSS 15.0).

Le relazioni tra i parametri ematici sono state studiate espresse mediante il coefficiente di correlazione di Pearson (SPSS 15.0).

3.3. TEST ELISA ED ANALISI ANTICORPALE VERSO LE PROTEINE OSSIDATE

3.3.1. PREPARAZIONE DELLA AOPP-BSA

L'ossidazione della BSA è stata eseguita secondo il protocollo di (Yan *et al.* 1996, Witko-Sarsat *et al.* 1996), utilizzando soluzioni scalari di acido ipocloroso. Centocinquanta mg di BSA (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) sono stati sciolti in 9 ml di PBS ed aliquotati in eppendorf ad una diluizione di 15 mg/0.9 ml secondo lo schema riportato di seguito in tabella 3.3.1.:

| μl HOCl (518 mM) | ml di soluzione da aggiungere al campione | BSA ox | mM della soluzione finale |
|--|---|--------------|---------------------------|
| 200 μl PBS | 0.1 | 15 mg/0.9 ml | 0 |
| 46 μl (HOCl)+ 154 μl PBS | 0.1 | 15 mg/0.9 ml | 12 |
| 92 μl (HOCl)+ 108 μl PBS | 0.1 | 15 mg/0.9 ml | 24 |
| 186 μl (HOCl)+ 14 μl PBS | 0.1 | 15 mg/0.9 ml | 48 |

Tab. 3.3.1.: Schema di preparazione della BSA ossidata

Ad ogni aliquota di BSA sono stati aggiunti 100 μl di soluzione acida.

Ogni soluzione di BSA 15 mg/ml in PBS 10 mM è stata incubata per 30 min. a temperatura ambiente con diluizioni scalari di HOCl (0, 12, 24 e 48 mM). Il campione è stato poi sottoposto al calcolo della concentrazione proteica, al dosaggio delle AOPP ed ad una corsa elettroforetica per valutare l'integrità della proteina. Il campione è stato poi conservato a - 20°C.

3.3.2. DETERMINAZIONE DEGLI AUTOANTICORPI

La presenza di anticorpi contro AOPP-BSA nel siero di animali affetti da patologie infiammatorie è stata determinata tramite un test ELISA (Horiuchi *et al.* 1991, Shanti *et al.* 1999, Palacio *et al.* 2006).

Le piastre in polistirene da 96 pozzetti (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton,CT,USA) sono state incubate con 100 μl /well di AOPP-BSA

(30 µg/ml) in sodio acetato pH 9.2 a 4°C per 18 ore. Successivamente la piastra è stata lavata con PBS ed incubata con 200 µl di soluzione di blocco PBS all'1% di gelatina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) per un'ora.

Dopo i tre lavaggi con PBS la piastra è stata allestita con 10 µl di siero bovino diluito 1/10 e portata ad un volume finale di 100 µl/pozzetto ed incubata a 4°C per 18 ore. Successivamente è stata lavata 3 volte con 200 µl/pozzetto di tampone fosfato ed lasciata un'ora a 37°C con 100 µl/well di anticorpo secondario coniugato alla perossidasi (Goat-anti-IgG bovine –HRP, KPL, Gaithersburg, MD, USA) diluito 1:10.000.

Per eliminare l'eccesso di anticorpo la piastra è stata lavata 3 volte con 200 µl/pozzetto PBS ed incubata con 100 µl di soluzione di reazione TMB (SureBlue Reverse TMB Microwell Peroxidase Substrate, KPL, Gaithersburg, MD, USA). La reazione colorimetrica è stata bloccata con 100 ml di HCl 1N. La piastra è stata letta a 450 nm al lettore di micro piastre (Packard Instrument, Meriden, CT, USA) entro 1 ora.

3.3.3. VALUTAZIONE DEI PARAMETRI DELL'ANTISIERO

A *Titolo anticorpale o test di diluizione*

Il titolo anticorpale è stato determinato diluendo da 5 a 500 volte il siero bovino di tre campioni incogniti (che presentavano valori di AOPP alti, medi e bassi) con del siero fetale bovino (FSB, Invitrogen, United Kingdom-GB) (tabella 3.3.2). La piastra è stata allestita con 10 µl di siero bovino diluito 1/10 con PBS e portata ad un volume finale di 100 µl/pozzetto secondo il protocollo appena descritto.

| | | | | | | | |
|----|----|----------|---|------|----|-----|-------|
| 50 | µl | siero tq | + | 0 | µl | FSB | 1 |
| 50 | µl | siero tq | + | 200 | µl | FSB | 1:5 |
| 50 | µl | siero tq | + | 450 | µl | FSB | 1:10 |
| 10 | µl | siero tq | + | 490 | µl | FSB | 1:50 |
| 10 | µl | siero tq | + | 990 | µl | FSB | 1:100 |
| 10 | µl | siero tq | + | 4900 | µl | FSB | 1:500 |

Tab. 3.3.2.: Schema di diluizioni del siero di controllo con siero fetale bovino.

B Test di ripetibilità

La valutazione della riproducibilità del sistema è stata calcolata analizzando la ripetibilità dei campioni di controllo che non deve superare il 10% all'interno della stessa piastra (intra-assay) o il 20% per campioni di controllo in piastre diverse (inter-assay).

C Specificità anticorpale

Per ottenere una diminuzione del segnale è stato necessario eliminare gli anticorpi anti-AOPP-BSA incubando il siero bovino con dosi crescenti di antigene ossidato AOPP-BSA (dallo 0.05% all'1% o analogamente da 10 a 200 µg/ml) nel rapporto di 20 µl/ml. Dopo 48 ore a 4°C il siero è stato centrifugato a 15.000 g per 5 minuti. Il surnattante è stato raccolto, diluito 1:10 e dosato secondo il test ELISA.

3.3.4. VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI ANTICORPI MEDIANTE WESTERN BLOTTING

Per confermare la presenza di auto-anticorpi contro AOPP-BSA si è allestito un SDS-PAGE al 10% caricando in ogni singola lane della AOPP-BSA 5µg/lane.

Si è eseguito un immunoblotting utilizzando il sistema SNAP i.d. System (MILLIPORE, Billerica, MA, USA) seguendo la procedura indicata dal manuale che prevede le seguenti tappe:

1. 30 ml di soluzione di blocco T-PBS 0.1% con 0.15% latte
2. filtrare con la pompa a vuoto per 30 secondi
3. aggiungere 3 ml di siero diluito 1:50 con PBS ed incubare per 10 min.
4. filtrare con la pompa a vuoto
5. filtrazione continua con 20 ml con T-PBS 0.1% per 3 volte
6. aggiungere 3 ml di anticorpo GAR-HRP siero diluito 1:25000 con PBS
7. filtrare con la pompa a vuoto dopo 10 minuti
8. filtrazione continua con 20 ml con T-PBS 0.1% per 3 volte

Il complesso antigene-anticorpo è stato visualizzato mediante reazione chemiluminescente indotta dall'utilizzo del substrato HRP (MILLIPORE, Billerica, MA, USA). Il complesso è stato impresso su lastra fotografica (GE Healthcare, UK) utilizzando soluzioni di sviluppo e di fissaggio (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA). Tale reazione è stata indotta in una stanza buia.

3.3.5. ANALISI DEI RISULTATI

Le differenze tra i titoli anticorpali osservati negli animali sani e affetti da processi infiammatori, classificati sulla base dei valori ematici di aptoglobina (vedi paragrafo 3.2.15.), sono state valutate mediante test di Mann-Whitney (SPSS 15.0). Le relazioni tra il titolo degli anticorpi contro AOPP-BSA e i parametri ematici sono state studiate espresse mediante il coefficiente di correlazione di Pearson (SPSS 15.0).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. AOPP (*Advanced Oxidation Protein Products*): ANALISI BIOCHIMICHE E SPETROFOTOMETRICHE

La prima parte dello studio ha lo scopo di acquisire informazioni sulla natura biochimica e molecolare delle advanced oxidation protein products (AOPP) indicando le possibili proteine che ne fanno parte ed è caratterizzato da una messa a punto delle metodiche di laboratorio per identificare gli agenti ossidanti che maggiormente agiscono su queste proteine.

4.1.1. IDENTIFICAZIONE DELLA SPECIE OSSIDANTE CHE INFLUISCE SULLA FORMAZIONE DELLE AOPP

La metodica di dosaggio delle AOPP è stata preventivamente validata mediante i test di diluizione e ripetibilità.

L'obiettivo del test di diluizione è verificare che a diluizioni seriali del campione corrisponda una proporzionale riduzione della concentrazione delle AOPP. Pertanto si è eseguita una diluizione del plasma (35, 15, 1 mg/ml) addizionato con concentrazioni variabili di HOCl e su questo calcolato il valore delle AOPP.

I risultati dei test di diluizione delle AOPP sono riportati in figura 4.1.1. e si può osservare l'assenza di interferenti nel sistema poiché le rette interpolanti i risultati ($y=ax+b$) mostrano, per tutti gli intervalli di diluizione di HOCl, un coefficiente di determinazione " R^2 " che tende a 1 (indicativo di una ridotta dispersione dei valori) ed un'intercetta (b) che passa all'origine in vicinanza del "punto zero".

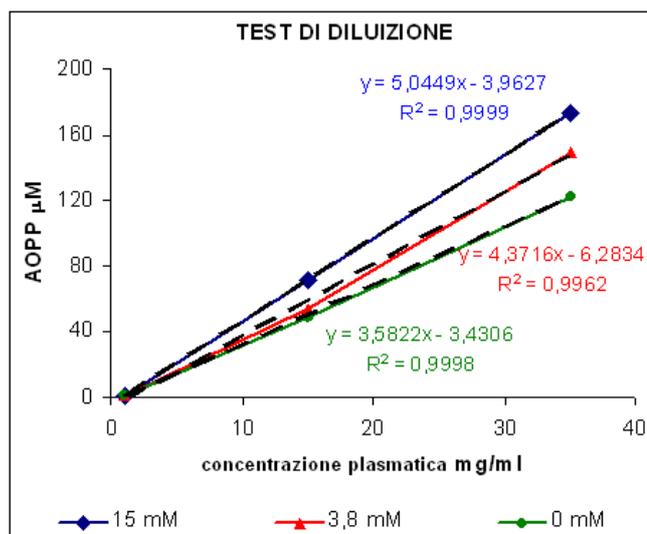


Fig. 4.1.1.: Effetto dell'HOCl a concentrazioni scalari (0, 3,8, 15 mM) su concentrazioni variabili di plasma (1, 15, 35 mg/ml). Rappresentazione delle equazioni del test di ripetibilità

La valutazione della riproducibilità del sistema è stata calcolata analizzando la ripetibilità di campioni di controllo per ogni diluizione di plasma trattato con HOCl e sono indicati in tabella 4.1.1.

| Plasma trattato con HOCl | CV% intra-assay | CV% inter-assay |
|--------------------------|-----------------|-----------------|
| 15 mM | 6.47 | 6.50 |
| 3.8 mM | 9.74 | 10.81 |
| 0 mM | 5.14 | 9.01 |

Tab. 4.1.1.: coefficienti di variazione (CV) del test ripetibilità nel saggio delle AOPP.

Il valore medio del coefficiente di variazione intra- ed inter-assay (C.V. %) confermano una buona riproducibilità del sistema di dosaggio in quanto sono rispettivamente inferiori al 10% o al 20% (soglia comunemente utilizzata per dosaggi su micropiastra).

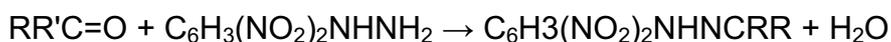
Sulla base di quanto riportato in letteratura le AOPP sono i prodotti della reazione delle proteine plasmatiche con gli ossidanti clorurati prodotti dalla MPO (Fialova *et al.*, 2006; Noyan *et al.*, 2006). Si è tuttavia cercato di identificare quale sia la specie ossidante che maggiormente agisce sulle proteine plasmatiche inducendo un aumento dei prodotti di ossidazione avanzata come le AOPP.

Da sottolineare che le clorammine indotte dall'acido ipocloroso hanno una emivita molto breve e vengono facilmente idrolizzate a formare aldeidi, ammoniaca e CO₂ (figura 4.1.2.) con conseguente rapido incremento dei gruppi carbonili totali (PCO) (Hawkins and Davies, 1998).



Fig. 4.1.2.: Formazione di proteine carbonilate (PCO) a partire da clorammine prodotte dall'HOCl

La reazione di derivatizzazione con la 2,4-Dinitrophenylhydrazina (DNPH) può essere usata anche per la rilevazione dei gruppi carbonilici di chetoni o di aldeidi sia in fase liquida (paragrafo 3.1.8.) che tramite immunoblotting (paragrafo 3.1.10.) mediante la reazione di derivatizzazione che porta alla formazione di un idrazone:



Inoltre la DNPH non reagisce con altri gruppi carbonilici come carbossiacidi, amidi ed esteri in quanto la reazione di addizione risulta più difficile.

Questa tecnica ci permette di rilevare in maniera quantitativa e qualitativa un generico prodotto di ossidazione delle biomolecole.

Pertanto lo studio dei carbonili proteici (PCO) (paragrafo 2.1.3.) non permette di estrapolare quale sia l'origine delle reazioni ossidanti che generano lipoperossidazione (legame di α - β -aldeidi con formazione di ALE), glicazione/glicossidazione (legame di zuccheri con formazione di AGE) (Stadtman and Berlett, 1997) o in seguito ad ossidazione diretta; d'altra parte rappresentano un prodotto di ossidazione chimicamente stabile.

Poiché il 60% della componente proteica plasmatica è rappresentata, in primo luogo dall'albumina (BSA), con circa 35-50 mg/ml, ed dalle γ -globuline (gGG), con circa 3 mg/ml, queste proteine sono state utilizzate come modello "in vitro" per la valutazione dei processi che portano alla formazione delle AOPP.

L'ossidazione è stata indotta dall'HOCl in concentrazioni crescenti (0, 6, 12, 24 mM) a 15 mg/ml di proteina standard e al plasma di controllo (PL). Su ogni campione sono poi state quantificate le AOPP ed i carbonili totali .

Nel caso della BSA come si può notare nella figura 4.1.3. a parità di concentrazione proteica i livelli delle AOPP mostrano un andamento dose-dipendente dalla concentrazione di HOCl e sono accompagnate da un incremento del contenuto di gruppi carbonilici (figura 4.1.4.). L'albumina è un importante antiossidante plasmatico perché ricca di gruppi tiolici che fungono da accettore di radicali ipocloroso (Himmelfarb and McMonagle, 2001)

Le gGG, invece, non mostrano un aumento significativo delle AOPP se non in corrispondenza della concentrazione più elevata di HOCl che non è imputabile ad un effettiva formazione di AOPP ma ad una frammentazione del peptide analizzata tramite SDS-PAGE (vedi fig. 4.1.2.2.), che aumenta i siti di clorinazione con un conseguente picco di assorbanza a 340 nm.

Il plasma mostra una differenza significativa nella formazione delle AOPP solo ad alte concentrazioni di ossidante pur mostrando un lieve ma significativo aumento del gruppi carbonilici.

Il primo bersaglio dell'acido ipocloroso sono i gruppi tiolici ed i residui di metionina delle proteine e poiché il plasma è ricco antiossidanti e accettori di radicali come BSA, ascorbato, GSH, e l'urato (Hawkins and Davies, 1999) si può spiegare l'effetto tamponante della matrice plasmatica stessa.

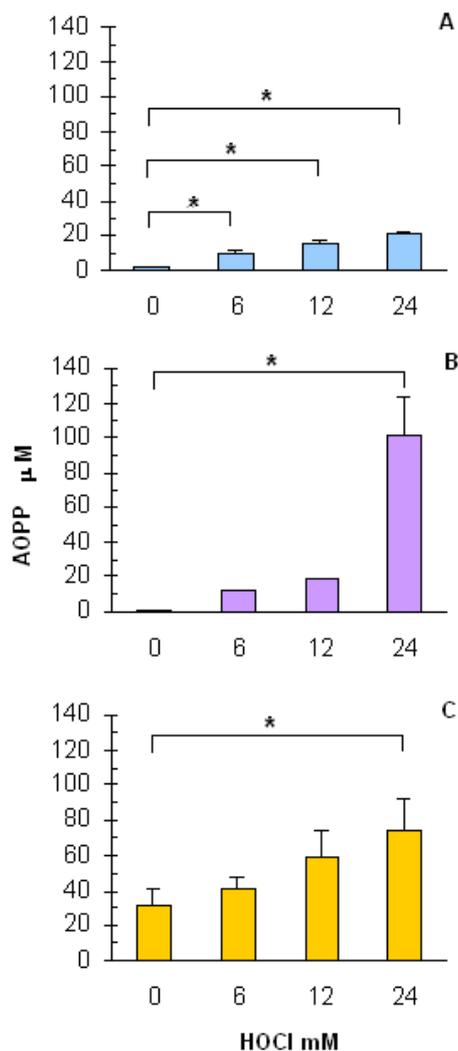


Fig. 4.1.3.: Quantificazione delle AOPP in soluzioni standard di BSA (A), gGG (B) e plasma (C) dopo esposizione a concentrazioni crescenti di acido ipocloroso (HOCl). I risultati sono espressi come la media \pm errore standard. * indica differenze statisticamente significative rispetto al controllo; $p < 0.05$

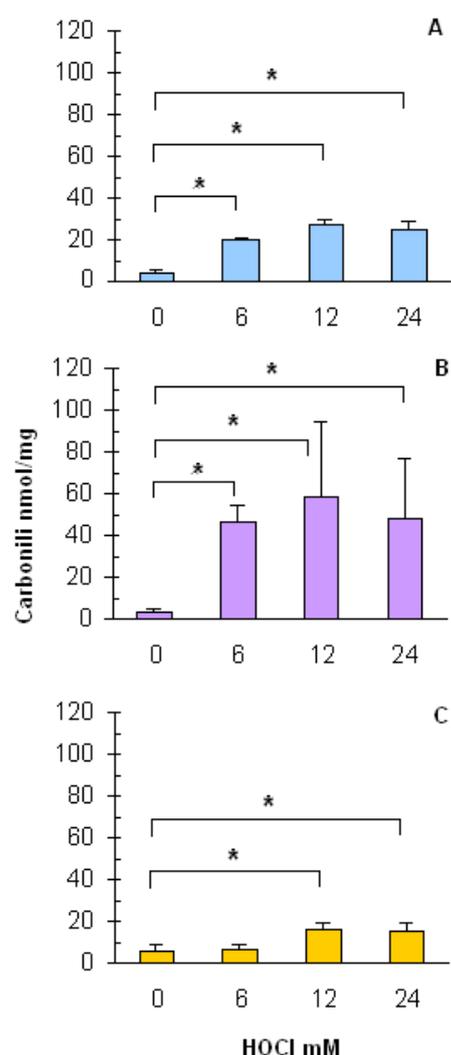


Fig. 4.1.4.: Quantificazione dei Carbonili totali in soluzioni standard di BSA (A), gGG (B) e plasma (C) dopo esposizione a concentrazioni crescenti di acido ipocloroso (HOCl). I risultati sono espressi come la media \pm errore standard. * indica differenze statisticamente significative rispetto al controllo; $p < 0.05$

A livello fisiologico l'attivazione dei neutrofili produce molte altre specie ossidanti tra le quali H_2O_2 che è un idroperossido molto potente ed il suo potere ossidante dipende dalla sua capacità di generare OH^\cdot , OH^- in presenza di O_2^- e come tale, causa grosse modificazioni conformazionali nella struttura delle proteine (Davies, 1987). Il suo utilizzo *in vitro* come ossidante causa degradazione e frammentazione del substrato proteico (Davies, 1987) e risulta, pertanto, poco modulabile nella sua azione ossidante.

Il Cumene idroperossido, ovvero un generico agente perossidante, che ha un'azione ossidante che meglio si adatta all'uso *in vitro*.

L'ossidazione con Cum-OOH, da 0 a 100 mM (figura 4.1.5.), mostra un incremento delle AOPP in entrambi gli standard proteici analizzati solo ad elevate concentrazioni di reagente. Il fatto che si assista ad un aumento delle AOPP (determinato tramite una quantificazione delle cloramine totali) utilizzando un idroperossido è probabilmente dovuto ad una reazione con il cloro presente in soluzione. Infatti, elevate concentrazioni di perossido inducono (a pH lievemente acidi) l'ossidazione del cloro nella sua forma cationica (Cl^+) che si combina a formare cloro diatomico (Cl_2) che in ambiente acquoso si trasforma in Cl^- e OCl^- (Mihoko and Takeschi, 2010), inducendo un possibile aumento delle AOPP.

Il plasma mostra un picco di AOPP che però non è imputabile alla sola formazione delle cloramine ma ad una opacizzazione del campione dopo l'aggiunta di ossidante, che potrebbe aver alterato la lettura allo spettrofotometro.

L'aumento dei gruppi carbonili (figura 4.1.6.) non è significativo se non nel caso delle gGG che sono più sensibili all'attacco degli ossidanti.

Pertanto le AOPP potrebbero essere prodotte in seguito all'azione diretta sulle proteine plasmatiche operata dall' HOCl di origine MPO ma non esclusivamente. Infatti, esiste una correlazione tra i livelli plasmatici di AOPP e i livelli di ditirosina (marker specifico di ossidazione diretta sulle proteine) e con gli AGE-pentosidine (prodotti in seguito a *cross-linking* tra prodotti di ossidazione del glucosio e residui di lisina e arginina) (Witko-Sarsat *et al.*, 1998), ma non correlano con la MDA (markers di perossidazione lipidica) (Selmeçci *et al.*, 2005).

Inoltre le reazioni di perossidazione non sembrano responsabili della produzione di AOPP (Witko-Sarsat *et al.*, 1998) se non a dosi molto elevate e non fisiologiche.

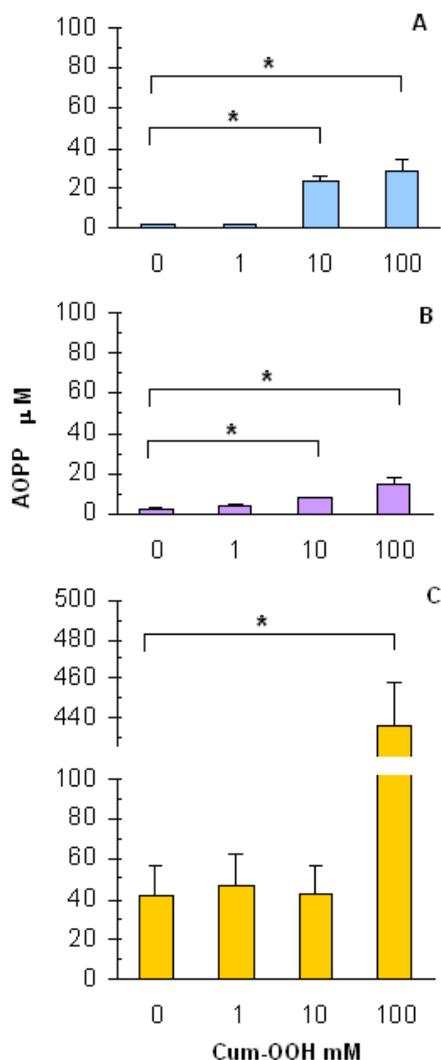


Fig. 4.1.5.: Quantificazione delle AOPP in soluzioni standard di BSA (A), gGG (B) e plasma (C) dopo esposizione a concentrazioni crescenti di cumene idroperossido (Cum-OOH). I risultati sono espressi come la media \pm errore standard. * indica differenze statisticamente significative rispetto al controllo; $p < 0.05$

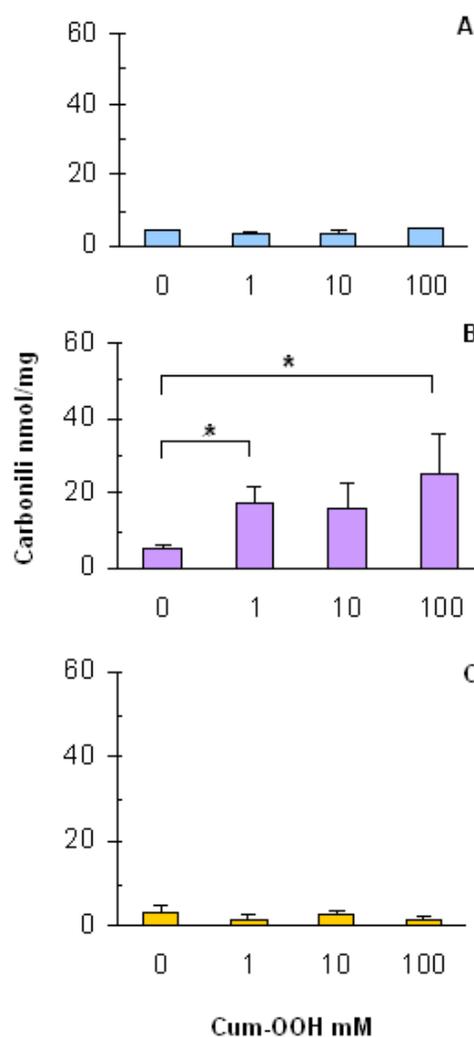


Fig. 4.1.6.: Quantificazione dei Carbonili totali in soluzioni standard di BSA (A), gGG (B) e plasma (C) dopo esposizione a concentrazioni crescenti di cumene idroperossido (Cum-OOH). I risultati sono espressi come la media \pm errore standard. * indica differenze statisticamente significative rispetto al controllo; $p < 0.05$

Le metallo boroidridi (MBH_4) sono tra i più importanti agenti riducenti in chimica organica. La reattività di queste specie chimiche è influenzata da molteplici fattori: a) il solvente, b) lo ione metallico (che nel nostro caso è il Na^+), e c) la presenza aldeidi. Nonostante la variazione di questi parametri i gruppi funzionali che possono essere ridotti è molto variabile e spazia dagli aminoacidi, ai carbossiacidi, ai nitriti ed ai nitroalcheni.

Entrambe le specie proteiche (BSA e gGG) ed il plasma (PL) sono state sottoposte ad un processo di riduzione con NaBH_4 per determinare se il livello

basale di partenza per l'ossidazione fosse in qualche modo alterato da una ossidazione già presente nel campione. Come si nota dalle figure 4.1.7., 4.1.8. solo la BSA mostra una significativa diminuzione delle AOPP e dei carbonili a concentrazioni elevate di agente riducente.

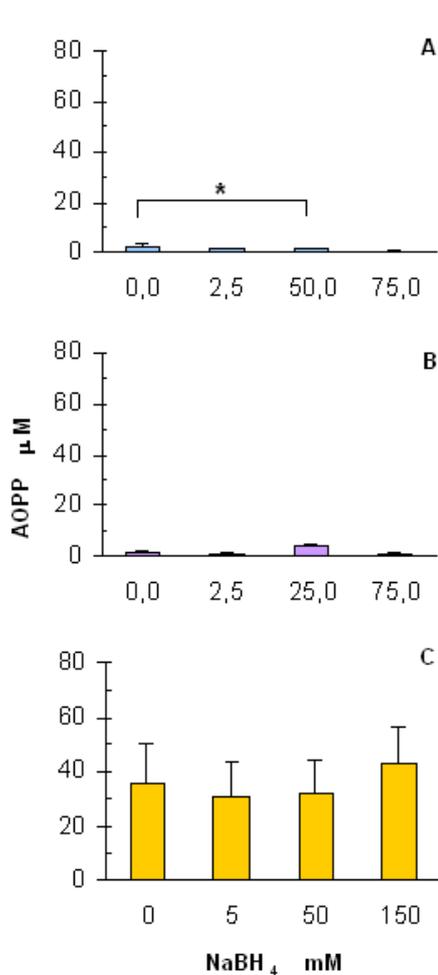


Fig. 4.1.7.: Quantificazione delle AOPP in soluzioni standard di BSA (A), gGG (B) e plasma (C) dopo esposizione a concentrazioni crescenti di sodio boro idride (NaBH₄). I risultati sono espressi come la media +/- errore standard. * indica differenze statisticamente significative rispetto al controllo; p< 0,05

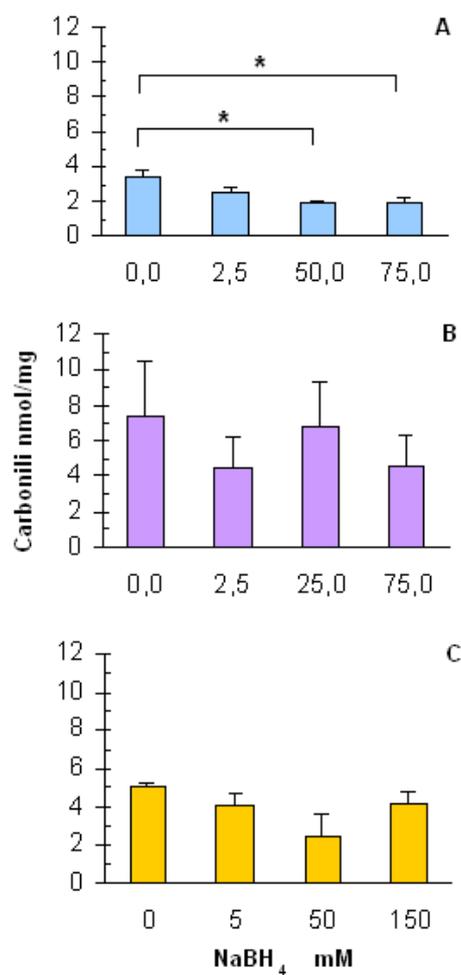


Fig. 4.1.8.: Quantificazione dei Carbonili totali in soluzioni standard di BSA (A), gGG (B) e plasma (C) dopo esposizione a concentrazioni crescenti di sodio boro idride (NaBH₄). I risultati sono espressi come la media +/- errore standard. * indica differenze statisticamente significative rispetto al controllo; p< 0,05

4.1.2. VALUTAZIONE DELL'INTEGRITA' DEI SUBSTRATI PROTEICI

L'ossidazione dei substrati proteici può determinare modificazioni strutturali della conformazione che rende le proteine più suscettibili alla frammentazione e degradazione. Per confermare l'integrità delle proteine ossidate con HOCl e Cum-OOH si sono effettuate delle analisi elettroforetiche in condizioni denaturanti e riducenti in gel di poliacrilamide al 10% con successiva analisi densitometrica dell'IMB (vedi paragrafo 3.1.10)

Per la messa a punto della metodica di Immunoblotting si sono eseguite delle corse elettroforetiche SDS-PAGE 6-12% non riducente utilizzando BSA e plasma bovino derivatizzati con DNPH ed i rispettivi controlli non derivatizzati. Dopo trasferimento delle proteine su nitrocellulosa sono stati eseguiti dei test per valutare le migliori diluizioni dell'anticorpo specifico contro la DNPH e le cross-reazioni tra l'anticorpo secondario coniugato alla perossidasi (GAR-HRP) ed eventuali proteine presenti nella membrana.

I test sono stati condotti come da figura 4.1.9. seguente:

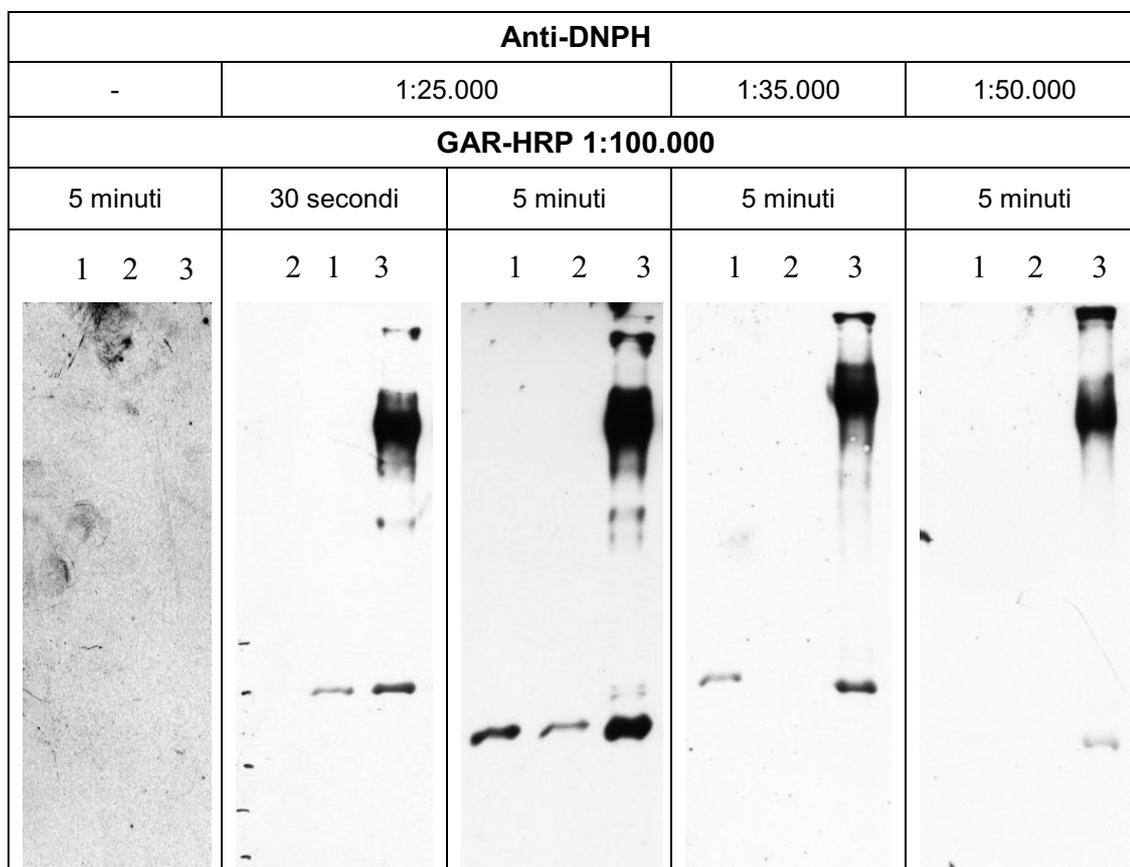


Fig. 4.1.9.:IMB di BSA 0.23 μ g e plasma 2.3 μ g derivatizzati con DNPH e incubati con varie concentrazioni di anticorpo anti-DNPH. *lane 1*: BSA derivatizzata, *lane 2*: BSA ctrl non derivatizzata,; *lane 3*: plasma derivatizzato.

I risultati emersi dimostrano che non c'è nessun legame aspecifico tra le proteine trattate con DNPH ed anticorpo secondario coniugato alla perossidasi. La diluizione anticorpo primario anti-DNPH scelta sulla base della quantità di anticorpo utilizzata e dei tempi di esposizione della membrana è di 1:35.000.

Durante l'ossidazione con l'acido ipocloroso i residui aminoacidici delle proteine sono direttamente modificati dal radicale ipoclorito. Alte dosi di HOCl determinano un primo luogo l'ossidazione dei gruppi -SH e dei residui di metionina e triptofano con formazione di gruppi carbonilici. In alcuni casi queste modificazioni possono rendere le proteine più suscettibili alla degradazione da parte delle proteasi intracellulari. Per esempio è stato osservato che la fibronectina tratta con HOCl è meno resistente alla degradazione rispetto all'elastasi dovuta alle modificazioni della struttura primaria e terziaria della proteina stessa. (Vissers and Winterbourn, 1991)

Come si osserva dalla figura 4.1.10. la BSA non mostra frammentazione proteica e l'analisi densitometrica del contenuto in carbonili mostra un aumento costante anche a dosi elevate di acido ipocloroso.

Le gGG mostrano una progressiva denaturazione dei peptidi che si evidenzia con uno *smear* diffuso corrispondente alle dosi più elevate di HOCl. L'alterazione strutturale subita dalla struttura primaria delle gGG ha indotto la formazione di piccoli peptidi che, clorinati, hanno determinato l'elevata concentrazione di clorammine (figura 4.1.3. B). Anche in questo caso il contenuto di carbonili, rilevato con l'analisi densitometrica, risulta inferiore a causa della frammentazione in piccoli peptidi non visibili all'SDS-PAGE al 10%.

Nel plasma si evidenzia un progressivo aumento dei carbonili in corrispondenza del peso molecolare della BSA senza incorrere in un'alterazione strutturale delle proteine.

L'azione del cumene si è mostrata efficace solo nei confronti delle gGG (conferma di quanto visto precedentemente figura 4.1.6. B) nelle quali si può osservare un aumento progressivo del contenuto di carbonili senza per questo indurre un'alterazione strutturale della proteina (figura 4.1.11.).

L'azione riducente del NaBH₄ (figura 4.1.12.) verso i gruppi carbonili si osserva in tutte le proteine analizzate, cosa che non era visibile con il saggio

spettrofotometrico dei carbonili. Inoltre non si evidenzia degradazione della proteina trattata con NaBH_4 .

Da quanto emerso si può osservare una maggior sensibilità dell'IMB per la determinazione dei gruppi carbonili rispetto al saggio in fase liquida visto precedentemente.

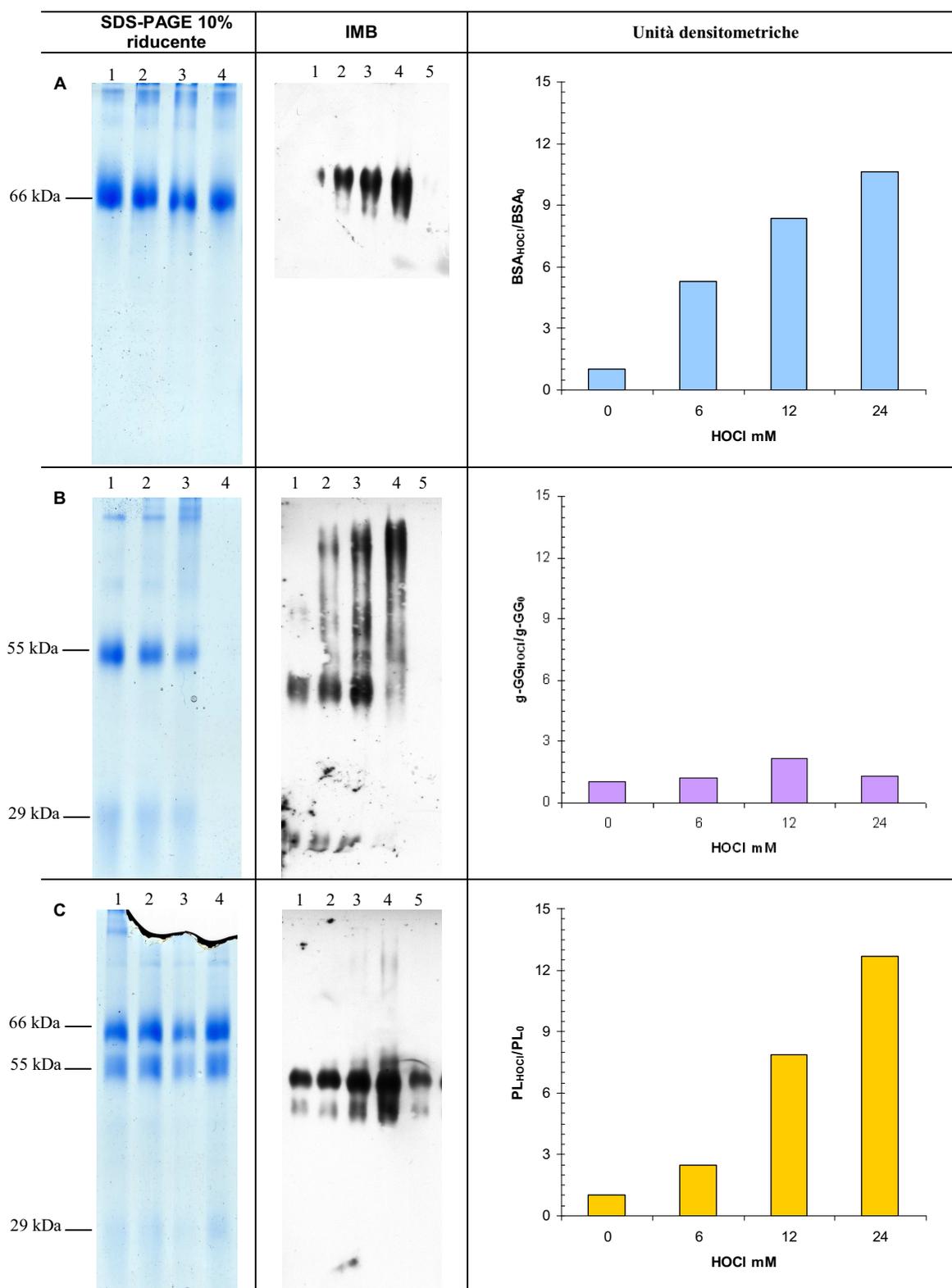


Fig. 4.1.10.: Elettroforesi di campioni derivatizzati con DNPH. SDS-PAGE 10% colorato con comassie ed omologo IMB con relativa densitometria espressa come rapporto delle unità densitometriche dello standard rispetto il valore basale.

Lane 1-4 clorinazione con HOCl 0, 6, 12, 24 mM; lane 5 ctrl IMB: clorinazione con HOCl 24 mM non trattato con DNPH.

(A) BSA clorinata con HOCl (0-24 mM) SDS-PAGE 1.2 µg/lane; IMB 250ng/lane.

(B) γ-globuline clorinate con HOCl (0-24 mM). SDS-PAGE 1.2 µg/lane; IMB 1.2 µg/lane.

(C) Plasma clorinato con HOCl (0-24 mM) SDS-PAGE 1.2 µg/lane; IMB 1.2 µg/lane.

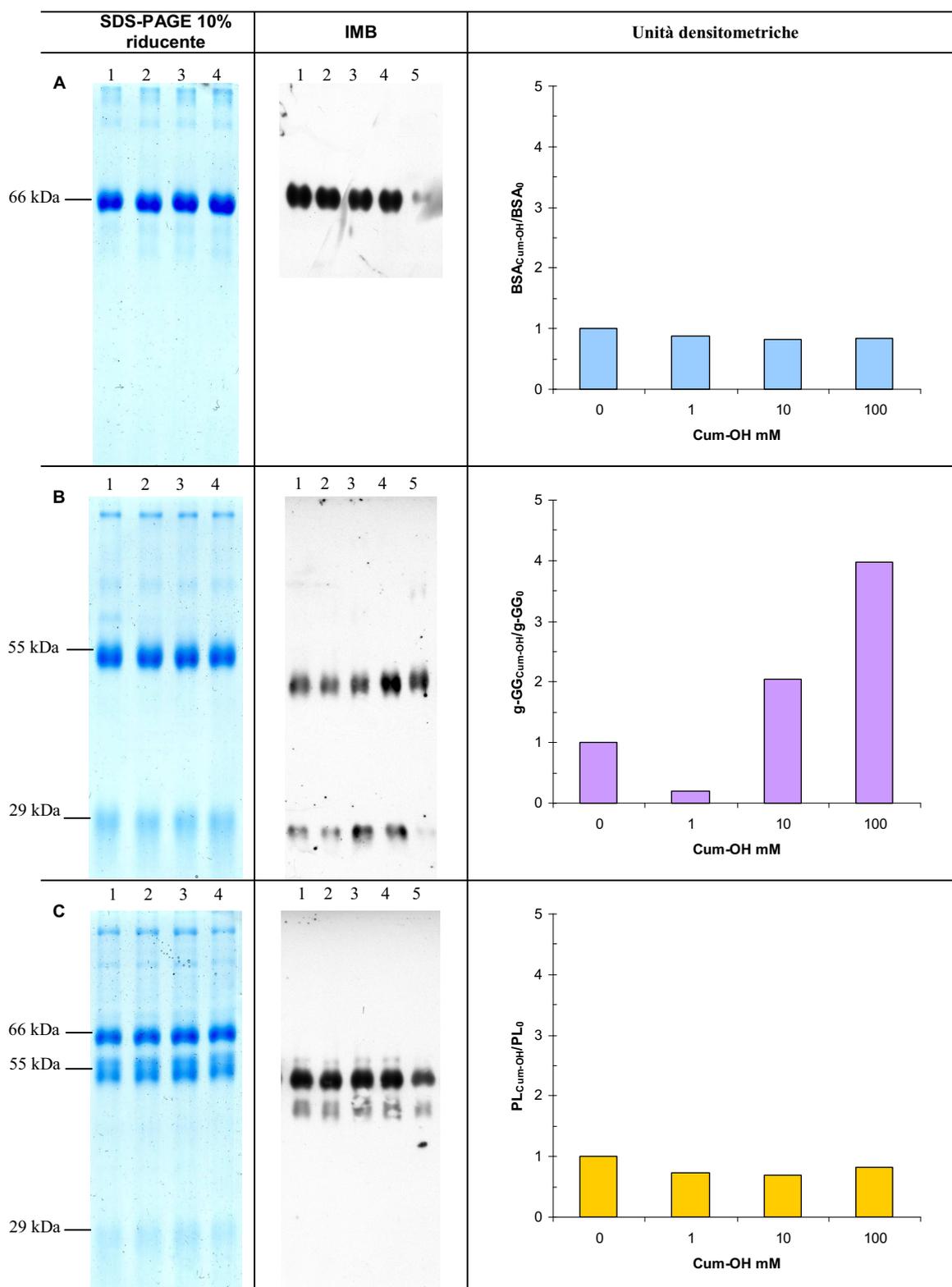


Fig. 4.1.11...: Elettroforesi di campioni derivatizzati con DNPH. SDS-PAGE 10% colorato con comassie ed omologo IMB con relativa densitometria espressa come rapporto delle unità densitometriche dello standard rispetto il valore basale.

Lane 1-4 ossidazione con Cum-OH 0, 1, 10, 100 mM; lane 5 ctrl IMB: ossidazione con Cum-OH 100 mM non trattato con DNPH.

(A) BSA ossidata con Cum-OH (0-100 mM) SDS-PAGE 1.2 µg/lane; IMB 0.25 µg/lane.

(B) γ-globuline ossidate con Cum-OH (0-100 mM) SDS-PAGE 1.2 µg/lane; IMB 1.2 µg/lane.

(C) Plasma ossidato con Cum-OH (0-100 mM) SDS-PAGE 1.2 µg/lane; IMB 1.2 µg/lane.

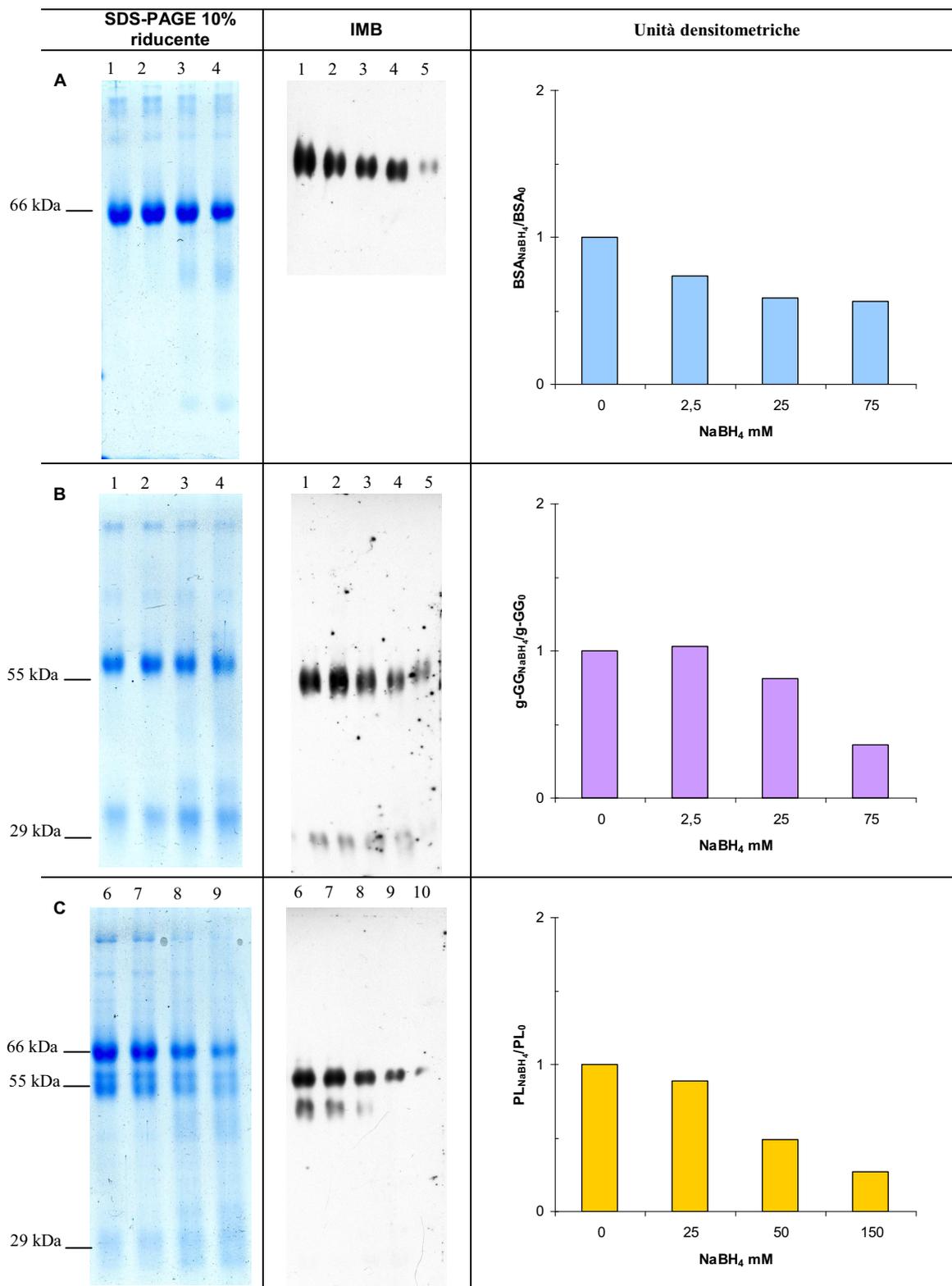


Fig. 4.1.12.: Elettroforesi di campioni derivatizzati con DNPH. SDS-PAGE 10% colorato con comassie ed omologo IMB con relativa densitometria espressa come rapporto delle unità densitometriche dello standard rispetto il valore basale.

Lane 1-4 riduzione NaBH₄ 0, 2,5, 25 ,75 mM; lane 5 ctrl IMB: riduzione NaBH₄ 25 mM non trattato con DNPH; lane 6-9 riduzione NaBH₄ 0, 25, 50, 150 mM; lane 10 ctrl IMB: riduzione con NaBH₄ 25 mM non trattato con DNPH.

(A) BSA ridotta con NaBH₄ (0-75 Mm) SDS-PAGE 1.2 µg/lane; IMB 0.25 µg/lane.

(B) γ-globuline ridotte con NaBH₄ (0-75 mM) SDS-PAGE 1.2 µg/lane; IMB 1.2 µg/lane.

(C) Plasma ridotto con NaBH₄ (0-150 mM) SDS-PAGE 1.2 µg/lane; IMB 1.2 µg/lane.

4.1.3. SPECIE PROTEICHE RESPONSABILI DELLE AOPP

Da quanto visto fin'ora sembra che l'acido ipocloroso sia l'agente ossidante che maggiormente influisce sulla formazione delle AOPP, pur mantenendo a livelli controllati la formazione di gruppi carbonilici.

Da studi condotti su pazienti emodializzati si è visto che la componente proteica maggiormente responsabile della formazione delle AOPP è la HSA (albumina sierica umana) affiancata dalle γ -globuline (Capeillere-Blandin *et al.*,2004).

Per analizzare quale sia la specie proteica che maggiormente influisce sulla formazione delle AOPP nel bovino si è analizzata la componente plasmatica tramite elettroforesi monodimensionale condotta in condizioni denaturanti con e senza agenti riducenti.

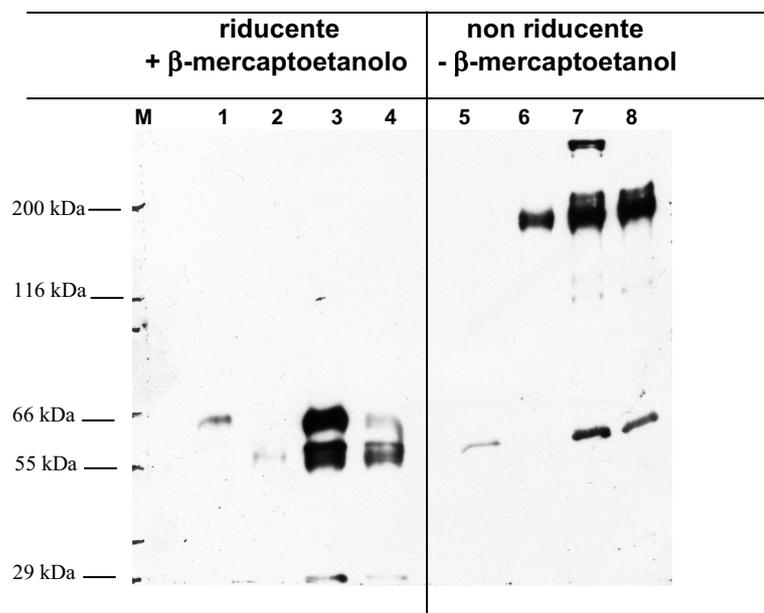


Fig. 4.1.13.: IMB ottenuto da SDS-PAGE denaturante dopo derivatizzazione del campione con DNPH, *lane* 1-4 con β -mercaptoetanol, *lane* 5-8 senza β -mercaptoetanol (*lane* 4 e 8 plasma ctrl senza DNPH).

Lane 1,5: BSA 0.11 μ g; *lane* 2,6: gGG 0.22 μ g; *lane* 3,4 e 7,8 Plasma 1.1 μ g

Come si può notare dalla figura 4.1.13. in condizioni denaturanti e non riducenti le uniche bande visibili nel plasma (*lane* 7,8) sono in corrispondenza dei 66 KDa della BSA (*lane* 5) e dei 200 KDa delle γ -globuline (*lane* 6). Trattando gli stessi campioni con il β -mercaptoetanol (*lane* 3,4) si osserva che le bande ad elevato peso molecolare visibili ai 200 KDa migrano in corrispondenza delle catene pesanti e leggere delle γ -globuline (*lane* 2), come ci si attendeva, ma in

quantità più marcata a 66 KDa corrispondenti all'albumina (*lane 3*). Da quanto emerge si può assumere che le bande ad elevato peso molecolare riscontrate nel plasma in condizioni non riducenti (200 KDa) siano costituite da aggregati proteici dovuti a ponti di zolfo e/o cross-linking tra residui di tirosina della BSA.

Partendo da queste considerazioni si sono trattati gli standard proteici ed il plasma con concentrazioni inferiori di ossidante/riducente a fronte di una minor concentrazione proteica di partenza secondo lo schema riportato in tabella 4.1.2. :

| Ossidante/riducente | BSA e gGG (1 mg/ml) | Plasma (1ml) |
|---------------------|---------------------------|--------------------------|
| HOCl | 0; 0.038; 0.114; 0.192 mM | 0; 0.7; 7.7; 15.5; 38 mM |
| Cum-OOH | 0; 0.1; 1; 10 mM | 0; 1; 10; 100 mM |
| NaBH ₄ | 0; 0.5; 5; 50 mM | 0, 5; 50; 150 mM |

Tab. 4.1.2.: Schema di ossidazione degli standard proteici per SDS-PAGE non riducenti

Dall'analisi elettroforetica eseguita (vedi figura.: 4.1.14., 4.1.15., 4.1.16.) si può osservare che nessuno dei trattamenti a cui sono stati sottoposti gli standard causa frammentazione e denaturazione delle proteine se non per il plasma trattato con alte concentrazioni di agente riducente (NaBH₄).

Utilizzando l' SDS-PAGE non riducente si è potuto osservare che solo la BSA ossidata con HOCl (figura: 4.1.14. A) determina la formazione di macrocomplessi in corrispondenza dei 120, 200 Kda. Questo è in linea con quanto osservato in letteratura dove si distinguono le AOPP "ad alto peso molecolare" (HMW) derivanti da ponti disolfuro e/o cross-linking della HSA e "a basso peso molecolare" costituite da albumina monometrica (Witko-Sarsat V *et al.* 1996). L'azione diretta dell'HOCl sulle proteine plasmatiche è responsabile sia della produzione di proteine clorinate con la formazione di clorammine ma anche agendo direttamente sui residui di tirosina contribuendo alla formazione dei dimeri di Tyr (di-Tyr) i cui principali prodotti di addizione all'anello fenolico sono 3,5-Cl-Tyr che danno origine ad aggregazione proteica (Fu *et al.*, 2000).

Per quanto riguarda l'ossidazione con Cumene (figura 4.1.15.) non si ha nessuna modificazione strutturale delle proteine ed il contenuto in carbonili totali

rimane stabile. L'ossidazione con cumene idroperossido non porta ad un aumento significativo del contenuto in gruppi carbonilici e neppure modificazioni strutturali della proteina.

La riduzione con sodio-boroidride confermano quanto precedentemente osservato (figura 4.1.16.) con la differenza che elevate dosi di agente riducente nel plasma causa una progressiva denaturazione delle specie ad elevato peso molecolare.

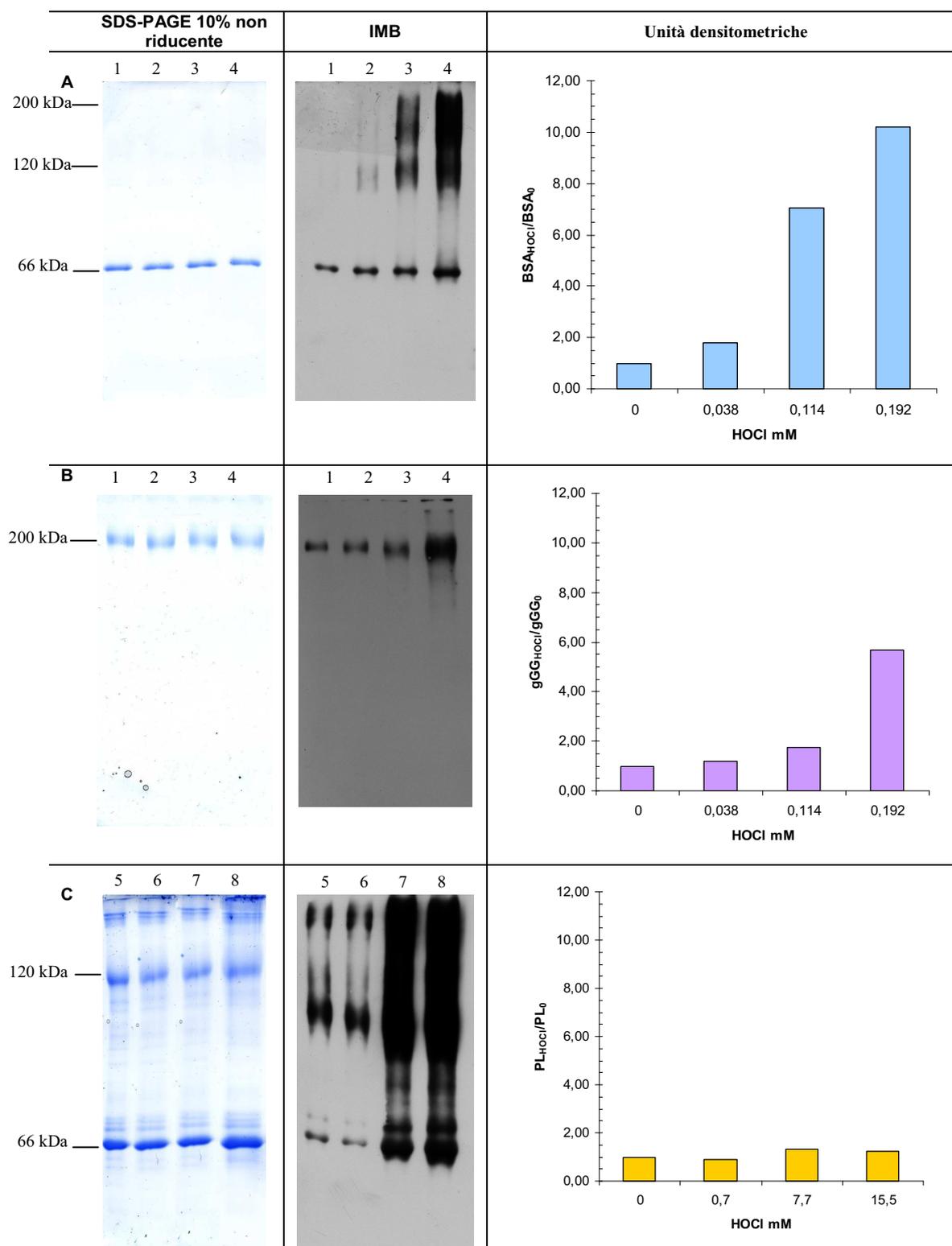


Fig. 4.1.14.: Elettroforesi di campioni ossidati con HOCl derivatizzati con DNPH. SDS-PAGE 6-12% colorato con comassie ed omologo IMB con relativa densitometria espressa come rapporto delle unità densitometriche dei gruppi carbonilici dello standard rispetto al suo valore basale.

Lane 1-4 clorinazione con HOCl 0, 0.038, 0.114, 0.192 mM. Lane 5-8 clorinazione con HOCl 0, 0.7, 7.7, 15.5, 38 mM

(A) BSA clorinata con HOCl (0-0.192 mM) SDS-PAGE 0.5 µg/lane; IMB 0.25 µg/lane.

(B) γ-globuline ossidate con HOCl (0-0.192 mM) SDS-PAGE 0.5 µg/lane; IMB 0.25 µg/lane

(C) Plasma clorinato con HOCl (0-39 mM) SDS-PAGE 2.5 µg/lane; IMB 1.25 µg/lane.

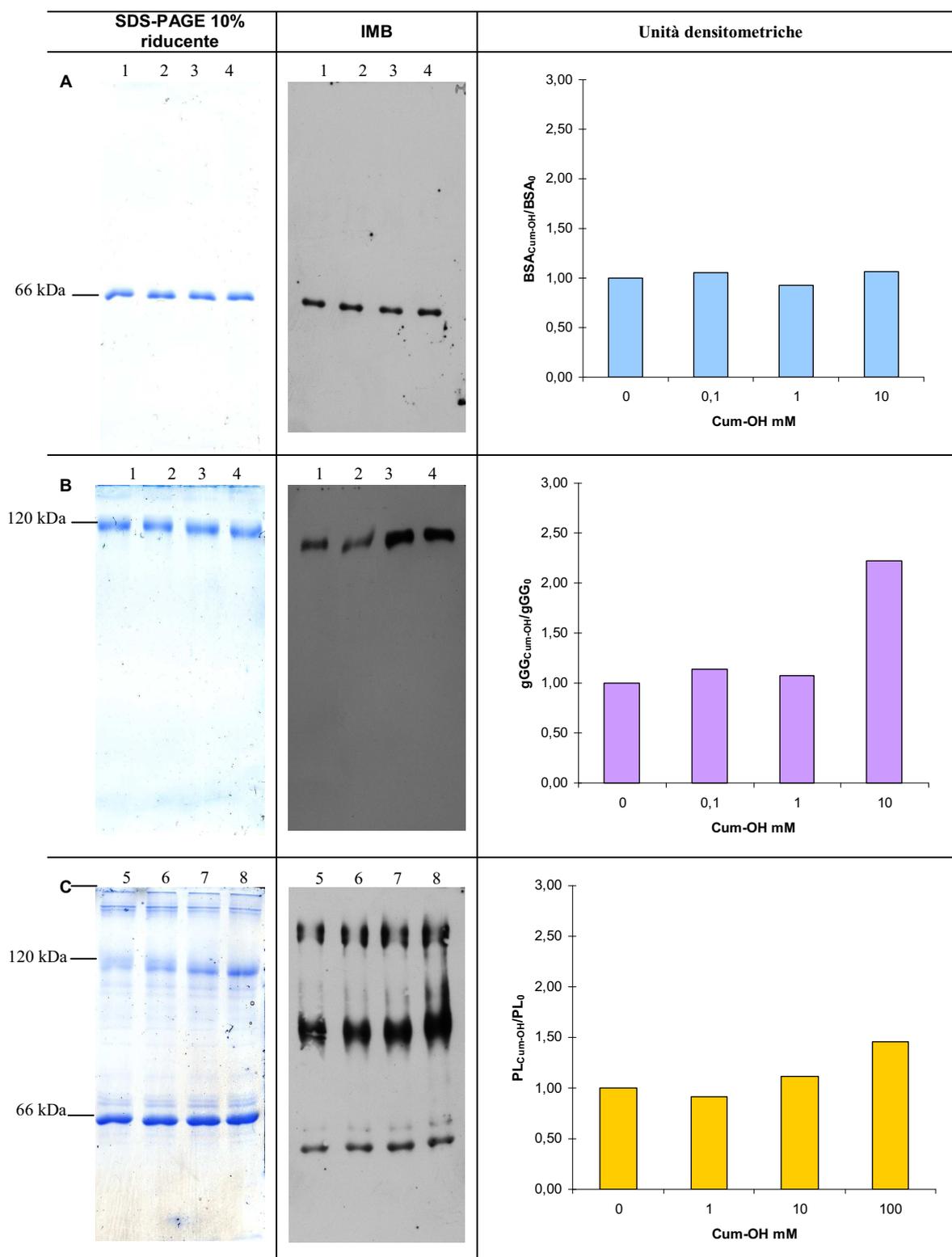


Fig. 4.1.15.: Elettroforesi di campioni ossidato con Cum-OOH e derivatizzati con DNPH. SDS-PAGE 6-12% colorato con comassie ed omologo IMB con relativa densitometria espressa come rapporto delle unità densitometriche dei gruppi carbonilici dello standard rispetto al suo valore basale.

Lane 1-4 ossidazione Cum-OH 0, 0.1, 1, 10 mM; lane 5-8 ossidazione con Cum-OH 0, 1, 10, 100 mM.

(A) BSA ossidata con Cum-OH (0-10 mM) SDS-PAGE 0.5 µg/lane; IMB 0.25 µg/lane.

(B) γ -globuline ossidata con Cum-OH (0-10 mM) SDS-PAGE 0.5 µg/lane; IMB 0.25 µg/lane.

(C) Plasma ossidato con Cum-OH (0-100 mM) SDS-PAGE 2.5 µg/lane; IMB 1.25 µg/lane.

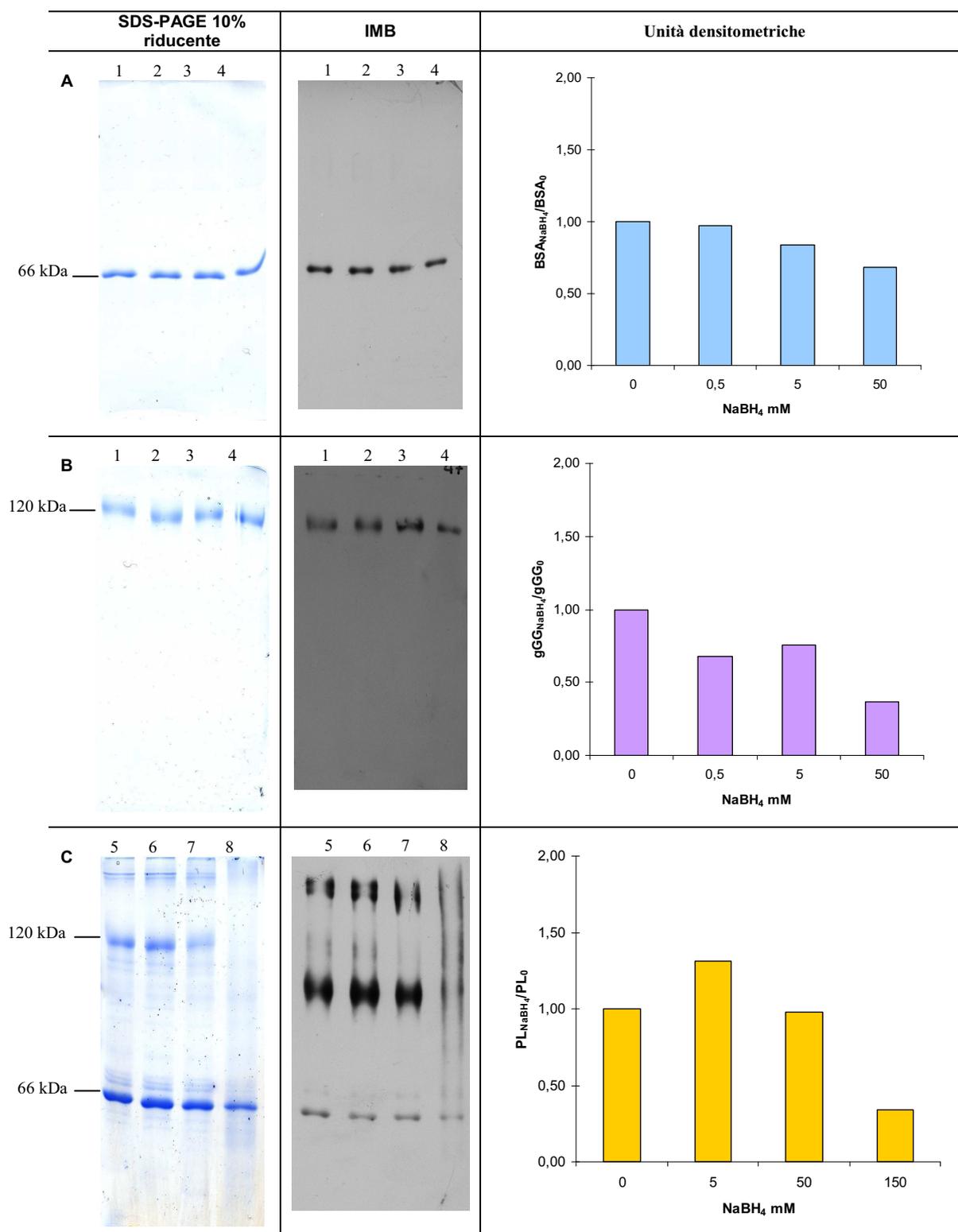


Fig. 4.1.16.: Elettroforesi di campioni ridotti con NaBH₄ e derivatizzati con DNPH. SDS-PAGE 6-12% colorato con comassie ed omologo IMB con relativa densitometria espressa come rapporto delle unità densitometriche dei gruppi carbonilici dello standard rispetto al suo valore basale.

Lane 1-4 riduzione NaBH₄ 0, 0.5, 5, 50 mM; lane 5-8 riduzione NaBH₄ 0, 5, 50, 150 mM.

(A) BSA ridotta con NaBH₄ (0-50 Mm) SDS-PAGE 0.5 µg/lane; IMB 0.25 µg/lane.

(B) γ-globuline ridotte con NaBH₄ (0-75 mM) SDS-PAGE 0.5 µg/lane; IMB 0.25 µg/lane.

(C) Plasma ridotto con NaBH₄ (0-150 mM) SDS-PAGE 1.25 µg/lane; IMB 2.5 µg/lane.

4.2. MONITORAGGIO DELLE AOPP NEL POST PARTO E NEL PROCESSO INFIAMMATORIO NELLA BOVINA DA LATTE

Nella seconda parte si è cercato di mettere in relazione la variazione delle AOPP, come indicatore di stress ossidativo, nei vari stadi produttivi delle bovine da latte in modo da evidenziare eventuali effetti della condizione fisiologica sulla loro concentrazione plasmatica.

Inoltre la formazione delle AOPP che è tipica degli ossidanti clorurati prodotti per opera dell'enzima mieloperossidasi (MPO), fa supporre che le AOPP siano il risultato di un fenomeno infiammatorio acuto. Pertanto si è ricercata una possibile correlazione tra processi infiammatori acuti e cronici più frequenti nelle bovine da latte (mastiti, endometriti e patologie podali) e livelli plasmatici di AOPP.

4.2.1. CORRELAZIONE TRA I VARI PARAMETRI

Prima di analizzare nel dettaglio i risultati ottenuti, sono state studiate le correlazioni tra i parametri (Tabella 4.2.1.). Questa indagine è stata condotta allo scopo di individuare quali fossero gli indicatori che meritavano maggiore attenzione e, in particolar modo, quali avessero una relazione significativa con le AOPP. La correlazione più interessante è quella tra AOPP e aptoglobina ($r=0,430$; $P<0,001$). Visto l'utilizzo di quest'ultimo parametro come indicatore di processo di fase acuta, questo dato ci suggerisce che le proteine ossidate sono dei validi indicatori del fenomeno infiammatorio acuto, poiché esiste una correlazione positiva tra i due parametri.

| | | PT | GSH | AOPP | AOPP_PT | MDA | MDA_PT | DHEA | C | DHEA_C | LISO | IL6 | APTO | LINF | NEUT | EOS | BAS | MON |
|---------|---|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
| GSH | R | -0,192 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | P | 0,131 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AOPP | R | 0,144 | -0,307 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | P | 0,261 | 0,014 | | | | | | | | | | | | | | | |
| AOPP_PT | R | -0,361 | -0,215 | 0,862 | | | | | | | | | | | | | | |
| | P | 0,004 | 0,091 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | |
| MDA | R | -0,031 | 0,218 | 0,185 | 0,188 | | | | | | | | | | | | | |
| | P | 0,817 | 0,097 | 0,161 | 0,154 | | | | | | | | | | | | | |
| MDA_PT | R | -0,225 | 0,246 | 0,113 | 0,223 | 0,966 | | | | | | | | | | | | |
| | P | 0,086 | 0,060 | 0,393 | 0,090 | 0,000 | | | | | | | | | | | | |
| DHEA | R | 0,169 | -0,255 | 0,155 | 0,045 | -0,008 | -0,049 | | | | | | | | | | | |
| | P | 0,185 | 0,043 | 0,227 | 0,727 | 0,955 | 0,713 | | | | | | | | | | | |
| C | R | 0,130 | 0,268 | -0,104 | -0,170 | 0,136 | 0,104 | -0,294 | | | | | | | | | | |
| | P | 0,309 | 0,034 | 0,418 | 0,182 | 0,303 | 0,434 | 0,019 | | | | | | | | | | |
| DHEA_C | R | 0,105 | -0,279 | 0,082 | 0,026 | -0,066 | -0,091 | 0,831 | -0,597 | | | | | | | | | |
| | P | 0,413 | 0,027 | 0,525 | 0,838 | 0,622 | 0,493 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | |
| LISO | R | 0,121 | -0,027 | -0,030 | -0,001 | 0,024 | 0,002 | -0,060 | -0,033 | -0,049 | | | | | | | | |
| | P | 0,373 | 0,841 | 0,828 | 0,555 | 0,866 | 0,989 | 0,618 | 0,810 | 0,720 | | | | | | | | |
| IL6 | R | 0,071 | 0,018 | 0,147 | 0,078 | -0,062 | -0,095 | 0,071 | 0,059 | 0,000 | 0,062 | | | | | | | |
| | P | 0,592 | 0,893 | 0,262 | 0,555 | 0,651 | 0,487 | 0,591 | 0,657 | 0,998 | 0,655 | | | | | | | |
| APTO | R | 0,114 | -0,265 | 0,430 | 0,377 | -0,012 | -0,048 | -0,018 | -0,194 | -0,010 | 0,160 | -0,109 | | | | | | |
| | P | 0,381 | 0,039 | 0,001 | 0,003 | 0,928 | 0,722 | 0,889 | 0,133 | 0,937 | 0,249 | 0,407 | | | | | | |
| LINF | R | -0,123 | 0,250 | -0,013 | 0,022 | 0,209 | 0,194 | -0,069 | 0,079 | -0,076 | -0,120 | 0,186 | -0,312 | | | | | |
| | P | 0,335 | 0,048 | 0,921 | 0,866 | 0,112 | 0,140 | 0,591 | 0,536 | 0,554 | 0,376 | 0,156 | 0,014 | | | | | |
| NEUT | R | 0,092 | -0,191 | 0,025 | -0,003 | -0,114 | -0,121 | 0,141 | -0,140 | 0,164 | 0,109 | -0,126 | 0,209 | -0,914 | | | | |
| | P | 0,474 | 0,135 | 0,848 | 0,981 | 0,389 | 0,363 | 0,272 | 0,274 | 0,199 | 0,425 | 0,336 | 0,106 | 0,000 | | | | |
| EOS | R | 0,094 | -0,155 | 0,003 | -0,040 | -0,023 | -0,002 | -0,169 | 0,187 | -0,193 | -0,034 | 0,080 | -0,119 | 0,104 | -0,268 | | | |
| | P | 0,463 | 0,225 | 0,984 | 0,757 | 0,866 | 0,986 | 0,185 | 0,142 | 0,129 | 0,805 | 0,542 | 0,361 | 0,419 | 0,034 | | | |
| BAS | R | 0,009 | -0,052 | -0,127 | -0,134 | -0,119 | -0,100 | -0,160 | 0,393 | -0,263 | 0,080 | 0,063 | -0,113 | -0,132 | 0,006 | 0,116 | | |
| | P | 0,943 | 0,688 | 0,320 | 0,296 | 0,368 | 0,451 | 0,211 | 0,001 | 0,037 | 0,556 | 0,631 | 0,386 | 0,304 | 0,961 | 0,367 | | |
| MON | R | 0,038 | -0,076 | -0,005 | 0,000 | -0,225 | -0,182 | -0,065 | -0,026 | -0,073 | 0,025 | -0,209 | 0,376 | -0,296 | -0,052 | -0,123 | 0,063 | |
| | P | 0,770 | 0,555 | 0,967 | 0,998 | 0,087 | 0,169 | 0,615 | 0,839 | 0,568 | 0,853 | 0,108 | 0,003 | 0,018 | 0,686 | 0,338 | 0,622 | |
| N_L | R | 0,161 | -0,235 | 0,091 | 0,025 | -0,116 | -0,125 | 0,068 | -0,012 | 0,050 | 0,086 | -0,094 | 0,280 | -0,914 | 0,936 | -0,191 | 0,067 | 0,064 |
| | P | 0,208 | 0,064 | 0,478 | 0,846 | 0,381 | 0,345 | 0,594 | 0,926 | 0,694 | 0,529 | 0,476 | 0,029 | 0,000 | 0,000 | 0,135 | 0,603 | 0,617 |

Tab. 4.2.1.: Coefficienti di correlazione di Pearson dei vari parametri ematici confrontati tra loro. Nelle celle colorate si mettono in risalto i valori con P<0,05. In rosso evidenziata la correlazione tra AOPP e aptoglobina. R: indice di correlazione; P: significatività statistica; PT: proteine totali; AOPP/PT: AOPP/proteine totali; MDA: malondialdeide; MDA/PT: malondialdeide/proteine totali; C: cortisolo; DHEA/C: DHEA/cortisolo; Ab SI: anticorpi sierici anti AOPP-BSA; LISO: lisozima; APTO: aptoglobina; LINF: linfociti; NEUT: granulociti neutrofilii; EOS: granulociti eosinofili; BAS: granulociti basofili; MON: monociti; N/L: granulociti neutrofilii/linfociti

Inoltre si può evidenziare una correlazione negativa tra GSH e AOPP: questo risulta in linea con quanto rilevato in uno studio di Malmezat *et al.* (2000) in cui si mette in risalto un calo del GSH totale a seguito di infezione sperimentale. Tale fenomeno avviene probabilmente a causa del “consumo” del GSH all’aumentare dello stress ossidativo, allo scopo di ristabilire lo stato redox cellulare. In questo senso il processo infiammatorio sarebbe responsabile sia di un aumento delle AOPP, sia dell’aumento della produzione di specie reattive dell’ossigeno che determinerebbe il calo nella concentrazione del GSH stesso. Stesso ragionamento può valere per la correlazione esistente tra GSH e indicatori di processo infiammatorio quali l’aptoglobina o altri fattori la cui concentrazione è sensibile alle forme flogistiche, come DHEA, rapporto DHEA/cortisolo o cortisolo.

Le altre correlazioni non sono state prese in considerazione in questo contesto, vista la scarsa attinenza con lo scopo di questo lavoro, mentre le concentrazioni ematiche di TNF- α e IFN- α non sono risultate rilevabili.

4.2.2. VARIAZIONI FISILOGICHE DELLE AOPP

Sulla base del sospetto che i valori dei parametri misurati potessero subire variazioni in relazione allo stadio produttivo, sono stati analizzati e confrontati i risultati nell'ambito dei vari gruppi di animali presenti all'interno della popolazione clinicamente sana (vedi capitolo 3.2.).

In questa prima analisi sono stati confrontati tra loro i risultati delle sole sottopopolazioni adulte di animali (con esclusione quindi del gruppo delle manze). Questa scelta è stata condotta al fine di valutare le possibili variazioni dei parametri oggetto del presente studio all'interno di una popolazione omogenea di animali (vista la potenziale differenza dal punto di vista fisiologico e metabolico di un animale in accrescimento rispetto ad uno in produzione), focalizzando l'attenzione sulle sole differenze riscontrabili in relazione alla distanza temporale dal parto.

I valori di aptoglobina mostrano un picco evidente nella prima settimana post parto, nonostante si possa evidenziare una grande variabilità all'interno del gruppo stesso; i valori invece risultano basali negli altri periodi ($P < 0,05$) (Figura: 4.2.1).

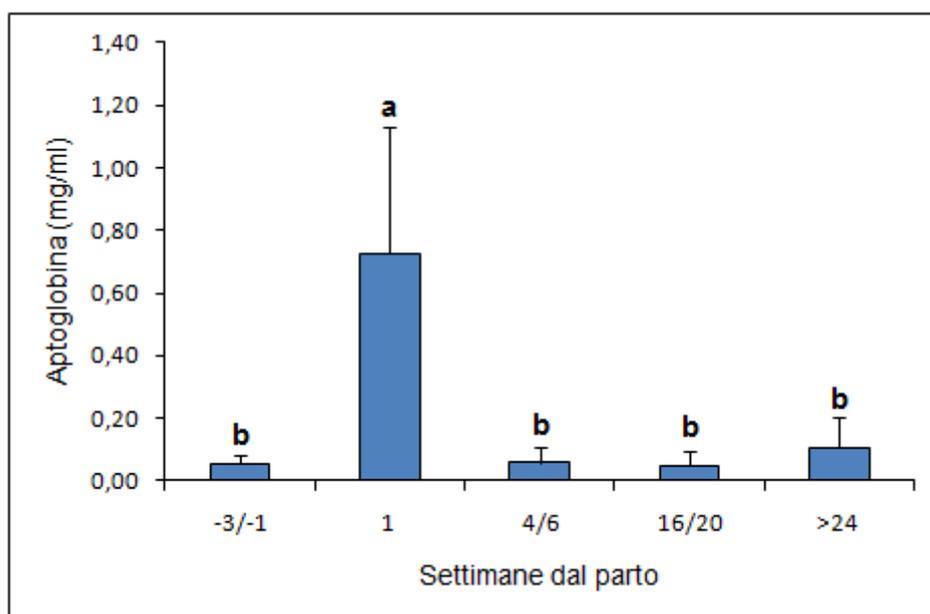


Fig. 4.2.1.: Variazione delle concentrazioni medie di aptoglobina nelle diverse fasi fisiologiche. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,05$)

Essendo l'aptoglobina una proteina di fase acuta, i livelli elevati di questo parametro sarebbero indicativi di un processo infiammatorio acuto in corso. Il fenomeno che dà origine alla secrezione di aptoglobina da parte del fegato è dato primariamente dal rilascio di IL-6, dopo stimolazione da parte del TNF- α e dell'IL-1 (Oliviero *et al.*, 1987). Tuttavia la concentrazione media di IL-6 negli animali che si trovano nella prima settimana post parto (vedi oltre) è la più bassa tra quelle riscontrate nelle varie sottopopolazioni.

L'innalzamento del valore dell'aptoglobina potrebbe essere giustificato invece dallo stress dovuto al parto recente e dalla marcata alterazione dell'equilibrio endocrino che scatena e segue l'evento del parto, oltre che dalla persistenza dell'apertura della cervice in questa fase, che rende inevitabile una contaminazione dell'ambiente uterino e quindi l'innescamento della cascata infiammatoria. La diversa intensità di questi eventi nei vari animali e l'influenza dei molteplici fattori che rendono la risposta a questi stimoli molto soggettiva, giustificano l'ampia variabilità che si riscontra all'interno del gruppo. Alla luce di quanto considerato, e in particolar modo del basso livello dell'IL-6, l'innalzamento dell'aptoglobina in questi animali potrebbe essere quindi giustificato proprio dall'evento stressante del parto e in particolar modo dalla stimolazione da parte di ormoni quali l'estradiolo (Thomas, 2000). L'innalzamento della concentrazione dell'aptoglobina nella prima settimana post parto è inoltre perfettamente in accordo con quanto dimostrato nello studio di Huzzey *et al.* (2009), che evidenziava un picco di tale parametro in questa fase produttiva anche negli animali che non mostravano segni clinici di metrite (vedi paragrafo 2.6.1). Uchida *et al.* (1993) ipotizzavano inoltre la possibile correlazione tra l'innalzamento della concentrazione ematica dell'aptoglobina nella fase post parto e l'insorgenza di steatosi, presente con discreta probabilità nello stesso periodo.

L'analisi della variazione delle concentrazioni delle AOPP (espresse in μM) non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i gruppi considerati (Figura 4.2.2.).

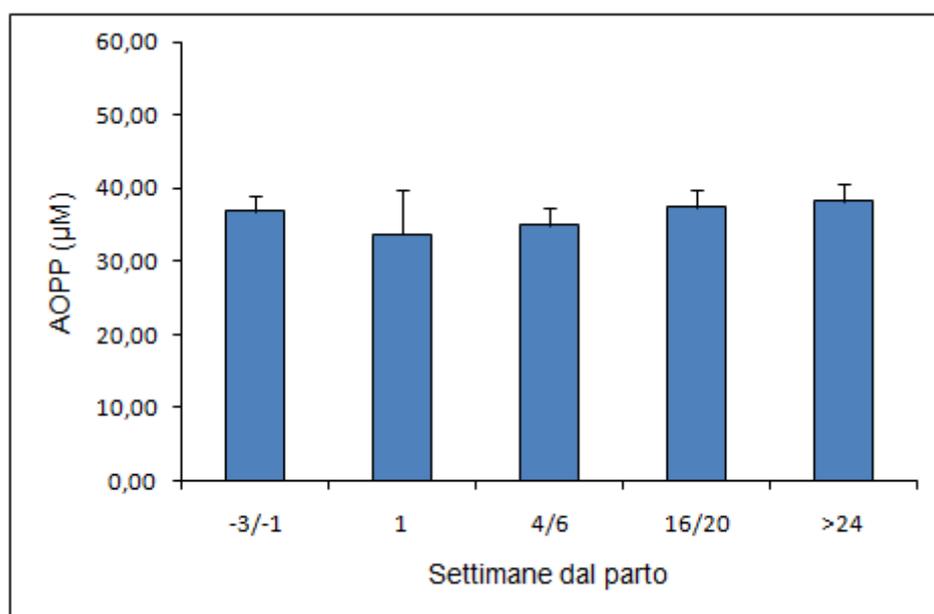


Fig. 4.2.2.: Variazione delle concentrazioni medie delle AOPP nelle diverse fasi fisiologiche.

Al contrario dei risultati ottenuti nella valutazione dell'aptoglobina, in questo caso non si evidenziano aumenti significativi in nessun gruppo. In particolare modo gli animali nella prima settimana post parto (nonostante mostrino variabilità più ampia rispetto agli altri gruppi, presumibilmente a causa della potenziale contaminazione uterina e del conseguente processo infiammatorio che può essere considerato parafisiologico) presentano valori medi di AOPP paragonabili a quelli delle altre sottopopolazioni. Questa omogeneità dei valori medi nei vari gruppi di animali sani risulterebbe quindi in linea con l'ipotesi che sia una significativa attivazione di granulociti neutrofilii e monociti a dare origine alla formazione di questi indicatori.

L'analisi del DHEA ha evidenziato differenze significative tra i gruppi di animali ($P < 0,01$). In particolare gli animali che si trovano entro le 3 settimane che precedono il parto mostrano livelli di DHEA marcatamente più elevati rispetto agli altri gruppi, che risultano invece omogenei tra loro (Figura 4.2.3.).

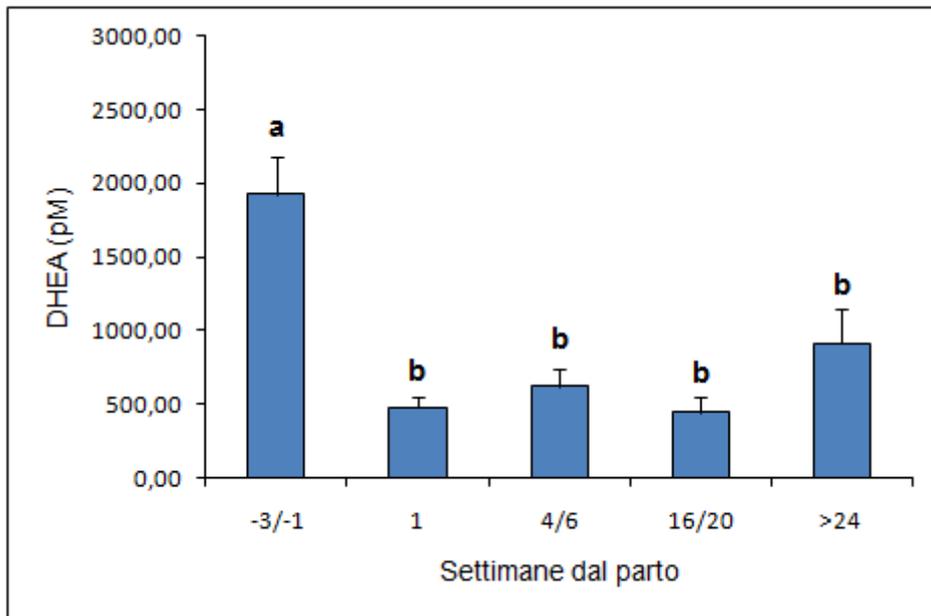


Fig. 4.2.3.: Variazione delle concentrazioni medie di DHEA nelle diverse fasi fisiologiche. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,01$)

Questo risultato conferma quanto già riportato in altri studi (Gabai *et al.*, 2004; Marinelli *et al.*, 2007): nonostante il DHEA sia infatti un ormone prodotto da gonadi e surrene, nella fase di tarda gravidanza è la placenta a divenire la più rilevante fonte di questo androgeno. Questo fenomeno spiega l'innalzamento della sua concentrazione nelle ultime settimane di gestazione e il suo brusco calo dopo il parto.

I valori di cortisolo risultano essere più elevati nel gruppo di animali che si trovano a 4/6 settimane dal parto e a 16/20 settimane dal parto ($P < 0,01$). Tendono invece ad essere più bassi in prossimità del parto (-3/-1 settimane al parto e 1 settimana dopo il parto) e ad assumere valori intermedi oltre le 24 settimane dopo il parto ($P < 0,01$), come evidenziato nel grafico (Figura 4.2.4.).

Il fisiologico picco della cortisolemia nel periparto si evidenzia tra le 12 ore precedenti e le 12 ore successive al parto, e mostra oscillazioni per le 36 ore che seguono il parto stesso (Smith *et al.*, 1973). In questo caso, non è stato possibile evidenziare tale picco nelle sottopopolazioni interessate, a causa del diverso intervallo temporale prelievo-parto tra gli animali di uno stesso gruppo.

Le concentrazioni medie, inoltre, risultano più basse nel periparto per poi aumentare nelle fasi oltre le 4/6 settimane post parto. Ciò è probabilmente legato all'attività produttiva dell'animale. Nelle fasi preparto lo stress legato alla

manipolazione dell'animale è molto basso, per poi aumentare dopo il parto e raggiungere livelli massimi in prossimità del picco produttivo.

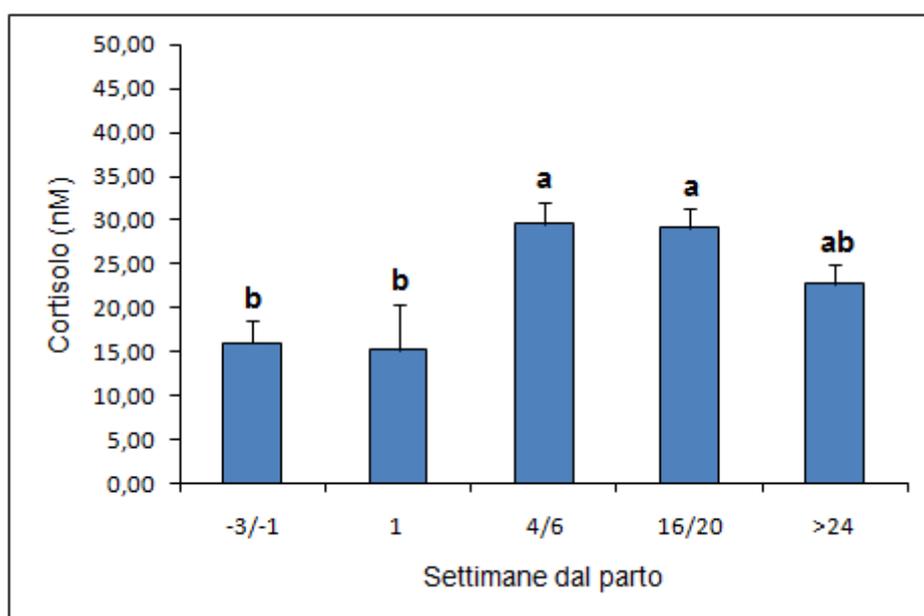


Fig. 4.2.4.: Variazione delle concentrazioni medie di cortisolo nelle diverse fasi fisiologiche. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,01$)

Similmente all'andamento del DHEA stesso, il rapporto DHEA/cortisolo risulta significativamente più elevato nelle tre settimane che precedono il parto, diminuendo drasticamente e assumendo valori basali nell'intero periodo post parto ($P < 0,01$) (Figura 4.2.5.).

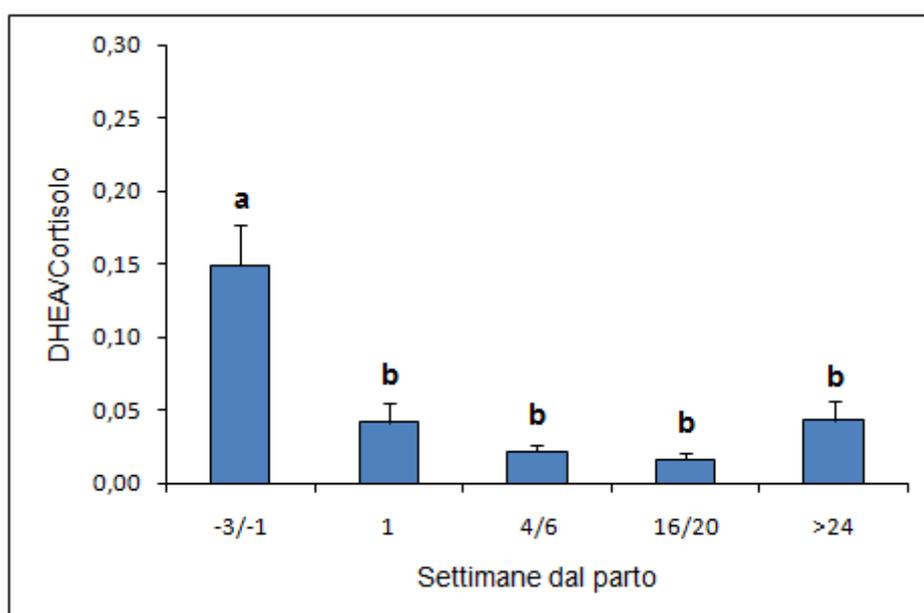


Fig. 4.2.5.: Variazione dei valori medi del rapporto DHEA/Cortisolo nelle diverse fasi fisiologiche. Lettere diverse indicano medie statisticamente differenti. ($P < 0,01$)

Il significato del rapporto DHEA/cortisolo è prevalentemente di tipo immunitario. Come descritto precedentemente (paragrafo 2.6.7) il DHEA ha proprietà “immuno-protettive” (Saccò *et al.*, 2002), mentre il cortisolo è un importante immunosoppressore (Cupps and Fauci, 1982). Il rapporto elevato quindi è indicativo di maggiore resistenza dell’animale nei confronti delle infezioni. Tuttavia, in questo caso, l’elevato rapporto DHEA/cortisolo nelle 3 settimane che precedono il parto è dovuto alla massiccia produzione dell’ormone da parte della placenta. Per questo motivo, nel momento in cui si renda necessario confrontare i valori di questo rapporto tra animali, risulta di fondamentale importanza tenere in considerazione se i soggetti si trovino in questa fase preparto; essa altera drasticamente i valori del parametro, mascherando l’effettiva produzione da parte di gonadi e surrene, e rendendo quindi inutile ogni paragone con animali che non siano nella fase terminale della gravidanza.

I valori di IL-6 hanno mostrato oscillazioni tra i gruppi, con un nadir nella prima settimana post parto e una intuibile tendenza ad aumentare nel periodo successivo, fino a raggiungere il picco massimo negli animali che si trovano ad oltre 24 settimane dal parto ($P < 0,05$) (Figura 4.2.6.).

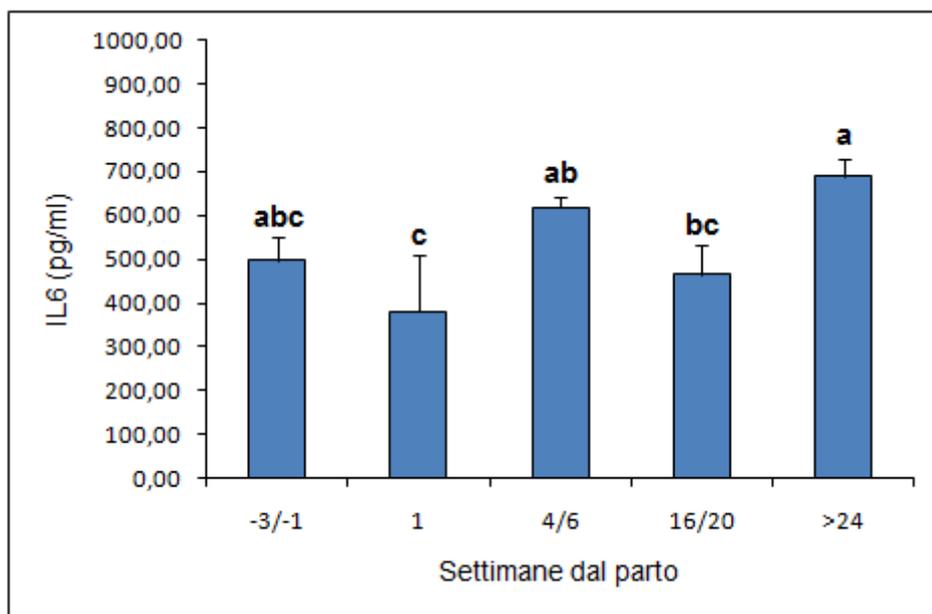


Fig. 4.2.6.: Variazione delle concentrazioni medie di IL-6 nelle diverse fasi fisiologiche. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,05$)

I dati in letteratura (Ishikawa *et al.*, 2004) riportano un aumento delle concentrazioni del parametro nelle fasi che precedono il parto e una loro diminuzione nella fase post-parto. Va tuttavia considerato che tali valutazioni sono state condotte solo nei 60 giorni precedenti e successivi al parto stesso, e quindi risultano difficilmente confrontabili con i dati illustrati in questo lavoro. Un altro studio (Hagiwara *et al.*, 2001), che valutava animali suddivisi in 3 fasi di lattazione (precoce, intermedia e tarda), non ha invece rilevato differenze significative tra i gruppi.

I risultati, infine, evidenziano valori oscillanti delle concentrazioni medie di IL-6 nelle varie fasi fisiologiche: in questo caso l'impossibilità di definire un andamento lineare del valore è probabilmente legata alla scarsa numerosità dei campioni. L'interpretazione di questi risultati si rivela quindi difficoltosa a causa sia dell'inesistenza di dati completamente confrontabili in letteratura, sia dalla scarsa quantità di animali analizzati in questo studio, che rende il campione poco rappresentativo.

Gli altri parametri analizzati in questo lavoro non hanno mostrato differenze statisticamente significative tra i gruppi considerati.

4.2.3. CONFRONTO TRA MANZE E ANIMALI ADULTI

All'interno della popolazione clinicamente sana è stato posto un confronto tra manze e animali adulti. In questo caso sono state condotte comparazioni tra il gruppo delle manze e gli animali adulti a 4/6 settimane dopo il parto, e a 16/20 settimane dopo il parto. Lo scopo di questa valutazione è quello di considerare se animali giovani, che non hanno mai partorito, mostrino valori indicativi di stress ossidativo diversi rispetto ad animali adulti che hanno già affrontato almeno un parto. Allo scopo di concentrare l'attenzione su questo aspetto, non sono stati condotti i confronti tra le manze e gli altri tre gruppi di animali adulti (-3/-1 settimane al parto; 1 settimana dopo il parto; più di 24 settimane dopo il parto): questo a causa dell'impossibilità di paragonare sottopopolazioni così diverse dal punto di vista fisiologico e con presumibili differenze nei parametri ricercati, legate allo stesso stadio produttivo piuttosto che all'età dell'animale. Gli animali a -3/-1 settimane al parto sono stati scartati dal confronto per il

quadro endocrino completamente diverso rispetto alle manze, quelli a 1 settimana dopo il parto per una probabile alterazione del profilo ossidativo visti i processi di lochiazione in atto durante questa fase, mentre quelli oltre le 24 settimane dopo il parto per l'eterogeneità di situazioni fisiologiche (gravidanza presente o meno, epoca di gestazione, ecc.).

In entrambe le valutazioni (manze vs animali a 4/6 settimane dal parto e manze vs animali a 16/20 settimane dal parto) nessun parametro tra quelli analizzati ha mostrato differenze significative tra i gruppi.

4.2.4. CONFRONTO TRA ANIMALI SANI E ANIMALI SOGGETTI A PROCESSO INFIAMMATORIO

Per poter meglio interpretare i risultati derivanti dal confronto tra popolazione sana e popolazioni malate, è stato valutato il livello di associazione tra i due parametri di classificazione (clinico e basato sul livello di aptoglobina). Questo è risultato elevato (Coefficiente di contingenza =0,579; $P < 0,001$) (Tabella 4.2.2.).

| Classificazione basata sulle concentrazioni di Aptoglobina | Classificazione Clinica | | | Totale |
|--|-------------------------|-----------------------|---------------------|--------|
| | Controllo | Infiammazione Cronica | Infiammazione Acuta | |
| Controllo | 22 | 9 | 0 | 31 |
| Infiammazione Acuta | 4 | 3 | 11 | 18 |
| Totale | 26 | 12 | 11 | 49 |

Tab. 4.2.2.: Associazione tra le diagnosi ottenute mediante anamnesi e valutazione clinica dei soggetti (criterio di classificazione clinica) o mediante valutazione delle concentrazioni ematiche di aptoglobina. Il livello di associazione tra i due criteri di classificazione è risultato elevato (Coefficiente di contingenza=0,579; $P < 0,001$)

Si sottolinea che tra i 4 animali clinicamente sani che hanno presentato elevati valori di aptoglobina, 2 si trovano nella classe della prima settimana post parto, momento in cui questa proteina di fase acuta tende ad aumentare fisiologicamente e non è quindi necessariamente indice di un processo patologico in atto. Tra gli animali segnalati come appartenenti al gruppo clinico

dell'infiammazione cronica, invece, i tre che hanno manifestato valori elevati di aptoglobina presentavano forme di riacutizzazione o peggioramento dei sintomi nei giorni del prelievo: nonostante sulla base dei criteri di classificazione (vedi paragrafo 3.2.14.) essi appartenessero al gruppo clinico "con infiammazione cronica", l'aumento del parametro infiammatorio in questi casi è perfettamente giustificabile.

L'elevato valore del coefficiente di contingenza indica che la valutazione clinica e quella basata sui valori dell'aptoglobina sono pressoché sovrapponibili per quanto concerne l'infiammazione acuta.

Il confronto è stato condotto tra animali clinicamente sani, animali con infiammazione acuta e animali con infiammazione cronica secondo i criteri descritti nel paragrafo 3.2.14.

Tra gli animali clinicamente sani sono stati esclusi i soggetti che si trovavano nelle 3 settimane che precedono il parto (gruppo -3/-1). Il motivo di tale scelta è la differenza sostanziale di alcuni valori (in particolare del DHEA e del rapporto DHEA/Cortisolo) evidenziata nei risultati precedenti (paragrafo 4.2.2), secondo i quali l'effetto della fase fisiologica può mascherare quello legato ai fenomeni infiammatori, oltre che l'assenza tra gli animali malati di soggetti in questo stadio produttivo. Allo scopo di confrontare gruppi omogenei, anche le manze non sono state tenute in considerazione tra gli animali sani per i motivi di cui si è già accennato (paragrafo 4.2.2.).

In questa analisi i risultati hanno evidenziato differenze tra i gruppi di più parametri, quali: aptoglobina, AOPP e rapporto AOPP/Proteine totali, GSH, DHEA e rapporto DHEA/Cortisolo, numero di linfociti e rapporto neutrofili/linfociti.

I valori medi dell'aptoglobina sono evidentemente superiori nel gruppo di animali con infiammazione acuta ($P < 0,001$), mentre i livelli del parametro negli altri due gruppi risultano basali (Figura 4.2.7.).

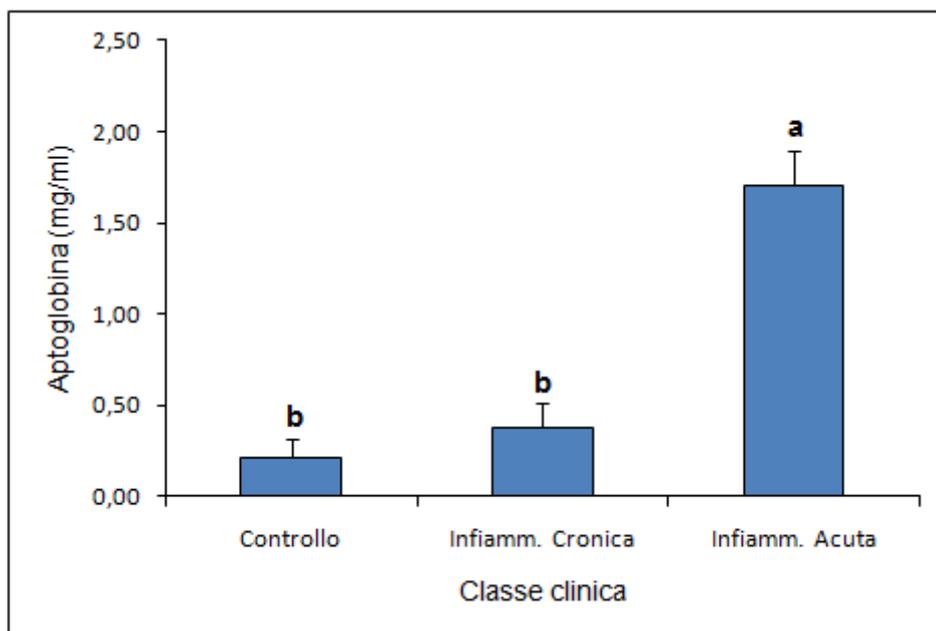


Fig. 4.2.7. Variazione delle concentrazioni medie di aptoglobina tra i gruppi di animali classificati sulla base dei segni clinici. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,001$)

Il valore marcatamente più elevato negli animali in fase acuta è perfettamente in linea con quanto riportato in altri studi (Skinner *et al.*, 1991), nei quali si evidenzia un valore medio inferiore a 0,2 mg/ml per animali sani e valori tra 1 e 2 mg/ml per gli animali con forme infiammatorie conclamate in atto.

Risulta da chiarire invece il motivo per cui le concentrazioni medie di IL-6 in queste sottopopolazioni non mostrino differenze statisticamente significative tra loro, visto che questa citochina rappresenta il più importante fattore nello stimolo alla secrezione dell'aptoglobina (Oliviero *et al.*, 1987). Probabilmente questo è imputabile al basso numero di animali oggetto di studio. L'ampiezza dell'errore standard rilevato avvalorerebbe questa ipotesi (Figura 4.2.8.).

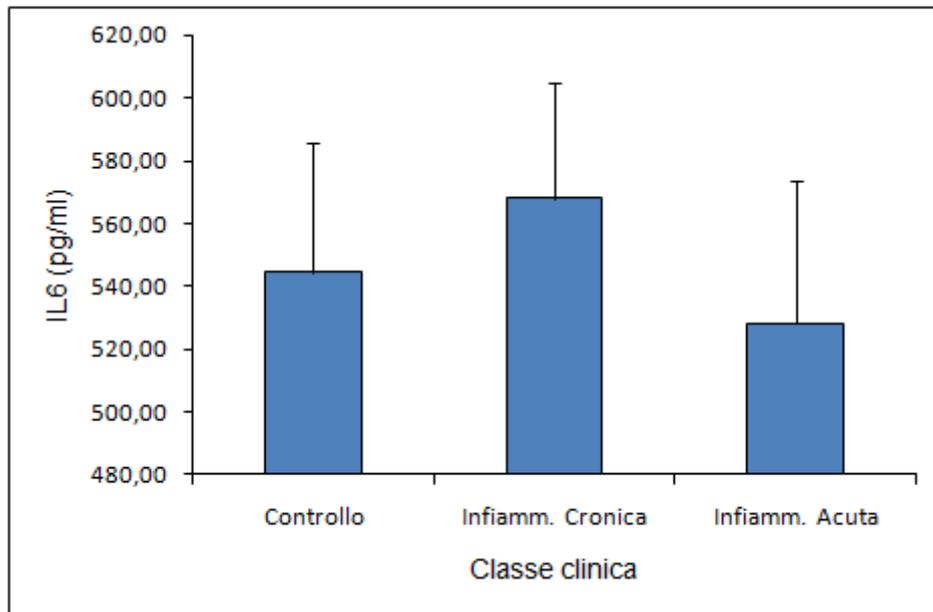


Fig. 4.2.8.: Variazione delle concentrazioni medie di IL-6 tra i gruppi di animali classificati sulla base dei segni clinici.

Il valore delle AOPP ($P < 0,01$) risulta più elevato negli animali in fase acuta rispetto agli altri due gruppi, come illustrato nella figura 4.2.9. Si riesce inoltre ad evidenziare un valore intermedio del parametro negli animali che presentano infiammazione cronica.

Questo tipo di risultato avvalora l'ipotesi che questi marker di stress ossidativo siano importanti indicatori di attivazione neutrofilica. Questa differenza nelle concentrazioni del parametro sono rese ancor più evidenti se vengono confrontate coi valori delle proteine totali, come rapporto AOPP/proteine totali (figura 4.2.10.). In questo caso si evidenzia una significativa differenza tra animali con infiammazione acuta da una parte, e animali sani e con infiammazione cronica dall'altra ($P < 0,05$).

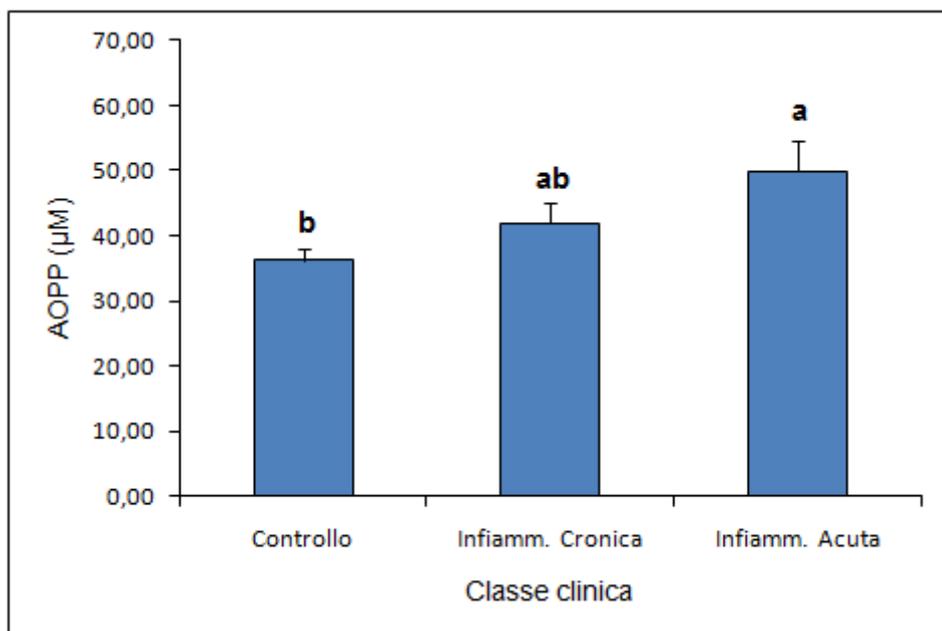


Fig. 4.2.9.: Variazione delle concentrazioni medie delle AOPP tra gruppi di animali classificati sulla base dei segni clinici. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,01$)

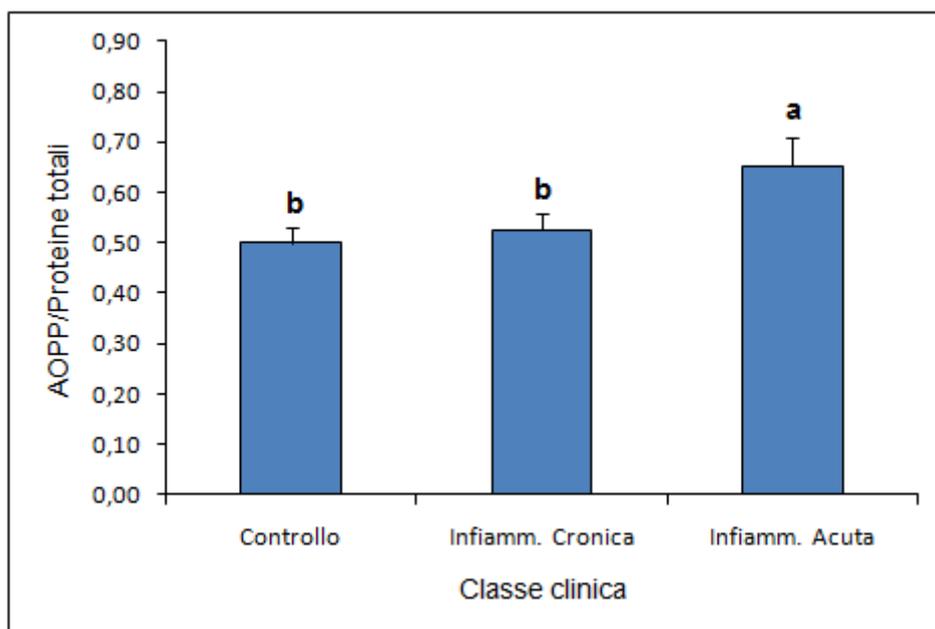


Fig. 4.2.10.: Variazione dei valori medi del rapporto AOPP/proteine totali tra gruppi di animali classificati sulla base dei segni clinici. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,05$)

Questi risultati confermerebbero che quanto evidenziato da Witko Sarsat *et al.* (1996; 1998) nell'ambito dei pazienti sottoposti a dialisi, risulta valido anche nel caso della specie bovina in corso di processo infiammatorio acuto: l'attivazione neutrofilica porterebbe ad un aumento dell'attività della mieloperossidasi che, tramite la produzione di acido ipocloroso (HOCl) e di ditirosina, determinerebbe l'ossidazione della componente proteica plasmatica. Il fatto che non ci siano

differenze significative tra il gruppo di controllo e il gruppo di animali con infiammazione cronica sottolinea la specificità del parametro nei confronti della sola attivazione neutrofilica.

Nel paragrafo 4.2.1. è stata messa in luce la correlazione esistente tra AOPP e GSH, e AOPP e aptoglobina: oltre che essere importanti marker di stress ossidativo, quindi, le AOPP si sono dimostrate anche ottimi indicatori di processo infiammatorio acuto. Conseguentemente si può concludere che le AOPP possano essere utilizzate come marker di fase acuta al pari dell'aptoglobina ma, al contrario di quest'ultima, esse non sembrano influenzate da fenomeni quali il parto (figura. 4.2.2.), risultando quindi più affidabili dell'aptoglobina stessa. Viene inoltre confermato quanto ipotizzato dagli studi di Witko-Sarsat *et al.* (1996), ovvero che le AOPP siano indicatori di stress ossidativo più attendibili della malondialdeide classicamente usata, visto che quest'ultima non ha evidenziato variazioni nell'ambito delle popolazioni classificate in base ai sintomi clinici.

I valori di GSH mostrano differenze significative ($P < 0,01$) nel gruppo di controllo, dove il valore risulta più elevato rispetto agli animali in fase cronica e a quelli in fase acuta. In questi ultimi si evidenzia un valore intermedio (figura 4.2.11.).

In alcuni studi si è dimostrato che il digiuno (Hum *et al.*, 1991) e la carenza di apporto proteico con la dieta (Hum *et al.*, 1992) sono correlati ad un calo delle concentrazioni ematiche di GSH. In questo studio, considerato il numero elevato di aziende diverse da cui sono stati selezionati gli animali, si suppone che l'effetto della dieta sul GSH ematico tenda ad essere mascherato poiché non è stato possibile tenere in considerazione il tipo di alimentazione somministrata. Questo è confermato anche dalla non significatività nella diversità dei valori medi di GSH registrata nella popolazione sana nelle diverse fasi fisiologiche (Fig. 4.2.12.).

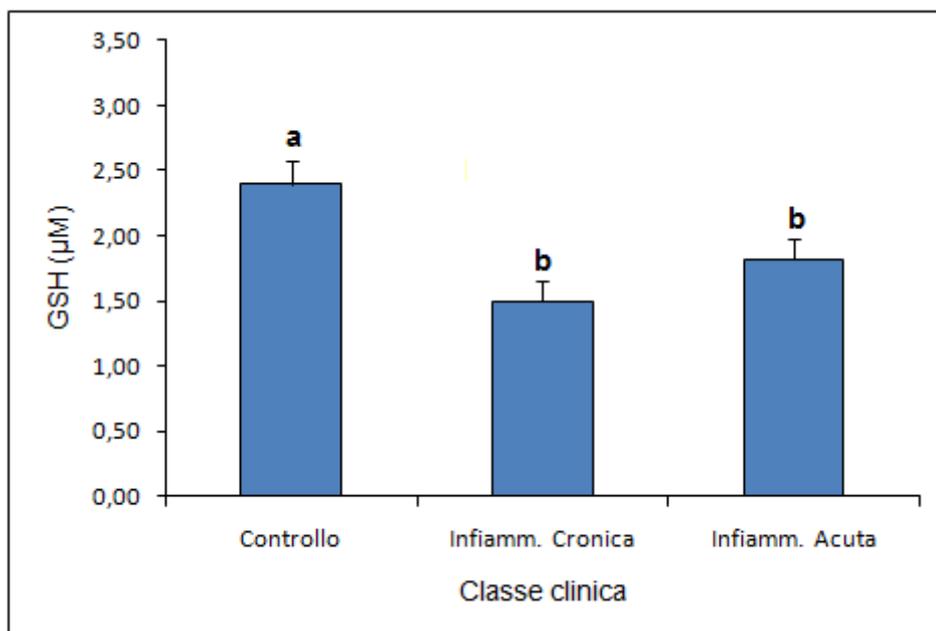


Fig. 4.2.11.: Variazione delle concentrazioni medie di GSH tra i gruppi di animali classificati sulla base dei segni clinici. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,01$)

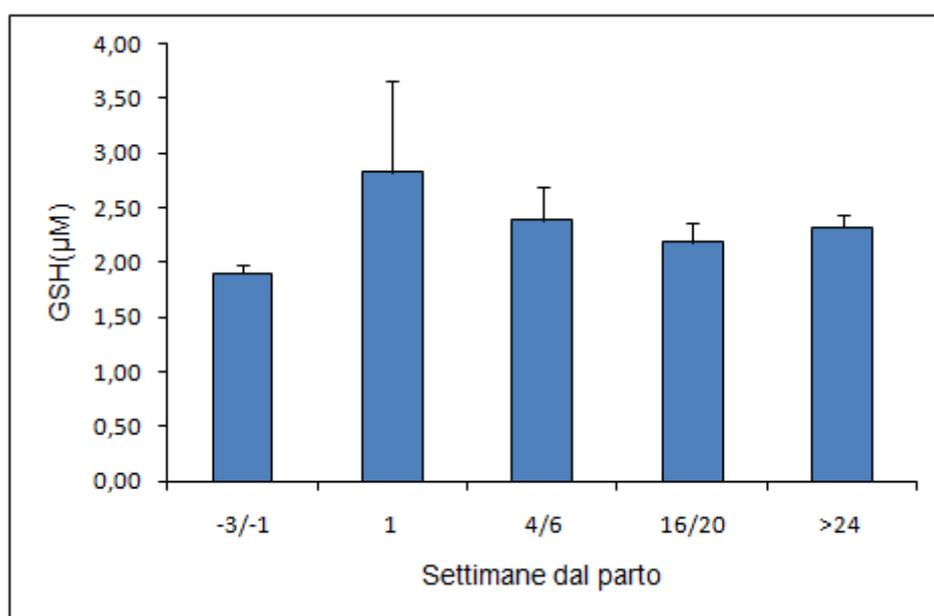


Fig. 4.2.12.: Variazione delle concentrazioni medie di GSH nelle diverse fasi fisiologiche.

Oltre a questo, un calo del GSH è stato dimostrato in diverse condizioni contraddistinte da una situazione di stress ossidativo persistente (White *et al.*, 1994). Questa ipotesi risulta più verosimile in questa indagine. In uno studio di Malmezat *et al.* (2000) è stato evidenziato che animali anoressici sottoposti ad infezione sperimentale, comparati con soggetti sani a parità di alimentazione, mostrano livelli di GSH più elevati in tutti i tessuti tranne che nel sangue; allo stesso modo, dal confronto di questi risultati con quelli di uno studio di Breuillé

et al. (1994), è emerso che le concentrazioni epatiche del GSH tendono ad essere più elevate nei soggetti a digiuno malati piuttosto che in soggetti normalmente alimentati sani, il che evidenzia una maggiore influenza sulle concentrazioni del parametro da parte del processo infiammatorio piuttosto che dell'alimentazione. Si suppone quindi che anche in questo contesto sia l'infiammazione a determinare modificazioni dei livelli di GSH, mascherando ulteriormente eventuali variazioni legate all'alimentazione. Probabilmente, durante il processo infiammatorio e a causa dello stress ossidativo indotto da questo, l'organismo tende a ristabilire l'equilibrio redox incrementando la sintesi del GSH per sopperire alla maggiore richiesta di antiossidanti. Tuttavia il più importante aumento del "consumo" di GSH rispetto alla sua produzione, giustificerebbe i valori ematici più bassi negli animali malati.

I livelli di DHEA assumono invece valore massimo negli animali in fase acuta, intermedio in quelli con infiammazione cronica e minore negli animali clinicamente sani (figura 4.2.13.) Tuttavia esiste una differenza significativa solo tra gli animali con stato infiammatorio acuto e animali di controllo ($P < 0,01$).

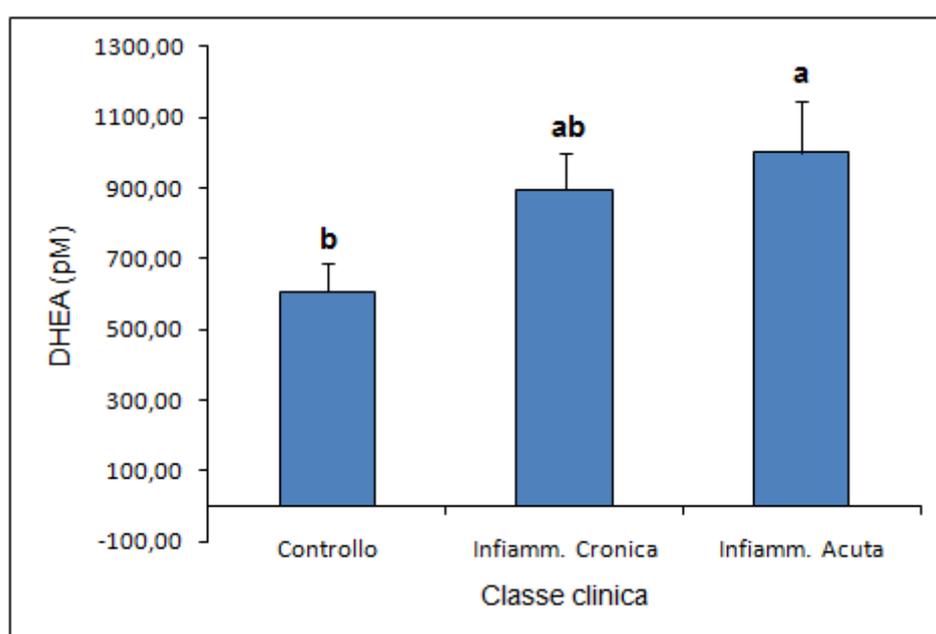


Fig. 4.2.13.: Variazione delle concentrazioni medie di DHEA tra gruppi di animali classificati sulla base dei segni clinici. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,01$)

Poiché la cortisolemia non mostra differenze tra i gruppi, l'andamento del rapporto DHEA/cortisolo risulta molto simile a quello del DHEA stesso. In

questo caso però si riescono ad evidenziare differenze significative ($P < 0,05$) tra gli animali con infiammazione (acuta e cronica) e animali di controllo (figura 4.2.14.).

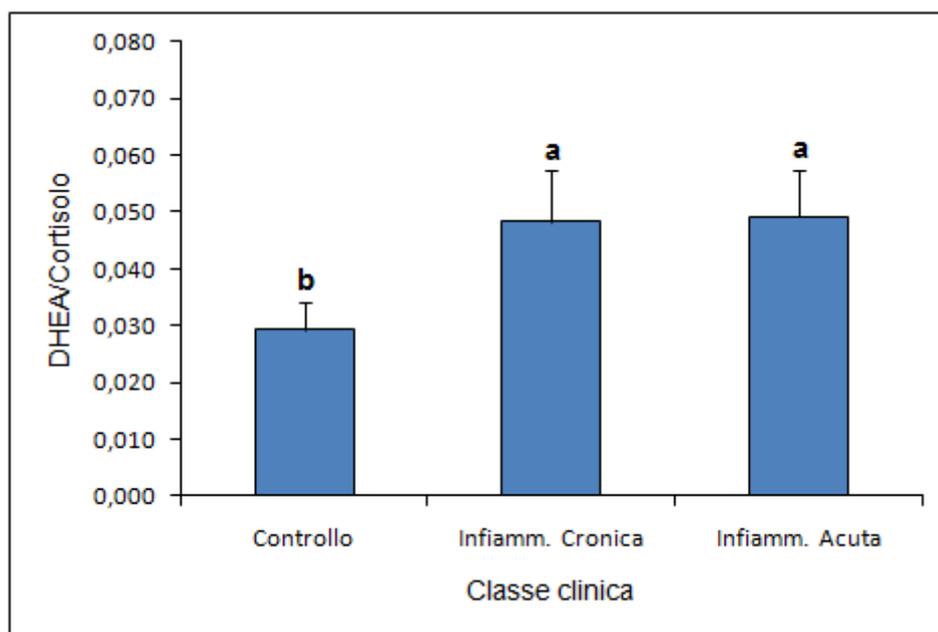


Fig. 4.2.14.: Variazione dei valori medi del rapporto DHEA/cortisolo tra gruppi di animali classificati sulla base dei segni clinici. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,05$)

Questo risultato è in disaccordo con quanto definito in uno studio di Almeida *et al.* (2008), nel quale veniva dimostrato che le concentrazioni seriche del DHEA tendono a diminuire in animali in cui si evidenziano lesioni infiammatorie podali. Nella stessa indagine è stato inoltre calcolato il rapporto cortisolo/DHEA, che evidenziava differenze tendenzialmente significative ($P = 0,06$) tra i due gruppi di animali confrontati (più elevato nei malati). In letteratura, purtroppo, non sono riportate altre indicazioni riguardo alle variazioni di questi parametri nella specie bovina in corso di processo infiammatorio. L'opposto risultato qui presentato, rispetto a quanto ottenuto nello studio citato, potrebbe essere legato alla sostanziale diversità nelle tecniche di campionamento: i soggetti utilizzati nel lavoro indicato sono molto omogenei in termini di età, stadio produttivo e peso vivo. Inoltre gli animali sono stati allevati nell'intero periodo dello studio nello stesso ambiente e sottoposti ad uguale alimentazione, mentre il prelievo è stato effettuato per tutti i soggetti nella mattinata dello stesso giorno. Tutto questo potrebbe rendere non paragonabili i presenti risultati, derivanti da individui provenienti da allevamenti estremamente eterogenei tra loro, con quelli di

Almeida *et al.* (2008). Inoltre i casi dello studio di Almeida e colleghi erano di natura presumibilmente cronica, ma non definita con precisione nella valutazione degli animali. In conclusione, non essendo ancora chiaro quali possano essere le variabili che influenzano la concentrazione di DHEA plasmatico nella specie bovina, a causa della carenza di dati in letteratura, diventa pressoché impossibile definire il motivo di una tale diversità nei risultati dei due studi.

Indagini condotte su altre specie hanno evidenziato che i livelli di DHEA restano inalterati nei ratti a seguito di somministrazione di endotossine (Ghezzi *et al.*, 2000), mentre nel suino con shock circolatorio l'inoculazione di queste ultime causa la diminuzione della concentrazione dello steroide (Schurr *et al.*, 1997). Nei feti di femmine gravide di scimmia rhesus (*Macaca mulatta*), a seguito di infezione streptococcica uterina provocata, è stato invece riscontrato un aumento del DHEA nel sangue fetale (Gravett *et al.*, 1996). Similmente i livelli di questo androgeno tendono ad aumentare nelle fasi iniziali che seguono l'infezione da HIV nell'uomo (Christeff *et al.*, 1997) e nelle ore successive alla somministrazione di endotossine di *Salmonella abortus equi* in pazienti umani, per poi decrescere in quest'ultimo caso nell'arco delle 6-12 ore successive all'inoculazione (Schuld *et al.*, 2000). Questi risultati portano alla conclusione che il rilascio di DHEA tende a diversificarsi nelle varie fasi della risposta immunitaria dei soggetti.

Il motivo dell'andamento dei valori del DHEA e DHEA/cortisolo potrebbe essere giustificato dall'effetto del DHEA sul sistema immunitario, che conduce all'inibizione della secrezione di citochine pro-infiammatorie come il TNF- α e l'IL-6 (Danenberg *et al.*, 1992; Araghi-Niknam *et al.*, 1997; Di Santo *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1998). L'incremento del valore durante il processo infiammatorio potrebbe rappresentare un meccanismo protettivo dell'individuo nei confronti dell'infiammazione stessa. Si mette in evidenza (figura 4.2.8.), infatti, che il valore di IL-6 risultato più basso tra i gruppi considerati appartiene alla sottopopolazione degli animali con infiammazione acuta (sebbene questo valore non sia significativamente diverso dagli altri dal punto di vista statistico), ovvero quella che presenta allo stesso tempo i livelli più elevati di DHEA. Tuttavia i due parametri (DHEA e IL-6) non sono risultati correlati in questo studio (paragrafo 4.2.1.).

Considerato che numerose indagini condotte sull'uomo hanno evidenziato diminuzioni delle concentrazioni del DHEA durante i processi infiammatori cronici (Masi *et al.*, 1984; Deighton *et al.*, 1992; Lahita *et al.*, 1987; Straub *et al.*, 1998; Dillon, 2005) e alla luce di quanto evidenziato nel presente studio e in quello di Almeida *et al.* (2008), si può supporre che l'andamento del DHEA, durante le varie fasi del processo infiammatorio, consista in un iniziale aumento della sua concentrazione nelle prime fasi dell'evento flogistico e un successivo decremento nelle fasi croniche. Si suppone invece che la cortisolemia sia stabile in un primo momento, per poi aumentare con la cronicizzazione del processo, come illustrato in figura 4.2.15. Quest'ultimo effetto non è stato però riscontrato nel presente lavoro. La diversità tra i risultati ottenuti in questo studio e quelli di Almeida *et al.* (2008) potrebbe derivare quindi fondamentalmente dalle diverse fasi infiammatorie durante le quali è stato eseguito il prelievo.

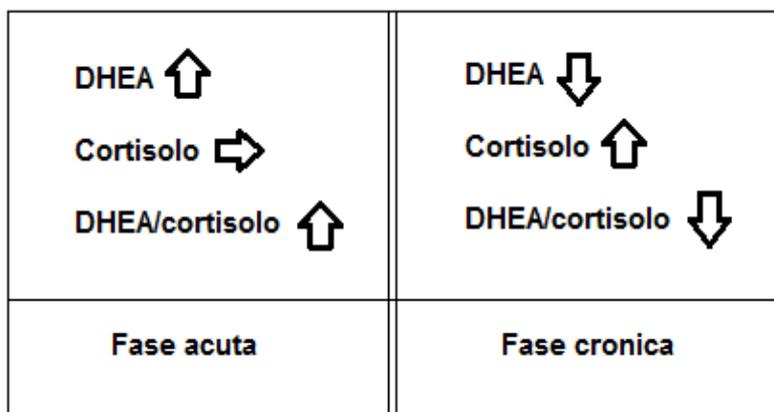


Fig. 4.2.15.: Ipotesi sulle variazioni dei livelli di DHEA e cortisolo durante le diverse fasi infiammatorie

Per quanto riguarda la formula leucocitaria sono stati evidenziati valori più elevati nel numero di linfociti negli animali di controllo, seguiti dagli animali con infiammazione cronica e infine da quelli con infiammazione acuta (figura 4.2.16.). Differenze significative sono riportate tra animali di controllo e animali malati (sia in forma acuta che cronica) ($P < 0,01$).

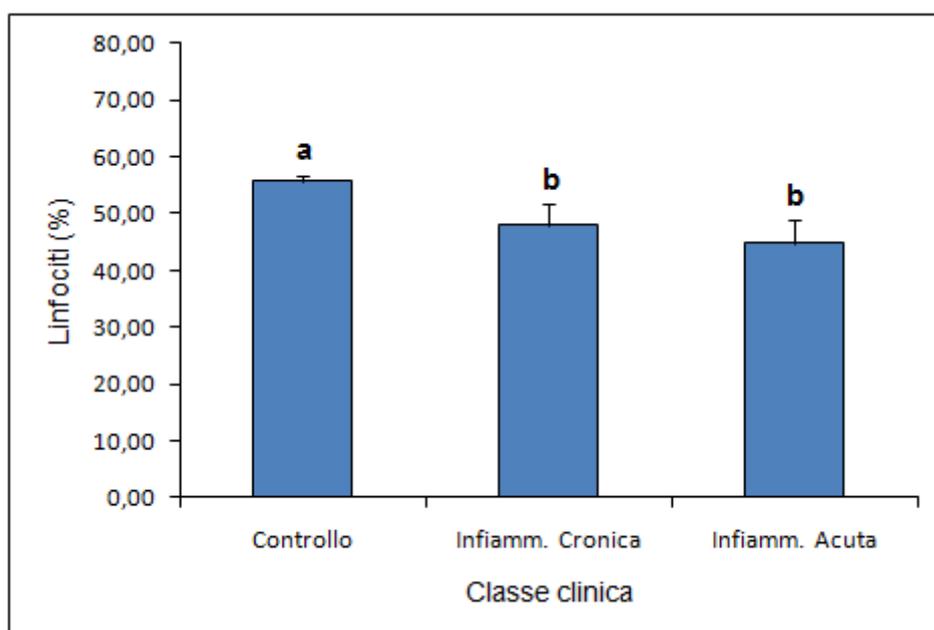


Fig. 4.2.16. Variazione della percentuale di linfociti nella formula leucocitaria tra i gruppi di animali classificati sulla base dei segni clinici. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,01$)

La percentuale fisiologica di linfociti nella specie bovina è definita nell'intervallo 45-75% (Aguggini *et al.*, 1998). La popolazione con processo infiammatorio acuto è l'unica che si discosta (seppur minimamente) da questo intervallo, con un valore medio del 44,73%. Gli altri due gruppi risultano all'interno del range (infiammazione cronica: 47,97%; controllo: 55,76%). Tuttavia nei soggetti malati è stata evidenziata una media significativamente più bassa ($P < 0,05$) rispetto ai sani.

Il rapporto neutrofili/linfociti raggiunge il picco massimo nelle forme infiammatorie acute, intermedio in quelle croniche e minimo negli animali di controllo, comportandosi così in maniera inversa rispetto al numero di linfociti (figura 4.2.17.). Anche in questo caso vengono riportate differenze significative tra gruppo di controllo da una parte e animali con forme infiammatorie acute e croniche dall'altra ($P < 0,05$).

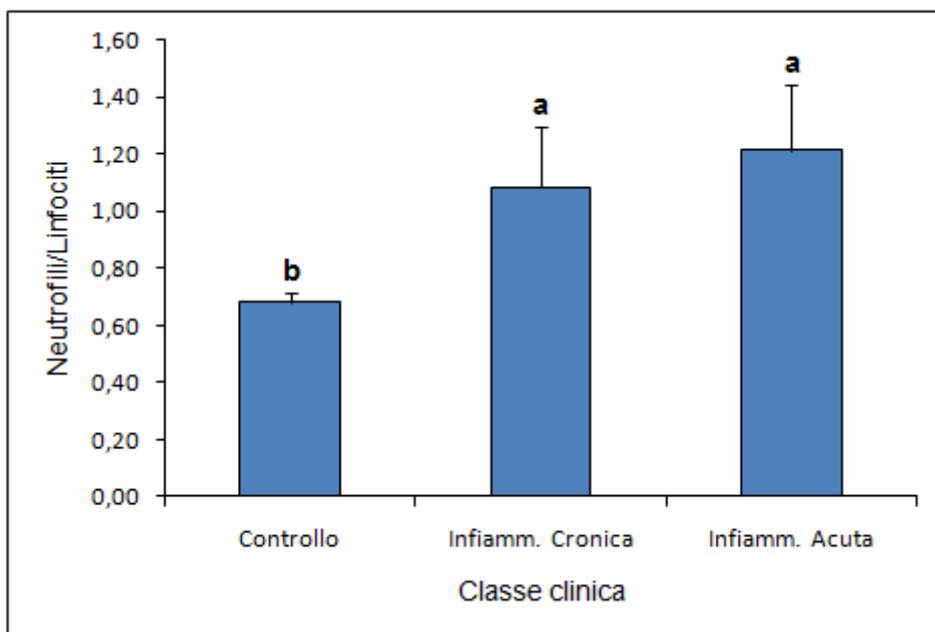


Fig. 4.2.17.: Variazione dei valori medi del rapporto neutrofili/linfociti nella formula leucocitaria tra gruppi di animali classificati sulla base dei segni clinici. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,05$)

Fisiologicamente, nella specie bovina, il numero dei linfociti è più elevato di quello dei neutrofili. Valori superiori a 1 nel rapporto neutrofili/linfociti, riscontrati negli animali con processo infiammatorio (in particolar modo quello acuto), mettono quindi in evidenza la situazione flogistica esistente. Infatti, la forma acuta dell'infiammazione è determinata dall'attivazione neutrofilica, quella cronica da quella linfocitaria, macrofagica e linfoplasmacellulare. Nonostante questo, nella popolazione con infiammazione cronica non è stato evidenziato un aumento della componente linfocitaria, bensì valori ancora elevati di neutrofili, evidenziati dal rapporto neutrofili/linfociti.

Nell'ottica di questo lavoro risulta inevitabile paragonare questi risultati con quelli delle AOPP. In effetti il confronto della figura 4.2.17. con la 4.2.9. rende evidente un andamento sovrapponibile; questa sarebbe un'ulteriore prova a sostegno del fatto che le AOPP, anche nella specie bovina, sono degli indicatori di attivazione neutrofilica. Si può inoltre evidenziare come il rapporto AOPP/proteine totali (figura 4.2.10.) sia in grado di discriminare gli animali con infiammazione acuta da quelli con infiammazione cronica, evento che il solo rapporto neutrofili/linfociti non è stato in grado di mettere in luce. Posto che gli animali con infiammazione acuta ed infiammazione cronica sono stati classificati sulla base della durata dei sintomi, questo indica che il rapporto

neutrofili/linfociti tende a ristabilirsi più lentamente di un normale valore AOPP/proteine ossidate.

Gli altri parametri analizzati in questo studio non hanno mostrato differenze statisticamente significative tra i gruppi considerati.

Il secondo confronto è stato condotto tra il gruppo di animali con valori di aptoglobina inferiori a 0,4 mg/ml (di controllo) e quello con valori superiori a 0,4 mg/ml (con infiammazione acuta) (Huzzey *et al.*, 2009; Skinner *et al.*, 1991).

La variazione dei parametri nei gruppi di bovine classificate sulla base della concentrazione di aptoglobina sono mostrati nella tabella 4.2.3.

| Indicatore ematico | | Gruppo | | P |
|-----------------------------|-----------|----------------|-----------------|-------|
| | | Controllo | Infiamm. Acuta | |
| Aptoglobina | (mg/ml) | 0,08 ± 0,02 | 1,49 ± 0,15 | 0,000 |
| Lisozima | (µg/ml) | 1,56 ± 0,34 | 1,81 ± 0,49 | 0,601 |
| AOPP | (µM) | 37,16 ± 1,57 | 46,83 ± 3,18 | 0,017 |
| AOPP/Prot totali | (nmol/mg) | 0,50 ± 0,02 | 0,61 ± 0,04 | 0,049 |
| MDA | (µM) | 0,32 ± 0,07 | 0,40 ± 0,07 | 0,131 |
| MDA/Prot. Totali | (pmol/mg) | 4,53 ± 1,12 | 5,14 ± 0,79 | 0,131 |
| GSH | (µM) | 2,14 ± 0,17 | 1,87 ± 0,14 | 0,281 |
| DHEA | (pM) | 725,29 ± 74,34 | 832,59 ± 106,83 | 0,263 |
| Cortisolo | (nM) | 25,49 ± 1,49 | 22,14 ± 2,65 | 0,206 |
| DHEA/Cortisolo | | 0,034 ± 0,005 | 0,045 ± 0,007 | 0,044 |
| Interleuchina 6 | (pg/ml) | 563,43 ± 31,38 | 522,44 ± 39,90 | 0,464 |
| Linfociti | (%) | 53,01 ± 1,55 | 48,46 ± 3,19 | 0,241 |
| Gran. Neutrofili | (%) | 39,49 ± 1,62 | 43,12 ± 3,02 | 0,481 |
| Gran. Eosinofili | (%) | 2,68 ± 0,38 | 1,78 ± 0,35 | 0,174 |
| Gran. Basofili | (%) | 0,86 ± 0,13 | 0,60 ± 0,20 | 0,187 |
| Monociti | (%) | 3,96 ± 0,53 | 6,04 ± 1,24 | 0,198 |
| Neutrofili/Linfociti | | 0,81 ± 0,08 | 1,05 ± 0,16 | 0,361 |

Tab. 4.2.3.: Variazione dei parametri ematici tra gruppi di animali classificati in relazione ai valori ematici di aptoglobina (cutoff 0,4 mg/ml). Vengono evidenziati i parametri che differiscono tra i gruppi in modo significativo e che sono stati citati nel testo.

Tra gli animali di controllo sono stati esclusi gli animali che si trovavano nelle 3 settimane che precedono il parto (gruppo -3/-1). Il motivo di tale scelta è la differenza sostanziale di alcuni valori (in particolare del DHEA e DHEA/Cortisolo) evidenziata nei risultati precedenti (paragrafo 4.2.2) e

l'assenza tra gli animali malati di soggetti in questa fase produttiva. Allo scopo di confrontare gruppi omogenei, anche le manze non sono state tenute in considerazione tra gli animali di controllo per i motivi di cui si è già accennato (paragrafo 4.2.2.).

I risultati evidenziano che esiste una differenza significativa tra i due gruppi ($P < 0,001$) nei valori dell'aptoglobina. La concentrazione media nel gruppo di controllo è risultata essere particolarmente bassa (0,08 mg/ml) nonostante il cutoff sia stato definito ad un valore ben al di sopra di questo (0,4 mg/ml): questo suggerisce che la maggior parte della popolazione sana ha livelli ematici di aptoglobina prossimi a 0. Questo si sovrappone a quanto rilevato in diversi studi (Makimura and Suzuki, 1982; Conner *et al.*, 1986; Eckersall and Conner, 1988). Il valore medio riscontrato negli animali con infiammazione acuta risulta oltre 18 volte più elevato di quello di controllo; tuttavia questa sottopopolazione ha manifestato una distribuzione più omogenea. Anche in questa situazione non si riscontrano invece variazioni significative del valore di IL-6.

Le AOPP presentano variazioni significative tra i due gruppi, evidenziando valori più bassi negli animali di controllo (media 37,16 μM) rispetto a quelli con infiammazione acuta (media 46,83 μM) ($P < 0,05$). Stesso risultato si manifesta nella valutazione delle AOPP in rapporto alle proteine totali, dove i due valori sono rispettivamente 0,50 nmol/mg e 0,61 nmol/mg ($P < 0,05$). Anche in questo caso si può concludere quanto già visto nel paragrafo precedente riguardo questi parametri.

Anche il rapporto DHEA/Cortisolo risulta diverso nei due gruppi in modo statisticamente significativo ($P < 0,05$): negli animali di controllo il valore medio è più basso rispetto agli animali con infiammazione acuta. Al contrario della classificazione clinica, in questo caso non sono invece evidenziabili differenze nelle concentrazioni di DHEA tra i due gruppi. Va tenuto in considerazione che, in questa classificazione, 9 dei 12 animali che presentavano una situazione clinica di infiammazione cronica sono risultati nel gruppo di controllo; questo è facilmente spiegabile dal fatto che, essendo l'aptoglobina una proteina di fase acuta positiva, essa tende ad aumentare durante il processo infiammatorio acuto e tornare a valori basali nella fase cronica. Il motivo dei livelli elevati di

aptoglobina negli altri 3 animali è invece giustificabile dalla riacutizzazione o peggioramento del processo in atto, come illustrato nel paragrafo 4.2.4. L'aumento dei livelli del rapporto DHEA/cortisolo potrebbe quindi, anche in questo caso, suggerire un tentativo da parte dell'organismo di regolare il processo infiammatorio stesso nelle prime fasi della reazione. Anche in questa analisi il valore di IL-6, seppur non significativamente, risulta effettivamente più basso nel gruppo di animali che presenta valori di DHEA/cortisolo più elevati.

4.3. TEST ELISA ED ANALISI ANTICORPALE VERSO LE PROTEINE OSSIDATE

L'ultimo aspetto della ricerca ha tentato di evidenziare la presenza di autoanticorpi verso proteine ossidate nel siero bovino, e l'eventuale relazione tra la presenza di autoanticorpi e livelli plasmatici di AOPP.

E' stato messo a punto un test ELISA per l'identificazione di autoanticorpi sierici in grado di riconoscere forme ossidate di BSA (AOPP-BSA), prodotta "in vitro" (paragrafo 3.3.1.).

4.3.1. PREPARAZIONE DELLO STANDARD

L'ossidazione della BSA ad AOPP-BSA è stata eseguita con concentrazioni scalari di HOCl da 0 a 48 mM. Successivamente sono state quantificate le AOPP per confermarne la clorinazione operata dell'acido ipocloroso. Come si osserva dalla figura 4.3.1. si ha un brusco aumento delle AOPP in corrispondenza dell'ossidazione con 24 mM di acido.

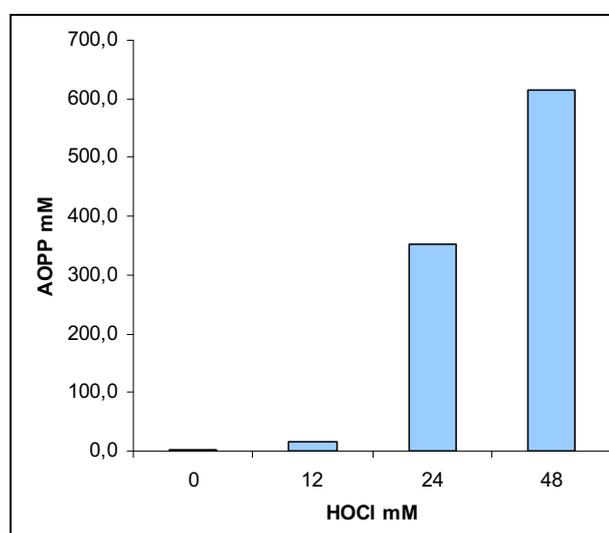


Fig. 4.3.1.: Quantificazione delle AOPP in soluzioni standard di BSA 15 mg/ml dopo esposizione a concentrazioni crescenti di acido ipocloroso (HOCl).

Per verificare l'eventuale frammentazione della proteina stessa dovuta all'azione di clorinazione dell'acido ipocloroso si è ritenuto opportuno eseguire una corsa elettroforetica SDS-PAGE 10% in condizioni riducenti.

I gel così ottenuti sono stati processati sia per la colorazione con comassie brilliant blu sia per il trasferimento su nitrocellulosa e relativo IMB per l'identificazione dei contenuti di carbonili.

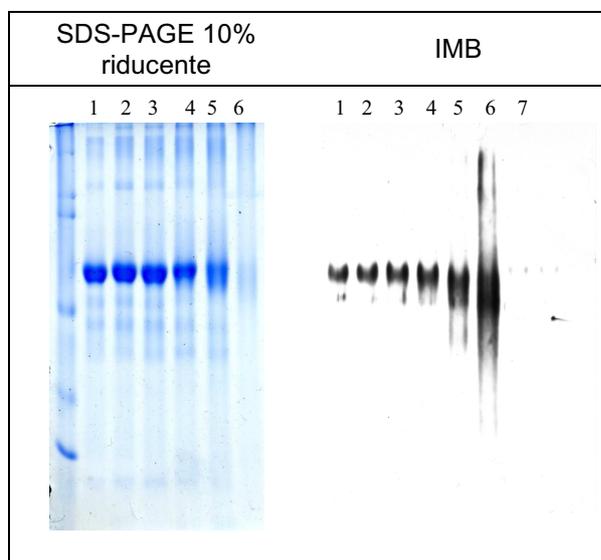


Fig. 4.3.2.: SDS-PAGE 10% di BSA 0.5 μ g ed IMB 0.2 μ g di proteina ossidata.
lane 1-6 ossidazione con 0, 3, 6, 12, 24, 48 mM di HOCl
lane 7 ctrl IMB non derivatizzato

Come si nota in figura 4.3.2. la degradazione proteica inizia essere sensibile ad una concentrazione molare di HOCl pari a 24 mM (*lane 5*). Da quanto è emerso si è deciso di utilizzare come standard l'AOPP-BSA ossidata con 12 mM di HOCl (*lane 4*).

4.3.2. TITOLO ANTICORPALE O TEST DI DILUIZIONE

L'obiettivo di tale test è verificare che a diluizioni seriali del siero in esame con siero fatale bovino (paragrafo 3.3.3.) corrisponda una proporzionale riduzione della concentrazione degli anticorpi presenti nel campione.

Nei sieri presi in esame con un valore di AOPP basso, medio ed alto, rispettivamente 19.72, 30.43, 33.66 μ M non si è evidenziata una presenza di interferenti dovuta a legami aspecifici tra proteine sieriche ed anticorpi contro AOPP-BSA., infatti all'aumentare della diluizione si ha una progressiva riduzione del segnale fino alla sua completa estinzione (fig. 4.3.3.).

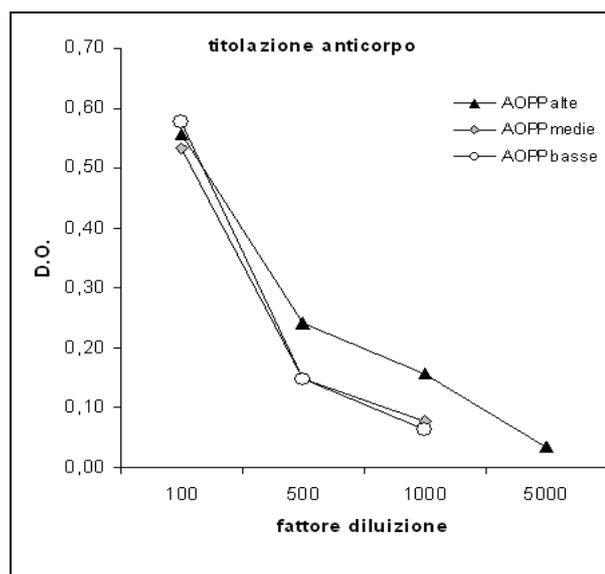


Fig. 4.3.3.: Curva di diluizione del siero dopo diluizione seriale con sierofetale bovino.

4.3.3. TEST DI RIPETIBILITA'

La valutazione della riproducibilità del sistema è stata calcolata analizzando la ripetibilità dei campioni di controllo che, comunemente si ritiene non debba superare il 10% all'interno della stessa piastra (intra-assay) o il 20% per campioni di controllo in piastre diverse (inter-assay).

I risultati del test sono mostrati in tabella 4.3. 1.

| | D.O. | CV% intra-assay | CV% Inter-assay |
|--------|---------------|--------------------|--------------------|
| CTRL 1 | 0.509+/-0.094 | 5.32 | 18.51 |
| CTRL 2 | 0.447+/-0.098 | 5.74 | 21.95 |

Tab. 4.3.1.: Assorbanza media +/- dev.st. di campioni di controllo e relativo coefficiente di variabilità intra- ed inter-assay

Come si può osservare il CV% inter-assay presenta valori più elevati rispetto alle condizioni ottimali e sicuramente è necessario standardizzare alcuni step della metodica.

4.3.4. SPECIFICITA' DEL SEGNALE

Per verificare la specificità dell'anticorpo verso la forma ossidata della BSA, ai sieri oggetto del test sono state aggiunte concentrazioni crescenti di AOPP-BSA (paragrafo 3.3.3.). In questo modo, all'aumentare della concentrazione di AOPP-BSA aggiunta, una minore quantità di anticorpo si sarebbe dovuta legare alla AOPP-BSA adesa al pozzetto della piastra ELISA, con una conseguente riduzione dell'assorbanza.

Tuttavia, come si osserva in figura 4.3.4. il segnale analitico è risultato stabile in tutti i campioni di siero bovino.

Perciò la specificità del segnale è stata valutata anche mediante IMB (figura 4.3.5.)

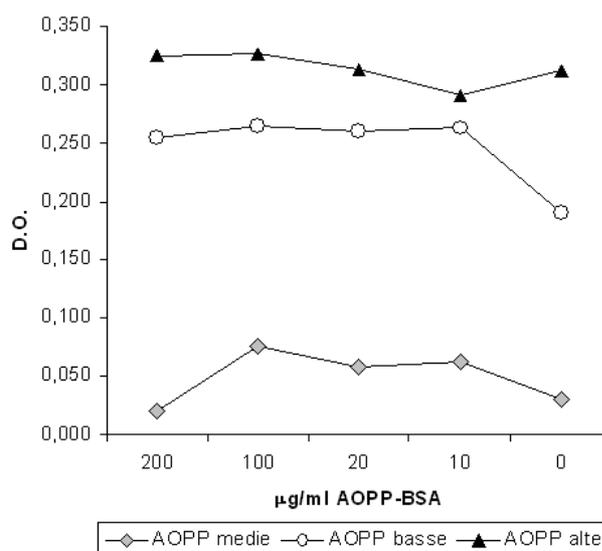


Fig. 4.3.4.: Curva di estinzione del segnale dell'anticorpo sierico addizionato con concentrazioni crescenti di antigene ossidato

Si è eseguita una corsa elettroforetica SDS-PAGE 10% di BSA ossidata a concentrazioni scalari di HOCl, dopo trasferimento su nitrocellulosa si è eseguito l'IMB utilizzando il siero bovino degli animali utilizzati in precedenza e diluizioni 1:50.

Nonostante il segnale molto debole si è potuto identificare il legame specifico tra anticorpo sierico ed AOPP-BSA che mostra un leggero aumento del legame con l'aumentare dell'ossidazione dell'antigene.

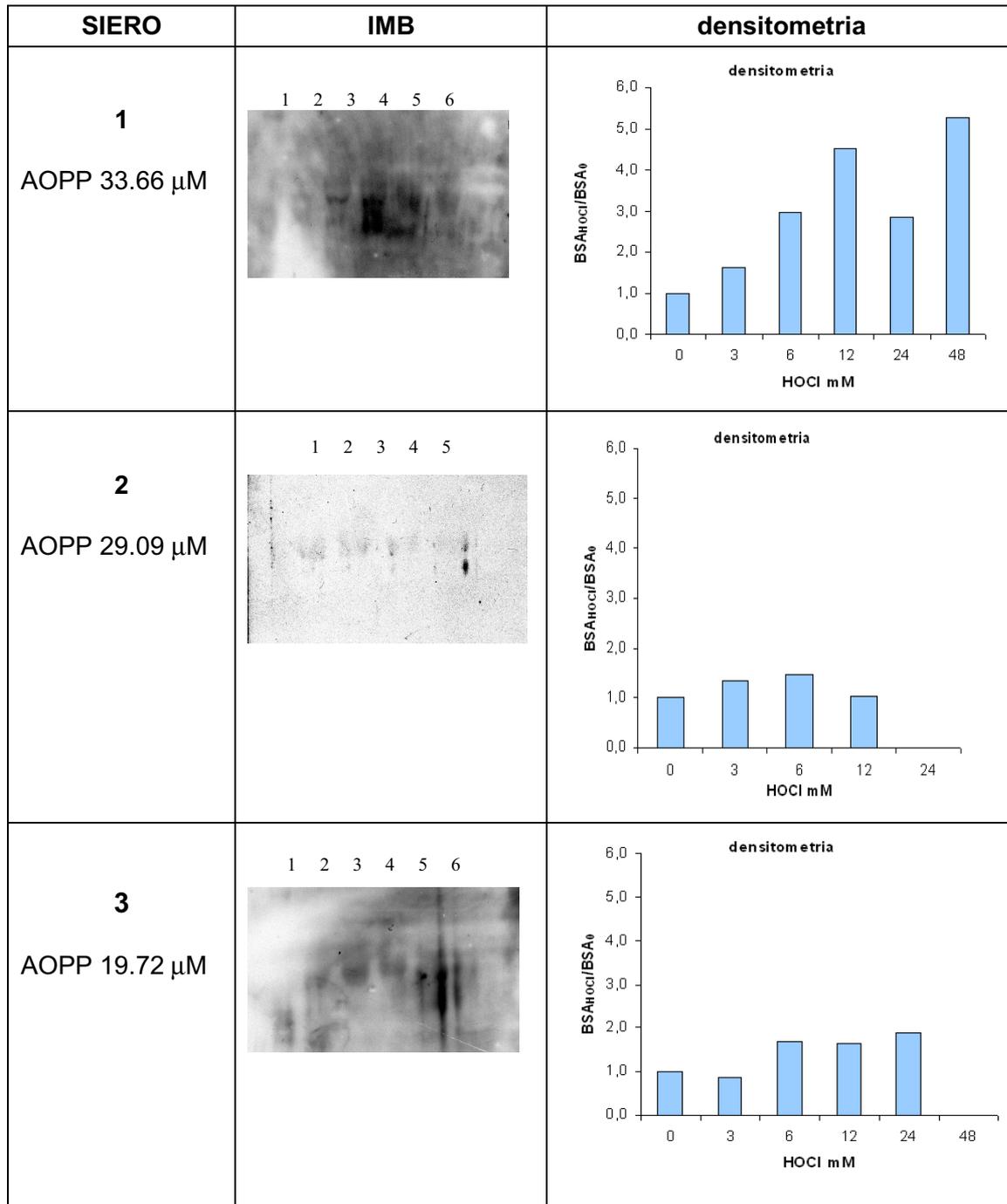


Fig. 4.3.5: IMB e relativa densitometria espressa come rapporto delle unità densitometriche della banda a 66 kDa rispetto al suo valore basale (BSA 0 mM di HOCl).
Lane 1-6: 2.5 $\mu\text{g/lane}$ di BSA ossidata con HOCl 0, 3, 6, 12, 24, 48 mM

Il test ELISA, sebbene non completamente validato, è stato eseguito utilizzando campioni di siero per valutare la possibile presenza di autoanticorpi.

La valutazione dei risultati ottenuti è stata eseguita confrontando i gruppi di bovine classificate sulla base della concentrazione di aptoglobina in animali di controllo ed animali con infiammazione acuta (paragrafo 3.2.14.)

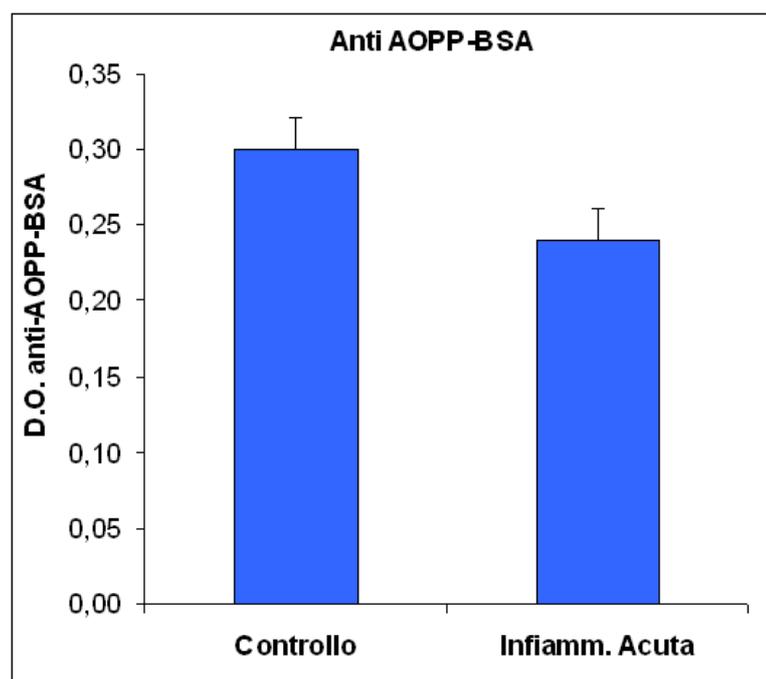


Fig. 4.3.6.: Analisi degli anticorpi anti-AOPP-BSA tra popolazione di animali di controllo e popolazione di animali in fase acuta classificati in base ai valori di aptoglobina. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. (P=0,052)

In realtà come si può osservare dalla figura 4.3.6. le differenze tra i due gruppi non possono essere considerate significative, ma il valore di $P=0,052$ è prossimo a quello della significatività statistica.

L'ipotesi iniziale che aveva spinto lo studio verso il saggio immunologico era la possibile correlazione tra AOPP e anticorpi anti AOPP-BSA. Infatti, come è noto, le modificazioni strutturali operate dai ROS alle proteine determinano la formazione di nuovi epitopi (paragrafo 2.1.3.) che conferiscono nuove proprietà antigeniche in grado di determinare la produzione di anticorpi (Palinski, 1989; Palinski, 1995; Marsche, 2002). Pertanto le proteine così modificate possono manifestare attività pro-infiammatoria (Kalousova, 2005; Shi, 2008) innescando la produzione di auto-anticorpi (Shanti, 1999; Palinski, 2000; Kurien, 2006).

Viceversa, come si osserva in tabella 4.3.2 non c'è nessuna correlazione tra le AOPP e gli anticorpi ad esse associati, ma risulta una correlazione negativa con la MDA ($r = -0.431$; $p < 0.001$).

| Indicatore ematico | R | P |
|--------------------|--------|-------|
| PT | -0,051 | 0,690 |
| GSH | -0,175 | 0,170 |
| AOPP | -0,084 | 0,515 |
| AOPP/PT | -0,061 | 0,635 |
| MDA | -0,431 | 0,001 |
| MDA/ PT | -0,416 | 0,001 |
| DHEA | 0,220 | 0,084 |
| C | -0,298 | 0,018 |
| DHEA/C | 0,284 | 0,024 |
| LISOZIMA | -0,222 | 0,099 |
| IL6 | -0,055 | 0,678 |
| APTOGLOBINA | -0,276 | 0,032 |
| LINFOCITI | 0,097 | 0,447 |
| NEUTROFILI | -0,073 | 0,569 |
| EOSINOFILI | -0,016 | 0,899 |
| BASOFILI | -0,062 | 0,632 |
| MONOCITI | -0,047 | 0,714 |
| N_L | -0,143 | 0,263 |

Tab. 4.3.2.: Coefficiente di correlazione tra il titolo anticorpale degli Ab-anti AOPP-BSA e alcuni indicatori ematici.

R: indice di correlazione; P: significatività statistica; PT: proteine totali; AOPP/PT: AOPP/proteine totali; MDA: malondialdeide; MDA/PT: malondialdeide/proteine totali; C: cortisolo; DHEA/C: DHEA/cortisolo

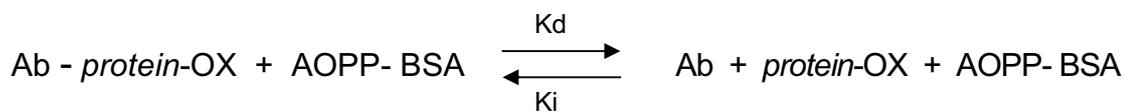
Pertanto la concentrazione media più bassa di anticorpi rilevata negli animali con infiammazione acuta potrebbe indicare che gli anticorpi tendono a legarsi a proteine legate alla malondialdeide (*protein*-MDA) determinando una diminuzione della forma libera titolabile nel torrente circolatorio, come anche ipotizzato da Palinski *et al.* (1996). Questo potrebbe spiegare, in parte, la mancata riduzione del segnale anticorpale dopo l'aggiunta di antigene ossidato (AOPP-BSA) (paragrafo 4.3.4.).

Un'altra ipotesi sul fatto che le AOPP non correlino con la produzione di anticorpo potrebbe essere il fatto che la mieloperossidasi è in grado di convertire L-serina a glicolaldeide, che media la formazione di carbossi-metil-lisina, definita come un prodotto di glicazione delle proteine (AGE).

Come già accennato nel paragrafo 2.2. gli *advanced glycation end products* (AGEs) introducono nuove strutture antigeniche tra le quali la più rappresenta è la N-epsilon-(carbossimetil)-lisina (Shi *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2009) che è in grado di indurre la formazione di autoanticorpi (Palinski *et al.*, 1995; Reaven *et al.*, 1997). Recenti studi hanno dimostrato che la glicosilazione delle IgG su pazienti affetti da diabete è correlata con un'alterata fissazione del complemento e con cambiamenti dell'immunoreattività e del legame antigene

anticorpo (Goodarzi *et al.*, 2004). Va comunque tenuto presente che la misurazione del livello di anticorpi sintetizzati nei confronti dei prodotti dell'ossidazione può essere fuorviante. Infatti ad un aumento delle attività che inducono la formazione di lipoproteine ossidate, ci si potrebbe aspettare un aumento degli anticorpi circolanti: in realtà questo non è sempre vero poiché gli antigeni così formati legano la quota di anticorpi liberi, che quindi risultano paradossalmente ridotti (Itabe *et al.*, 1996; Palinski *et al.*, 1996; Holvoet and Collen, 1997).

Dall'equilibrio chimico



Si può concludere che la maggiore affinità dell'anticorpo sierico verso le *protein-MDA* o *AGE-protein* rispetto all'AOPP-BSA potrebbe impedire la dissociazione dell'anticorpo da questo complesso a causa della bassa affinità molto. Da questo consegue che il segnale rilevato tramite il saggio ELISA è determinato dalla sola forma libera dell'anticorpo che è presente nel siero e che quindi risulta titolabile.

Queste ipotesi sono comunque molto precoci vista la scarsa quantità di dati a disposizione e la necessità di mettere a punto un sistema di quantificazione sia della malondialdeide che degli AGE.

5. CONCLUSIONI

Conclusioni

5.1. AOPP (*Advanced Oxidation Protein Products*): ANALISI BIOCHIMICHE E SPETROFOTOMETRICHE

Dalle analisi condotte si può concludere che le AOPP sono prodotte per ossidazione diretta delle proteine plasmatiche con gli ossidanti clorurati (HOCl) e che il loro aumento è proporzionale al contenuto di carbonili (PCO) determinati tramite derivatizzazione sia in fase liquida che tramite immunoblotting. Viceversa la perossidazione con Cum-OOH non induce un innalzamento delle AOPP ma solo un lieve aumento dei carbonili totali (figura 5.1.1.)

| | OCI [•] | -OOH |
|------|------------------|------|
| AOPP | ↑ | |
| PCO | ↑ | ↑ |

Figura 5.1.1.: azione dell'ossidante sulla formazione di AOPP e PCO.

Mediante Western Blotting si può osservare che l'aumento del contenuto in carbonili è proporzionale alla concentrazione di ossidante e la forma proteica che meglio sopporta l'ossidazione è la BSA. Questa, considerata un antiossidante endogeno particolarmente efficace, subisce l'attacco del HOCl aumentando il contenuto in carbonili senza subire frammentazione della struttura. Inoltre, porta alla formazione di macrocomplessi ad elevato peso molecolare (dovuti a cross-linking o formazione di dimeri di tirosine) che potrebbero indurre la formazione di nuovi epitopi determinando una risposta immunitaria. Da qui ne consegue che le AOPP sono formate per la maggior parte da albumina, e sono prodotte in seguito ad ossidazioni dirette da parte del HOCl di origine mieloperossidasi.

Come accennato nel paragrafo 4.3.4., l'enzima può anche convertire L-serina a glicolaldeide, che è alla base della formazione degli AGE. Infatti, in pazienti affetti da patologie renali croniche ma non diabetici si è osservato un innalzamento degli AGE che è correlato con un aumento delle AOPP (Witko-Sarsat *et al.* 1998).

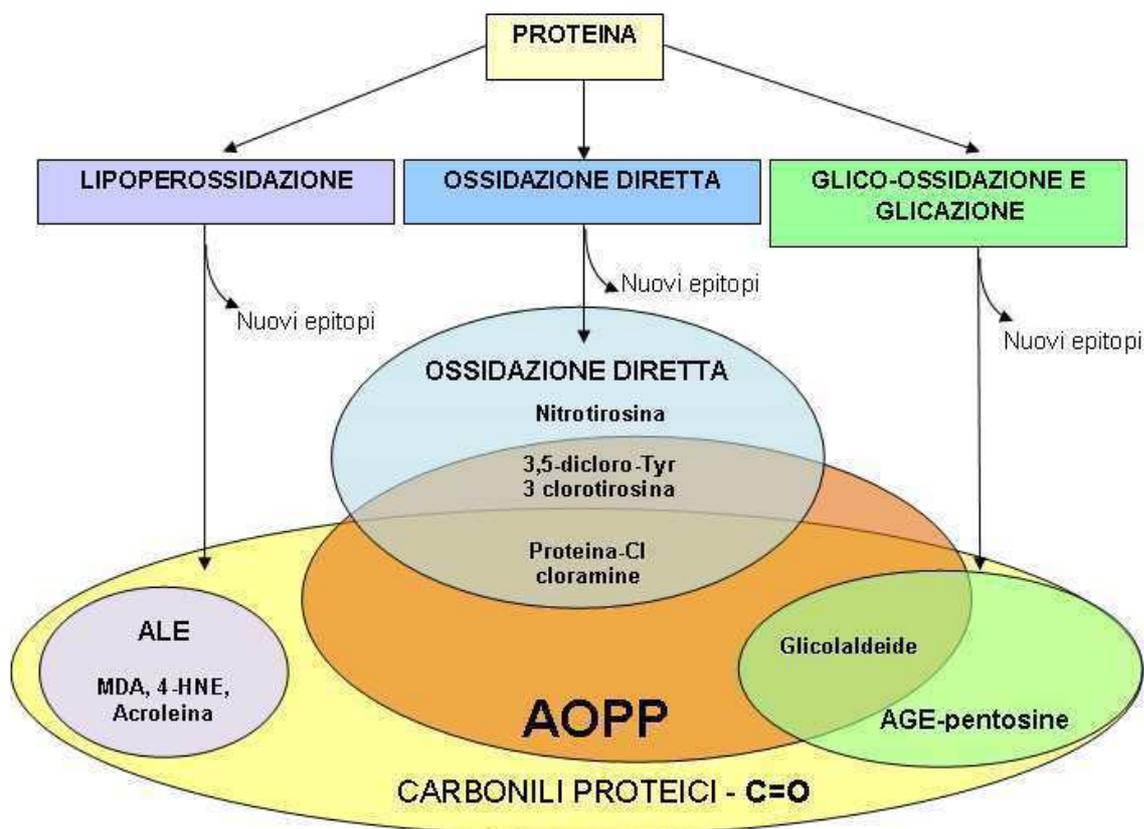


Fig. 5.1.2.: Tre possibili vie di ossidazione delle proteine con conseguente introduzione di gruppi carbonilici, ed AOPP

Pertanto, richiamando la figura 2.1. si può concludere che le AOPP comprendano un insieme particolarmente eterogeneo di strutture proteiche ossidate (figura 5.1.2.) e si può comprendere come la loro caratterizzazione risulti complessa. Da quanto si evince in letteratura e da quanto è emerso in questo lavoro del gruppo delle AOPP fanno parte proteine ossidate che si formano in seguito alla reazione diretta con prodotti di origine infiammatoria (a partire dal sistema MPO/HOCl figura 2.2.) che determinano la formazione di cloramine, diclorotirosine e glicolaldeidi (precursori degli AGE-pentosidine). Sono escluse le nitrotirosine (che si formano in seguito alla reazione diretta di un monossido di azoto di origine endoteliale ed infiammatoria) e le reazioni di lipoperossidazione che portano alla formazione di ALEs (*Advanced Lipoperoxidation End Products*).

Rimane ancora molto da chiarire sulla natura biochimica delle AOPP, pertanto l'obiettivo futuro potrebbe essere quello di analizzare e quantificare la 3,5-dicloro-tirosina o gli AGE-pentosidine tramite fluorescenza per comprendere meglio la natura biochimica di questi composti.

5.2. MONITORAGGIO DELLE AOPP NEL POST PARTO E NEL PROCESSO INFIAMMATORIO NELLA BOVINA DA LATTE.

Nella seconda parte della tesi i risultati supportano l'ipotesi che, anche nella bovina, le AOPP siano prodotti dell'attivazione dei neutrofili e, come tali, indicatori di processo infiammatorio acuto. Il loro confronto con l'aptoglobina fa supporre che esse non risentano delle influenze alle quali questa proteina di fase acuta risulta sensibile (ad esempio: stress, parto) e che quindi possano rappresentare un indicatore più specifico di stress ossidativo dovuto ad infiammazione acuta. Inoltre, al contrario di altri parametri di stress ossidativo, esse non subiscono fluttuazioni significative nei vari stadi produttivi nella bovina da latte: ciò permetterebbe un confronto tra le concentrazioni ematiche nei vari soggetti indipendentemente dalla conoscenza della fase fisiologica in cui si trovano gli stessi.

Infine, i risultati emersi da questo lavoro confermerebbero l'ipotesi secondo la quale il motivo dell'aumento delle AOPP negli animali che manifestano riassorbimento embrionale, osservato da Celi *et al.* (2010), sia probabilmente da imputare a processi infiammatori acuti presenti in forma subclinica.

Le AOPP potrebbero quindi rappresentare un parametro da sfruttare per l'identificazione e la valutazione dei processi flogistici acuti presenti nelle prime fasi della gravidanza, che potrebbero portare a riassorbimento embrionale. In tale contesto diverrebbe indispensabile la determinazione di un livello soglia di AOPP, oltre al quale ipotizzare un processo infiammatorio in atto.

Resta invece da valutare il ruolo del DHEA in ambito sia fisiologico che patologico. Il suo aumento nelle prime fasi del processo infiammatorio, riscontrato in questo studio, fa ipotizzare che esso possa assumere un ruolo protettivo nei confronti dell'organismo, intervenendo nei primi stadi del processo flogistico allo scopo di regolare e coordinare la risposta immunitaria. Tuttavia, la scarsità e la diversità dei dati presenti in letteratura testimoniano la complessità dell'attività e del metabolismo di quest'ormone.

5.3. TEST ELISA ED ANALISI ANTICORPALE VERSO LE PROTEINE OSSIDATE

Nella terza ed ultima parte di questo lavoro, si è posta un'attenzione particolare sull'ipotesi che le AOPP possano perpetuare o aggravare il processo infiammatorio tramite la produzione di autoanticorpi, soprattutto visti i risvolti che ciò potrebbe avere nella prevenzione dell'insorgenza o della perpetuazione di patologie legate allo stress ossidativo.

Dai risultati ottenuti, il titolo anticorpale è indipendente dalla concentrazione delle AOPP, ma risulta invece interessante la correlazione negativa tra anticorpi anti AOPP-BSA e malondialdeide: ciò potrebbe derivare dalla tecnica di dosaggio di quest'ultimo indicatore, che rileva sia la forma libera della MDA, sia la forma legata alle proteine. Gli anticorpi riconoscerebbero quindi epitopi che potrebbero essere definiti come MDA-BSA o MDA-proteine presenti nei sieri, formando legami più stabili di quelli che si vengono a costituire tra gli stessi Ab e le AOPP-BSA usata come standard. In questo modo, si spiegherebbe il titolo anticorpale più basso nei soggetti in cui la MDA è più elevata.

In realtà pochi studi sono stati eseguiti sulla produzione di anticorpi ad opera delle AOPP. Malle *et al.* (1997) utilizzarono le LDL modificate con HCIO (Marsche *et al.*, 2002) per produrre anticorpi utilizzati poi in studi di immunostochimica su lesioni aterosclerotiche umane e nelle malattie infiammatorie degenerative renali.

Come già accennato nel paragrafo 4.3.4. la mieloperossidasi può convertire L-serina a glicolaldeide, che media la formazione di carbossi-metil-lisina, definita come un prodotto di glicazione delle proteine (AGE). Infatti Witko-Sarsat *et al.* (1998) nella produzione *in vitro* di AOPP-HSA non hanno identificato la presenza di AGE-pentosidine, viceversa nella produzione di AGE-HSA hanno rilevato una significativa formazione di AOPP. Come già noto gli advanced glycation-end products (AGEs) introducono nuove strutture antigeniche tra le quali la più rappresenta è la N-epsilon-(carbossimetil)-lisina (Shi *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2009) che è in grado di indurre la formazione di autoanticorpi (Palinski *et al.*, 1995; Reaven *et al.*, 1997). Recenti studi hanno dimostrato che la glicosilazione delle IgG su pazienti affetti da diabete è correlata con un'alterata

fissazione del complemento e con cambiamenti dell'immunoreattività e del legame antigene anticorpo (Goodarzi *et al.*, 2004).

Pertanto l'obiettivo futuro potrebbe essere duplice:

- produrre uno standard *in vitro* per valutare la presenza di anticorpi anti-MDA-BSA e determinare una possibile correlazione con la produzione di auto-anticorpi che confermerebbero un coinvolgimento dello stress ossidativo nella perpetuazione del processo infiammatorio.
- analizzare e quantificare gli AGE a livello plasmatico, vista la loro produzione a partire dal sistema MPO/HOCl, e produrre uno standard *in vitro* per la stima del titolo anticorpale.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abe Y, Watanabe Y, Kimura S**, 1994. The role of tumor necrosis factor receptors in cell signaling and significance of soluble form levels in the serum. *Surgery today*. **24**: 197-202.
- Abo A, Webb MR, Grogan A, Segal AW**, 1994. Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *The biochemical journal*. **298**: 585-591.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma RK**, 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology*. **3**:28.
- Aggarwal BB**, 2000. Tumor necrosis factors receptor associated signaling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF- κ B. *Annals of the rheumatic diseases*. **59** (suppl 1): i6-16.
- Aguggini G, Beghelli V, Clement MG, d'Angelo A, Debenedetti A, Facello C, Giulio LF, Guglielmino R, Lucaroni A, Maffeo G, Marongiu A, Naitana S, Nuvoli P, Piazza R**, 1998. *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia*. UTET, Torino.
- Akbar AN, Lord JM, Salmon M**, 2000. IFN- α and IFN- β : a link between immune memory and chronic inflammation. *Immunology today*. **21**: 337-342.
- Akbar AN, Salmon M**, 1997. Cellular environments and apoptosis: tissue microenvironments control activated T cell death. *Immunology today*. **18**. 72-76.
- Alban L, Lawson LG, Agger JF**, 1995. Foul in the foot (interdigital necrobacillosis) in Danish dairy cows-frequency and possible risk factors. *Preventive veterinary medicine*. **24**: 73-82.
- Almeida PE, Weber PS, Burton JL, Zanella AJ**, 2008. Depressed DHEA, and increased sickness response behaviours in lame dairy cows with inflammatory foot lesions. *Domestic animal endocrinology*. **34**: 89-99.
- Alsemgeest SPM, Kalsbeek HC, Wensing T, Koeman JP, van Ederen AM, Gruys E**, 1994. Concentrations of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (Hp) as parameters of inflammatory diseases in cattle. *The veterinary quarterly* **16**: 21-23.
- Alvarez B, Radi R**, 2003. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino acids*. **25**: 295-311.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM**, 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. **90**: 7915-7922.
- Anderson ME**, 1997. Glutathione and glutathione delivery compounds. *Advances in pharmacology*. **38**: 65-78.
- Andersson L, Bergman A**, 1980. Pathology of bovine laminitis especially as regards vascular lesions. *Acta veterinaria scandinavica*. **21**: 559-566.
- Andus T, Klebl F, Rogler G, Schölmerich J, Straub RH**, 2000. Successful treatment of refractory ulcerative colitis with dehydroepiandrosterone (DHEA)-an open controlled pilot trial. *Gastroenterology*. **188**: A116.
- Araghi-Niknam M, Zhang Z, Jiang S, Call O, Eskelson CD, Watson RR**, 1997. Cytokine dysregulation and increased oxidation is prevented by dehydroepiandrosterone in mice infected with murine leukemia retrovirus. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*. **216**: 386-391.

- Aragno M, Brignardello E, Tamagno E, gatto V, Danni O, Boccuzzi G**, 1997. Dehydroepiandrosterone administration prevents the oxidative damage induced by acute hyperglycemia in rats. *Journal of endocrinology*. **155**: 233-240.
- Arlt W, Callies F, van Vlijmen JC, Koehler I, Reincke M, Bidlingmaier M, Huebler D, Oettel M, Ernst M, Schulte HM, Allolio B**, 1999. Dehydroepiandrosterone replacement in women with adrenal insufficiency. *New England journal of medicine*. **341**: 1013-1020.
- Asai T, Okada M, Ono M, Irisawa T, Mori Y, Yokomizo Y, Sato S**, 1993. Increased levels of tumor necrosis factor and interleukin 1 in bronchoalveolar lavage fluids from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary immunology and immunopathology*. **38**: 253-260.
- Atabek ME, Keskin M, Yazici C, Kendirci M, Hatipoglu N, Koklu E, Kurtoglu S**, 2006. Protein oxidation in obesity and insulin resistance. *European journal of pediatrics*. **165**: 753-756.
- Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schalaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schürmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF**, 2000. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nature medicine*. **6**: 583-588.
- Ayala A, Herdon CD, Lehman DL, Ayala CA, Chaudry IH**, 1996. Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators. *Blood*. **87**: 4261-4275.
- Azuma T, Matsubara T, Shima Y, Haeno S, Fujimoto T, Tone K, Shibata N, Sakoda S**, 1993. Neurosteroids in cerebrospinal fluid in neurologic disorders. *Journal of the neurological sciences*. **120**: 87-92.
- Bagby GJ, Plessala KJ, Wilson LA, Thompson JJ, Nelson S**, 1991. Divergent efficacy of antibody to tumor necrosis factor-alpha in intravascular and peritonitis models of sepsis. *The journal of infectious diseases*. **163**: 83-88.
- Baggiolini M**, 2001. Chemokines in pathology and medicine. *Journal of internal medicine*. **250**: 91-104.
- Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A**, 1990. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Analytical biochemistry*. **190**: 360-365.
- Baldus S, Eiserich JP, Mani A, Castro L, Figueroa M, Chumley P, Ma W, Tousson A, White CR, Bullard DC, Brennan ML, Lulis AJ, Moore KP, Freeman BA**, 2001. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *The journal of clinical investigation*. **108**: 1759-1770.
- Baroja ML, Ceuppens JL, van Damme J, Billiau A**, 1988. Cooperation between an anti-T cell (anti-CD28) monoclonal antibody and monocyte-produced IL-6 in the induction of T cell responsiveness to IL-2. *Journal of immunology*. **141**: 1502-1507.
- Bartoli M, Sies H**, 1978. Reduced and oxidized glutathione efflux from liver. *FEBS letters*. **86**: 89-91.

- Bauer ME**, 2005. Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. *Stress*. **8**: 69-83.
- Bdeir K, Cane W, Canziani G, Chaiken I, Weisel J, Koschinsky ML, Lawn RM, bannerman PG, Sachais BS, Kuo A, Hancock MA, Tomaszewski J, Raghunath PN, Ganz T, Higazi AA, Cines DB**, 1999. Defensin promotes the binding of lipoprotein(a) to vascular matrix. *Blood*. **94**: 2007-2019.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA**, 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. **87**: 1620-1624.
- Befus AD, Mowat C, Gilchrist M, Hu J, Solomon S, Bateman A**, 1999. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *Journal of immunology*. **163**: 947-953.
- Beg AA, Baltimore D**, 1996. An essential role for NF- κ B in preventing TNF α -induced cell death. *Science*. **274**: 782-784.
- Belvedere P, Gabai G, Dalla Valle L, Accorsi P, Trivoletti M, Colombo L, Bono G**, 1996. Occurrence of steroidogenic enzymes in the bovine mammary gland at different functional stages. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. **59**: 339-347.
- Ben-Nathan D, Padgett DA, Loria RM**, 1999. Androstenediol and dehydroepiandrosterone protect mice against lethal bacterial infections and lipopolysaccharide toxicity. *Journal of medical microbiology*. **48**: 425-431.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L**, 2003. *Biochimica*, 5 edizione. Zanichelli, Bologna.
- Bergsten C**, 1994. Haemorrhages of the sole horn of dairy cows as a retrospective indicator of laminitis: an epidemiological study. *Acta veterinaria scandinavica*. **35**: 55-66.
- Berlett BS, Stadtman ER**, 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The journal of biological chemistry*. **272**: 20313-20316.
- Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A**, 2002. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *Journal of dairy science*. **85**: 2173-179.
- Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A**, 2005. Influence of body condition score on relationship between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of dairy Science*. **88**: 2017-2026.
- Beutler B, Cerami A**, 1986. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature*. **32**: 584-588.
- Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A**, 1986. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science*. **232**: 977-980.
- Biron CA**, 2001. Interferons α and β as immune regulators-a new look. *Immunity*. **14**: 661-664.
- Bleier JI, Pillarisetty VG, Shah AB, DeMatteo RP**, 2004. Increased and long-term generation of dendritic cells with reduced function from IL-6-deficient bone marrow. *Journal of immunology*. **172**: 7408-7416.

- Blowey RW**, 2004. Lameness in the foot. In *Bovine medicine disease and husbandry of cattle*. Edited by: Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG. Blackwell science, Oxford. 409-434.
- Bokoch GM, Bohl BP, Chuang TH**, 1994. Guanine nucleotide exchange regulates membrane translocation of Rac/Rho GTP-binding proteins. *The journal of biological chemistry*. **269**: 31674-31679.
- Bokoch GM, Diebold BA**, 2002. Current molecular models for NAPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood*. **100**: 2692-2696.
- Branen JK, Davidson PM**, 2004. Enhancement of nisin, lysozyme and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International journal of food microbiology*. **90**: 63-74.
- Brash AR**, 1999. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *The journal of biological chemistry*. **274**: 23679-23682.
- Breuilé D, Malmezat T, Rosé F, Pouyet C, Obled C**, 1994. Assessment of tissue glutathione status during experimental sepsis. *Clinical nutrition*. **13**: 5.
- Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Kwiecien S, Sliwowski Z, Pajdo R, Duda A, Ptak A, Hahn EG**, 2003. Implications of reactive oxygen species and cytokines in gastroprotection against stress-induced gastric damage by nitric oxide releasing aspirin. *International journal of colorectal disease*. **18**: 320-329.
- Buckingham JC**, 1996. Fifteenth Gaddum Memorial Lecture December 1994. Stress and the neuroendocrine-immune axis: the pivotal role of glucocorticoids and lipocortin 1. *British journal of pharmacology*. **118**: 1-19.
- Buege JA, Aust SD**. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*. **52**: 302-310.
- Burger D, Dayer JM**, 2002. Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF- α production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Annals of the New York academy of sciences*. **966**: 464-473.
- Butterworth AE, Wassom DL, Gleich GJ, Loegering DA, David JR**, 1979. Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *Journal of immunology*. **122**: 221-229.
- Capeillere-Blandin C, Gausson V, Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V**, 2004. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. *Biochimica et biophysica acta*. **1689**: 91-102.
- Capuco AV, Bright SA, Pankey JW, Wood DL, Miller RH, Bitman J**, 1992. Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. *Journal of dairy science*. **75**: 2126-2130.
- Carlos TM, Harlan JM**, 1994. Leukocyte-endothelial cell adhesion molecules. *Blood*. **84**: 1068-2101.
- Casadevall M, Saperas E, Panés J, Salas A, Anderson DC, Malagelada JR, Piqué JM**, 1999. Mechanisms underlying the anti-inflammatory actions of central corticotropin-releasing factor. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. **276**: 39-4.
- Castillo C, Hernandez J, Bravo A, Lopez-Alonso M, Pereira V, Benedito JL**, 2005. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *The veterinary Journal*. **169**: 286-292.

- Céballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen AT, Thévenin M, Jaudon MC, Zingraff J, Verger C, Jungers P, Descamps-Latscha B**, 1996. Glutathione antioxidant system as a marker of uremia progression and oxidative stress in chronic renal failure. *Free radicals biology & medicine*. **21**: 845-853.
- Celi P, Merlo M, Da Dalt L, Stefani A, Barbato O, Gabai G**, 2010. Relationship between late embryonic mortality and the increase of plasma advanced oxidised protein products (AOPP) in dairy cows. *Reproduction, fertility and development*. Accettato per la pubblicazione.
- Chakraborty P, Ghosh D, Basu MK**, 2001. Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes. *The journal of parasitology*. **87**: 1023-1027.
- Chen Q, Wang WC, Bruce R, Li H, Schleider DM, Mulbury MJ, Bain MD, Wallace PK, Baumann H, Evans SS**, 2004. Central role of IL-6 receptor signal-transducing chain gp130 in activation of L-selectin adhesion by fever-range thermal stress. *Immunity*. **20**: 59-70.
- Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy WJ, Longo DL, Taub DD, Oppenheim JJ**, 1996. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *The journal of biological chemistry*. **271**: 2935-2940.
- Choi YG, Lim S**, 2009. Characterization of anti-advanced glycation end product antibodies to nonenzymatically lysine-derived and arginine-derived glycated products. *Journal of immunoassay & immunochemistry*. **30**: 386-399.
- Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK**, 2000. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature immunology*. **1**: 510-514.
- Chou MY, Hartvigsen K, Hansen LF, Fogelstrand L, Shaw PX, Boullier A, Binder CJ, Witztum JL**, 2008. Oxidation-specific epitopes are important targets of innate immunity. *Journal of internal medicine*. **263**: 479-488.
- Christeff N, Gherbi N, Mammes O, Dalle MT, Gharakhanian S, Lortholary O, Melchior JC, Nunez**, 1997. Serum cortisol and DHEA concentrations during HIV infection. *Psychoneuroendocrinology*. **22**: S11-S18.
- Circu ML, Aw TY**, 2008. Glutathione and apoptosis. *Free radical research*. **42**: 689-706.
- Conner JG, Eckersall PD, Doherty M, Douglas TA**, 1986. Acute phase response and mastitis in the cow. *Research in veterinary science*. **41**: 126-128.
- Conner JG, Eckersall PD, Wiseman A, Aitchison TC, Douglas TA**, 1988. Bovine acute phase response following turpentine injection. *Research in veterinary science*. **44**: 82-88.
- Conner JG, Eckersall PD, Wiseman A, Bain RK, Douglas TA**, 1989. Acute phase response in calves following infection with *P. haemolytica*, *Ostertagia ostertagi* and endotoxin administration. *Research in veterinary science*. **47**: 203-207.
- Corey EJ, Mehrotra MM, Khan AU**, 1987. Antiarthritic gold compounds effectively quench electronically excited singlet oxygen. *Science*. **236**: 68-69.
- Corletto F**, 2004. *Anestesia del cane e del gatto*. Poletto editore, Milano.

- Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH, DeNicola DB**, 2008. *Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat*, third edition. Mosby Elsevier.
- Cupps TR, Fauci AS**, 1982. Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. *Immunological reviews*. **65**: 133-155.
- Curnow SJ, Scheel-Toellner D, Jenkinson W, Raza K, Durrani OM, Faint JM, Rauz S, Wloka K, Pilling D, Rose-John S, Buckley CD, Murray PI, Salmon M**, 2004. Inhibition of T cell apoptosis in the aqueous humor of patients with uveitis by IL-6/soluble IL-6 receptor trans-signaling. *Journal of immunology*. **173**: 5290-5297.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo G, Giustarini D, Milzani A**, 2009. Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends in biochemical sciences*. **34**: 85-96.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A**, 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry*. **52**: 601-623.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R**, 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, vol. 329, no. 1-2, pp. 23-38.
- Danenbergh HD, Alpert G, Lustig S, Ben-Nathan D**, 1992. Dehydroepiandrosterone protects mice from endotoxin toxicity and reduces tumor necrosis factor production. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **36**: 2275-2279.
- Davies KJ**, 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. General aspects. *The journal of biological chemistry*. **262**: 9895-9901.
- Davies KJ, Delsignore ME, Lin SW**, 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *The Journal of biological chemistry*. **262**: 9902-9907.
- Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT**, 1999. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free radical biology & medicine*. **27**: 1151-1163.
- Dayer JM, Beutler B, Cerami A**, 1985. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells and dermal fibroblast. *The journal of experimental medicine*. **162**: 2163-2168.
- Daynes RA, Araneo BA, Ershler WB, Maloney C, Li GZ, Ryu SY**, 1993. Altered regulation of IL-6 production with normal aging. Possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative. *Journal of immunology*. **150**: 5219-5230.
- de Carvalho DD, Sadok A, Bourgarel-Rey V, Gattacceca F, Penel C, Lehmann M, Kovacic H**, 2008. Nox1 downstream of 12-lipoxygenase controls cell proliferation but not cell spreading of colon cancer cells. *International journal of cancer*. **122**: 1757-1764.
- De Vries A**, 2006. Economic value of pregnancy in dairy cattle. *Journal of dairy science*. **89**: 3876-3885.
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ**, 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The biochemical journal*. **324**: 1-18.
- Decleva E, Dri P, Menegazzi R, Busetto S, Cramer R**, 2002. Evidence that TNF-induced respiratory burst of adherent PMN is mediated by integrin alpha(L)beta(2). *Journal of leukocyte biology*. **72**: 718-726.

- Deighton CM, Watson MJ, Walker DJ**, 1992. Sex hormones in postmenopausal HLA-identical rheumatoid arthritis discordant sibling pairs. *The journal of rheumatology*. **19**: 1663-1667.
- Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N**, 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. **15**: 316-328.
- Delmann HD, Eurell JA**, 2000. *Istologia e anatomia microscopica veterinaria*. Casa editrice ambrosiana, Milano.
- Di Santo E, Foddi MC, Ricciardi-Castagnoli P, Mennini T, Ghezzi P**, 1996. DHEAS inhibits TNF production in monocytes, astrocytes and microglial cells. *Neuroimmunomodulation*. **3**: 285-288.
- Dianzani MU**, 1995. *Istituzioni di patologia generale*. UTET, Torino.
- Diehl S, Anguita J, Hoffmeyer A, Zapton T, Ihle JN, Fikrig E, Rincon M**, 2000. Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity*. **13**: 805-815.
- Dillon JS**, 2005. Dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate and related steroids: their role in inflammatory, allergic and immunological disorders. Current drug targets. *Inflammation and allergy*. **4**: 377-385.
- Dinarello CA**, 1986. Interleukin-1: amino acid sequences, multiple biological activities and comparison with tumor necrosis factor (cachectin). *The year in immunology*. **2**: 68-89.
- Dinarello CA**, 1988. Biology of interleukin 1. *The FASEB journal*. **2**: 108-115.
- Dinauer MC, Orkin SH, Brown R, Jesaitis AJ, Parkos CA**, 1987. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature*. **327**: 717-720.
- Doherty DE, Downey GP, Worthen GS, Haslett C, Henson PM**, 1988. Monocyte retention and migration in pulmonary inflammation. Requirement for neutrophils. *Laboratory investigation*. **59**: 200-213.
- Domigan NM, Charlton TS, Duncan MW, Winterbourn CC, Kettle AJ**, 1995. Chlorination of tyrosyl residues in peptides by myeloperoxidase and human neutrophils. *The journal of biological chemistry*. **270**: 16542-16548.
- Dröge W**, 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. **82**: 47-95.
- Dröge W, Pottmeyer-Gerber C, Schmidt H, Nick S**, 1986. Glutathione augments the activation of cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Immunobiology*. **172**: 151-156.
- Du C, Khalil MW, Sriram S**, 2001. Administration of dehydroepiandrosterone suppresses experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice. *Journal of immunology*. **167**: 7094-7101.
- Duncan MW**, 2003. A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. *Amino acids*. **25**: 3-4, pp. 351-361.
- Dziegielewska KM, Møller JE, Potter AM, Ek J, Lane MA, Saunders NR**, 2000. Acute-phase cytokines IL-1 β and TNF- α in brain development. *Cell tissue research*. **299**: 335-345.
- Echtenacher B, Falk W, Mannel DN, Krammer PH**, 1990. Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *Journal of immunology*. **145**: 3762-3766.

- Eckersall PD, Conner JG**, 1988. Bovine and canine acute phase proteins. *Veterinary research communications*. **12**: 169-178.
- Edmonson PW, Bradley AJ**, 2004. Mastitis. In *Bovine medicine disease and husbandry of cattle*. Edited by: Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG. Blackwell science, Oxford. 326-336.
- Egwang TG, Befus AD**, 1983. The role of complement in the induction and regulation of immune responses. *Immunology*. **51**: 207-224.
- Elsbach P, Weiss J**, 1988. Phagocytic cells: oxygen-independent antimicrobial systems. In *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. Edited by: JI Gallin, IM Goldstein, R Snyderman. Raven press Ltd., New York. 445-470.
- Ernst M, Jenkins BJ**, 2004. Acquiring signaling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends in genetics*. **20**: 23-32.
- Eskandari MK, Bolgos G, Miller C, Nguyen DT, DeForge LE, Remick DG**, 1992. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxiemia. *Journal of immunology*. **148**: 2724-2730.
- Esterbauer H, Cheeseman KH**, 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology*. **186**: 407-421.
- Etzioni A, Doerschuk CM, Harlan JM**, 1999. Of man and mouse: leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies. *Blood*. **94**: 3281-3288.
- Ezekowitz RA, Williams DJ, Koziel H, Armstrong MY, Warner A, Richards FF, Rose RM**, 1991. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature*. **351**: 155-158.
- Fantone JC, Ward PA**, 1982. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *The american journal of pathology*. **107**: 395-418.
- Feldman BJ, Zinkl JG, Jain NJ**, 2000. *Schalm's Veterinary Hematology* Fifth Edition, Lea & Fabiger.
- Fialová L, Malbohan I, Kalousová M, Soukupová J, Krofta L, Stípek S, Zima T**, 2006. Oxidative stress and inflammation in pregnancy. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. **66**: 121-127.
- Filley WV, Kephart GM, Holley KE, Gleich GJ**, 1982. Identification by immunofluorescence of eosinophil granule major basic protein in lung tissues of patients with bronchial asthma. *Lancet*. **2**: 11-16.
- Filomeni G, Rotilo G, Ciriolo MR**, 2002. Cell signaling and the glutathione redox system. *Biochemical pharmacology*. **64**: 1057-1064.
- Forsyth CB, Solovjov DA, Ugarova TP, Plow EF**, 2001. Integrin $\alpha_{M\beta 2}$ -mediated cell migration to fibrinogen and its recognition peptides. *The journal of experimental medicine*. **193**: 1123-1133.
- Fratlicelli A, Serrano CV, Bochner BS, Capogrossi MC, Zweier JL**, 1996. Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion molecule expression and leukocyte and endothelial adhesion. *Biochimica et biophysica acta*. **1310**: 251-259.
- Fu S, Wang H, Dean DMR**, 2000. Reactions of hypochlorous acid with tyrosine and peptidyl-tyrosyl residues give dichlorinated and aldehydic products in addition to 3-chlorotyrosine. *J.Biol.Chem*. **275**: 10851-10858.

- Fujii J, Iuchi Y, Okada F**, 2005. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reproductive biology and endocrinology*. **3**: 43.
- Funk CD**, 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoids biology. *Science*. **294**: 1871-1875.
- Gaàl T, Ribiczeyné P, Stadler K, Jakus J, Reiczigel J, Kövér P, Mézes M, Sümeghy L**, 2006. Free radicals, lipid peroxidation and the antioxidant system in the blood of cows and newborn calves around calving. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **143**: 391-396.
- Gabai G, Marinelli L, Simontacchi C, Bono G**, 2004. The increase in plasma C195 steroids in subcutaneous abdominal and jugular veins of dairy cattle during pregnancy is unrelated to estrogenic activity. *Steroids*. **69**: 121-127.
- Gabay C**, 2006. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis research and therapy*. **8 (suppl. 2)**: S3.
- Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodriguez-Palenzuela P**, 1998. Plant defense peptides. *Biopolymers*. **47**: 479-491.
- Gautam N, Herwald H, Hedqvist P, Lindbom L**, 2000. Signaling via β_2 integrins triggers neutrophil-dependent alteration in endothelial barrier function. *The journal of experimental medicine*. **191**: 1829-1839.
- Georgieva NV**, 2005. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological system-a review. *Bulgarian journal of veterinary medicine*. **8**: 1-11.
- Ghezzi P, Di Santo E, Sacco S, Foddi C, Barbaccia ML, Mennini T**, 2000. Neurosteroid levels are increased in vivo after LPS treatment and negatively regulate LPS-induced tumor necrosis factor production. *European cytokine network*. **11**: 464-469.
- Giovannini C, Filesi C, D'Archivio M, Scazzocchio B, Santangelo C, Masella R**, 2006. Polifenoli e difese antiossidanti endogene: effetti sul glutatione e sugli enzimi ad esso correlati. *Annali dell'istituto superiore della sanità*. **42**: 336-347.
- Giustizieri ML, Albanesi C, Scarponi C, De Pità O, Girolomoni G**, 2002. Nitric oxide donors suppress chemokine production by keratinocytes in vitro and in vivo. *The American journal of pathology*. **161**: 1409-1418.
- Godson DL, Campos M, Attah-Poku SK, Redmond MJ, Cordeiro DM, Sethi MS, Harland RJ, Babiuk LA**, 1996. Serum haptoglobin as an indicator of acute phase response in bovine respiratory disease. *Veterinary immunology and immunopathology*. **51**: 277-292.
- Goff JP, Horst RL**, 1997, "Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders", *Journal of dairy science*. **80**: 1260-1268.
- Goodarzi MT, Ghahraman S, Mirmomeni MH**, 2004. In vitro Glycation of Human IgG and Its Effect on Interaction with Anti-IgG. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*. **3**: 181-187.
- Gough PJ, Gordon S**, 2000. The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes and infection*. **2**: 305-311.
- Gounopoulos P, Merki E, Hansen LF, Choi SH, Tsimikas S**, 2007. Antibodies to oxidized low density lipoprotein: epidemiological studies and potential clinical applications in cardiovascular disease. *Minerva cardiologica*. **55**: 821-837.

- Gravett MG, Haluska GJ, Cook MJ, Novy MJ**, 1996. Fetal and maternal endocrine responses to experimental intrauterine infection in rhesus monkeys. *American journal of obstetrics and gynecology*. **174**: 1725-1731.
- Greenough PR, MacCallum FJ, Weaver AD**, 1981. *Lameness in cattle*. Wright, Bristol.
- Grenett HE, Danley DE, Strick CA, James LC, Otterness IG, Fuentes N, Nesbitt JE, Fuller GM**, 1991. Isolation and characterization of biologically active murine interleukin-6 produced in *Escherichia coli*. *Gene*. **101**: 267-271.
- Gruys E, van Ederen AM, Alsemgeest SPM, Kalsbeek HC, Wensing T**, 1993. Acute phase protein values in blood of cattle as indicator of animals with pathological processes. *Archiv für Lebensmittelhygiene*. **44**: 107-111.
- Guazzo EP, Kirkpatrick PJ, Goodyer IM, Shiers HM, Herbert J**, 1996. Cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA), and DHEA sulfate in the cerebrospinal fluid of man: relation to blood levels and the effects of age. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*. **81**: 3951-3960.
- Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y**, 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human reproduction update*. **7**: 175-189.
- Gupta S, Agarwal A, Banerjee J, Alvarez J**, 2007. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstetrical and gynecological survey*. **62**: 335-347.
- Gutteridge JM**, 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*, vol. 41, no. 12 Pt 2, pp. 1819-1828.
- Guzik TJ, Korbust R, Adamek-Guzik T**, 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of physiology and pharmacology*. **54(4)**: 469-487.
- Hagiwara K, Yamanaka H, Hisaeda K, Taharaguchi S, Kirisawa R, Iwai H**, 2001. Concentrations of IL-6 in serum and whey from healthy and mastitic cows. *Veterinary research communications*. **25**: 99-108.
- Hardie EM**, 2000. Recognition of pain behavior in animals. In *Animal pain: a practice-oriented approach to an effective pain control in animals*. Edited by: Hellbrekers LJ, Van der Wees. Utrecht, The Netherlands.
- Havelock JC, Auchus RJ, Rainey WE**, 2004. The rise in adrenal androgen biosynthesis: adrenarche. *Seminars in reproductive medicine*. **22**: 337-347.
- Havemann K, Janoff A**, 1978. *Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes-biochemistry, physiology and clinical significance*. Urban and Schwarzenberg, Inc., Baltimore.
- Hawkins CL, Davies M**, 1998. Hypochlorite-induced damage to proteins: formation of nitrogen-centred radicals from residues and their role in protein fragmentation. *Journal of Biochem*. **332**: 617-625.
- Hawkins CL, Davies M**, 1999. Hypochlorite-induced oxidation of proteins in plasma: formation of chloramines and nitrogen-centred radicals and their role in protein fragmentation. *Journal of Biochem*. **340**: 539-548.
- Hayashi F, Tamura H, Yamada J, Kasai H, suga T**, 1994. Characteristics of the hepatocarcinogenesis caused by dehydroepiandrosterone, a peroxisome proliferator, in male F-344 rats. *Carcinogenesis*. **15**: 2215-2219.

- Hazen SL, d'Avignon A, Anderson MM, Hsu FF, Heinecke JW**, 1998a. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to oxidize α -amino acids to a family of reactive aldehydes. Mechanistic studies identifying labile intermediates along the reaction pathway. *The journal of biological chemistry*. **273**: 4997-5005.
- Hazen SL, Hsu FF, d'Avignon A, Heinecke JW**, 1998b. Human neutrophils employ myeloperoxidase to convert α -amino acids to a battery of reactive aldehydes: a pathway for aldehyde generation at sites of inflammation. *Biochemistry*. **37**: 6864-6873.
- Hazen SL, Hsu FF, Mueller DM, Crowley JR, Heinecke JW**, 1996. Human neutrophils employ chlorine gas as an oxidant during phagocytosis. *Journal of clinical investigation*. **98**: 1283-1289.
- Heinecke JW, Li W, Daehnke HL III, Goldstein JA**, 1993a. Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *The journal of biological chemistry*. **268**: 4069-4077.
- Heinecke JW, Li W, Francis GA, Goldstein JA**, 1993b. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. *The journal of clinical investigation*. **91**: 2866-2872.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F**, 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. *Biochemical journal*. **374**: 1-20.
- Hellsten Y, Frandsen U, Ørthenblad N, Sjødin B, Richter E**, 1997. Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. *Journal of physiology*. **498.1**: 239-248.
- Henderson WR Jr**, 1991. Eicosanoids and platelet-activating factor in allergic respiratory diseases. *The american review of respiratory disease*. **143**: S86-90.
- Henderson WR Jr**, 1994. The role of leukotrienes in inflammation. *Annals of internal medicine*. **121**: 684-697.
- Hibbit KG, Craven N, Batten EH**, 2004. Anatomy, physiology and immunology of the udder. In *Bovine medicine disease and husbandry of cattle*. Edited by: Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG. Blackwell science, Oxford. 311-325.
- Higazi AA, Lavi E, Bdeir K, Ulrich AM, Jamieson DG, rader DJ, Usher DC, Kane W, ganz T, Cines DB**, 1997. Defensin stimulates the binding of lipoprotein (a) to human vascular endothelial and smooth muscle cells. *Blood*. **89**: 4290-4298.
- Himmelfarb J, Lazarus JM, Hakim R**, 1991. Reactive oxygen species production by monocytes and polymorphonuclear leukocytes during dialysis. *American journal of kidney diseases*. **17**: 271-276.
- Himmelfarb J, McMonagle E**, 2001. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney international*, vol. 60, no. 1, pp. 358-363.
- Hirsch RL**, 1982. The complement system: its importance in the host response to viral infection. *Microbiological review*. **46**: 71-85.
- Hixenbaugh EA, Goeckler ZM, Papaiya NN, Wysolmerski RB, Silverstein SC, Huang AJ**, 1997. Chemoattractant-stimulated neutrophils induce regulatory myosin light chain phosphorylation and isometric tension

- development in endothelial cells. *The american journal of Physiology*. **273**: H981-H988.
- Hoidal JR**, 2001. Reactive oxygen species and cell signaling. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. **25**: 661-663.
- Holvoet P, Collen D**, 1997. Beta-VLDL hypercholesterolemia relative to LDL hypercholesterolemia is associated with higher levels of oxidized lipoproteins and a more rapid progression of coronary atherosclerosis in rabbits. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **17**: 2376-2382.
- Horiuchi S, Araki N, Morino Y**, 1991. Immunochemical approach to characterize advanced glycation and products of the Maillard reaction. Evidence for the presence of a common structure. *The journal of biological chemistry*. **266**: 7329-7332.
- Huie RE, Padmaja S**, 1993. The reaction of NO with superoxide. *Free radical research communications*. **18**: 195-199.
- Hum S, Koski KG, Hoffer LJ**, 1992. Varied protein intake alters glutathione metabolism in rats. *Journal of nutrition*. **122**:2010-2018.
- Hum S, Robitaille L, Hoffer LJ**, 1991. Plasma glutathione turnover in the rat: effect of fasting and buthionine sulfoximine. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. **69**: 581-587.
- Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA**, 2001. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity*. **14**: 705-714.
- Huzzey JM, Duffield TF, LeBlanc SJ, Veira DM, Weary DM, von Keyserlingk MA**, 2009. Short communication: haptoglobin as an early indicator of metritis. *Journal of dairy science*. **92**: 621-625.
- Iborra A, Palacio JR, Martinez P**, 2005. Oxidative stress and autoimmune response in the infertile woman. *Chemical immunology and allergy*. **88**: 150-162.
- Ignarro LJ**, 2002. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *Journal of physiology and pharmacology*. **53**: 503-514.
- Imlay JA, Linn S**, 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*. **240**: 1302-1309.
- Ischiropoulos H**, 1998. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Archives of biochemistry and biophysics*. **356**: 1-11.
- Ishikawa Y, Nakada K, Hagiwara K, Kirisawa R, Iwai H, Moriyoshi M, Sawamukai Y**, 2004. Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of pre and post-partum dairy cattle and its relationship to postpartum reproductive diseases. *The journal of veterinary medical science*. **66**: 1403-1408.
- Itabe H, Yamamoto H, Imanaka T, Shimamura K, Uchiyama H, Kimura J, Sanaka T, Hata Y, Takano T**, 1996. Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. *Journal of lipid research*. **37**: 45-53.
- Iyer S, Lönnerdal B**, 1993. Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *European journal of clinical nutrition*. **47**: 232-241.
- Jacob JS, Cistola DP, Hsu FF, Muzaffar S, Mueller DM, Hazen SL, Heinecke JW**, 1996. Human phagocytes employ the myeloperoxidase-hydrogen

- peroxide system to synthesize dityrosine trityrosine, pulcherosine, and isodityrosine by a tyrosil radical-dependent pathway. *The journal of biological chemistry*. **271**: 19950-19956.
- Jakobsson PJ, Odlander B, Steinhilber D, Rosé A, Claesson HE**, 1991. Human B Lymphocytes possess 5-lipoxygenase activity and convert arachidonic acid to leukotriene B₄. *Biochemical and biophysical research communications*. **178**: 302-308.
- Jenkins BJ, Grail D, Inglese M, quilici C, Bozinovski S, Wong P, Ernst M**, 2004. Imbalanced gp130-dependent signaling in macrophages alters macrophage colony-stimulating factor responsiveness via regulation of c-fms expression. *Molecular and cellular biology*. **24**: 1453-1463.
- Jenner P**, 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of neurology*. **53**:S26-S38.
- Jin T, Xu X, Hereld D**, 2008. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine*. **44**: 1-8.
- Jones SA, Rose-John S**, 2002. The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex. *Biochimica et biophysica acta*. **1592**: 251-263.
- Kalousova M, Skrha J, Zima T**, 2002. Advanced glycation end products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiological research*. **51**: 597-604.
- Kalousova M, Zima T, Tesar V, Dusilova-Sulkova S, Skrha J**, 2005. Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background. *Mutation research*. **579**: 37-46.
- Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K, Aizawa T, Ohno M**, 2002. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. **162**: 221-225.
- Kaplan MH, Volanakis JE**, 1974. Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *Journal of immunology*. **112**: 2135-2147.
- Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C**, 2003. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends in immunology*. **24**: 25-29.
- Kaplowitz N, Fernández-Checa JC, Kannan R, Garcia-Ruiz C, Ookhtens M, Yi JR**, 1996. GSH transporters: molecular characterization and role in GSH homeostasis. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*. **377**: 267-273.
- Karck U, Peters T, Decker K**, 1988. The release of tumor necrosis factor from endotoxin-stimulated rat Kupffer cells is regulated by prostaglandin E₂ and dexamethasone. *Journal of hepatology*. **7**: 352-361.
- Katsuyama M, Fan C, Yabe-Nishimura C**, 2002. NADPH oxidase is involved in prostaglandin F₂α-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells: induction of NOX1 by PGF₂α. *The journal of biological chemistry*. **277**: 13438-13442.
- Kazatchkine MD, Nydegger VE**, 1982. The human alternative complement pathway: biology and immunopathology of activation and regulation. *Progress in allergy*. **30**:193-234.
- Kern JA, Lamb Rj, Reed JC, Daniele RP, Nowell PC**, 1988. Dexamethasone inhibition of interleukin 1 beta production by human monocytes.

- Posttranscriptional mechanisms. *Journal of clinical investigation*. **81**: 237-244.
- Keyse SM**, 2000. Stress response: methods and protocols.(Methods in molecular biology). Humana PressInc, Totowa.
- Kim C, Dinauer MC**, 2006. Impaired NADPH oxidase activity in Rac2-deficient murine neutrophils does not result from defective translocation of p47phox and p67phox and can be rescued by exogenous arachidonic acid. *Journal of leukocyte biology*. **79**: 223-234.
- Kim IK, Lee JH, Kim HS, Kwon OJ, Shim BS**, 1995. A novel function of haptoglobin: haptoglobin-haemoglobin complex induces apoptosis of hepatocarcinomatous hep 3B cells. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. **55**: 529-535.
- Kimura M, Tanaka S, Yamada Y, Kiuchi Y, Yamakawa T, Sekihara H**, 1998. Dehydroepiandrosterone decreases serum tumor necrosis factor-alpha and restores insulin sensitivity: independent effect from secondary weight reduction in genetically obese Zucker fatty rats. *Endocrinology*. **139**: 3249-3253.
- Kimura T, Iwase M, Kondo G, Watanabe H, Ohashi M, Ito D, Nagumo M**, 2003. Suppressive effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on cytokine release in human neutrophils. *International immunopharmacology*. **3**: 1519-1528.
- Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T**, 1995. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*. **86**: 1243-1254.
- Klebanoff SJ**, 1970. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. *Science*. **169**: 1095-1097.
- Klebanoff SJ**, 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of leukocyte biology*. **77**: 598-625.
- Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS**, 1992. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chemical research in toxicology*. **5**: 834-842.
- Kreck ML, Freeman JL, Abo A, Lambeth JD**, 1996. Membrane association of Rac is required for high activity of the respiratory burst oxidase. *Biochemistry*. **35**: 15683-15692.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N**, 2005. *Le basi patologiche delle malattie*. Elsevier Italia, Milano.
- Kurien BT, Hensley K, Bachmann M, Scofield RH**, 2006. Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases. *Free radical biology & medicine*. **41**: 549-556.
- La Flamme AC, Pearce EJ**, 1999. The absence of IL-6 does not affect Th2 cell development in vivo, but does lead to impaired proliferation, IL-2 receptor expression, and B cell responses. *Journal of immunology*. **162**: 5829-5837.
- Labrie F, Diamond P, Cusan L, Gomez JL, Belanger A, Candas B**, 1997. Effect of 12-month dehydroepiandrosterone replacement therapy on bone, vagina, and endometrium in postmenopausal women. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*. **82**: 3498-3505.
- Labrie F, Luu-The V, Belanger A, Lin S-X, Simard J, Pelletier G, Labrie C**, 2005. Is dehydroepiandrosterone a hormone? *Journal of endocrinology*. **187**: 169-196.

- Laemmli UK**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Lahita RG, Bradlow HL, Ginzler E, Pang S, New M**, 1987. Low plasma androgens in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. **30**: 241-248.
- Langhoff E, Ladefoged J, Dickmeiss E**, 1985. The immunosuppressive potency of various steroids on peripheral blood lymphocytes, T cells, NK and K cells. *International journal of immunopharmacology*. **7**: 483-489
- Lapouge K, Smith SJ, Walker PA, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Rittinger K**, 2000. Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac-GTP. *Molecular cell*. **6**: 899-907.
- Largent BL, Walton KM, Hoppe CA, Lee YC, Schnaar RL**, 1984. Carbohydrate-specific adhesion of alveolar macrophages to mannose-derivatized surfaces. *The journal of biological chemistry*. **259**: 1764-1769.
- Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwig SS, Ganz T, selsted ME**, 1989. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *The journal of clinical investigation*. **84**: 553-561.
- Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T**, 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annual review of immunology*. **11**: 105-128.
- Lemansky P, Gerecitano-Schimidek M, Das RC, Schmidt B, Hasilik A**, 2003. Targeting myeloperoxidase to azurophilic granules in HL-60 cells. *Journal of leukocyte biology*. **74**: 542-550.
- Lentsch AB, Ward PA**, 2000. Regulation of inflammatory vascular damage. *The journal of pathology*. **190**: 343-348.
- Leonard FC, O'connel J, O'farrel K**, 1994. Effects of different housing conditions on behavior and foot lesions in Friesian heifers. *Veterinary records*. **134**: 490-494.
- Levy PF, Viljoen M**, 1995. Lactoferrin: a general review. *Haematologica*. **80**: 252-267.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER**, 1990. "Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins", *Methods in enzymology*. **186**: 464-478.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E**, 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*. **233**: 346-357.
- Levy BD, Serhan CN**, 2002. Polyisoprenyl phosphates: natural anti-inflammatory lipid signals. *Cellular and molecular life sciences*. **59**: 729-741.
- Liao F, Huynh HK, Eiroa A, Greene T, Polizzi E, Muller WA**, 1995. Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. *The journal of experimental medicine*. **182**: 1337-1343.
- Liles WC, Klebanoff SJ**, 1995. Regulation of apoptosis in neutrophils: Fas track to death? *Journal of immunology*. **155**: 3289-3291.
- Loft S, Danielsen PH, Mikkelsen L, Risom L, Forchhammer L, Moller P**, 2008. Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. *Biochemical society transactions*. **36**: 1071-1076.

- Loos M**, 1982. The classical complement pathway: mechanism of activation of the first component by antigen-antibody complexes. *Progress in allergy*. **30**: 135-192.
- Loria RM, Padgett DA, Huynh PN**, 1996. Regulation of the immune response by dehydroepiandrosterone and its metabolites. *The journal of endocrinology*. **150** (suppl.): S209-S220.
- Loughrey CM, Young IS, Lightbody JH, McMaster D, McNamee PT, Trimble ER**, 1994. *Oxidative stress in haemodialysis*. *QJM*. **87**: 679-683.
- Luchtefeld M, Drexler H, Schieffer B**, 2003. 5-Lipoxygenase is involved in the angiotensin II-induced NAD (P)H-oxidase activation. *Biochemical and biophysical research communication*. **308**: 668-672.
- Lucy MC**, 2007. Fertility in high producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Society of reproduction and fertility supplement*. **64**: 237-254.
- Lykkesfeldt J, Svendsen O**, 2007. Oxidants and antioxidants in diseases: oxidative stress in farm animals. *The veterinary journal*. **173**: 502-511.
- Maggi E, Bellazzi R, Gazo A, Seccia M, Bellomo G**, 1994. Autoantibodies against oxidatively-modified LDL in uremic patients undergoing dialysis. *Kidney international*. **46**: 869-876.
- Majno G, Palade GE**, 1961. Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *The journal of biophysical and biochemical cytology*. **11**: 571-605.
- Makimura S, Suzuki N**, 1982. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases. *Nippon juigaku zasshi. The japanese journal of veterinary science*. **44**: 15-21.
- Malle E, Woenckhaus C, Waeg G, Esterbauer H, Grone EF, Grone HJ**, 1997. Immunological evidence for hypochlorite-modified proteins in human kidney. *The American journal of pathology*. **150**: 603-615.
- Malmezat T, Breuillé D, Capitan P, Mirand PP, Obled C**, 2000. Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *The journal of nutrition*. **130**: 1239-1246.
- Maninger N, Wolkowitz OM, Reus VI, Epel ES, Mellon SH**, 2009. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Frontiers in neuroendocrinology*. **30**: 65-91.
- Mannel DN, Echtenacher B**, 2000. TNF in the inflammatory response. *Chemical immunology*. **74**: 141-161.
- Manson FJ, Leaver JD**, 1988. The influence of dietary protein intake and of hoof trimming on lameness in dairy cattle. *Animal production*. **47**: 191-199.
- Marcinkiewicz J**, 1997. Regulation of cytokine production by eicosanoids and nitric oxide. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. **45**: 163-167.
- Marcinkiewicz J, Chain BM**, 1993. Differential regulation of cytokine production by nitric oxide. *Immunology*. **80**: 146-150.
- Marcinkiewicz J, Grabowska A, Chain BM**, 1996. Is there a role for nitric oxide in regulation of T cell secretion of IL-2? *Journal of immunology*. **156**: 4617-4621.
- Marin V, Montero-Julian FA, Gres S, Boulay V, Bongrand P, Farnarier C, Kaplanski G**, 2001. The IL-6/soluble IL-6R α autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic

- inflammation: an experimental model involving thrombin. *Journal of immunology*. **167**: 3435-3442.
- Marinelli L, Trevisi E, Da Dalt L, Merlo M, Bertoni G, Gabai G**, 2007. Dehydroepiandrosterone secretion in dairy cattle is episodic and unaffected by ACTH stimulation. *Journal of endocrinology*. **194**: 627-635.
- Marodi L, Korchak HM, Johnston RB Jr**, 1991. Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *Journal of immunology*. **146**: 2783-2789.
- Marrack P, Kappler J, Mitchell T**, 1999. Type I interferons keep activated T cells alive. *The journal of experimental medicine*. **189**: 521-530.
- Marsche G, Hammer A, Oskolkova O, Kozarsky KF, Sattler W, Malle E**, 2002. Hypochlorite-modified high density lipoprotein, a high affinity ligand to scavenger receptor class B, type I, impairs high density lipoprotein-dependent selective lipid uptake and reverse cholesterol transport. *The Journal of biological chemistry*. **277**, no. 35: 32172-32179.
- Marx C, Petros S, Bornstein SR**, 2003. Adrenocortical hormones in survivors and nonsurvivors of severe sepsis: diverse time course of dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone-sulfate, and cortisol. *Critical care medicine*. **31**: 1382-1388.
- Masi AT, Josipovic DB, Jefferson WE**, 1984. Low adrenal androgenic-anabolic steroids in women with rheumatoid arthritis (RA): gas-liquid chromatographic studies of RA patients and matched normal control women indicating decreased 11-deoxy-17-ketosteroid excretion. *Seminars in arthritis and rheumatism*. **14**: 1-23.
- Matsuura E, Hughes GR, Khanashta MA**, 2008. Oxidation of LDL and its clinical implication. *Autoimmunity reviews*. **7**: 558-566.
- Mc Ever RP**, 1994. Selectins. *Current opinion in immunology*. **6**: 75-84.
- Mc Loughlin RM, Witowski J, Robson RL, Wilkinson TS, Hurst SM, Williams AS, Williams JD, Rose-John S, Jones SA, Topley N**, 2003. Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. *The journal of clinical investigation*. **112**: 598-607.
- Meager A**, 1987. Quantification of interferons by anti-viral assays and their standardization. In: *Lymphokines and interferons, a practical approach*. Edited by: Clemens MJ, Morris AG, Gearing AJH. IRL Press, Oxford. 129-147.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr**, 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. **296**: 298-300.
- Meister A**, 1994a. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *The journal of biological chemistry*. **269**: 9397-9400.
- Meister A**, 1994b. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer research*. **54** (7 suppl.): 1969S-1975S.
- Meister A**, 1995. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochimica et biophysica acta*. **1271**: 35-42.
- Meister A, Anderson ME**, 1983. Glutathione. *Annual review of biochemistry*. **52**: 711-760.
- Melnicoff MJ, Horan PK, Morahan PS**, 1989. Kinetics of changes in peritoneal-cell populations following acute inflammation. *Cellular immunology*. **118**: 178-191.

- Michel T, Feron O.**, 1997. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *The journal of clinical investigation*. **100**: 2146-2152.
- Mihoko O, Takeschi O**, 2010. Degradation of apostransferrin by myeloperoxidase system. *Inflammation and Regeneration*. **30**: 63-67.
- Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC**, 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of dairy science*. **76**: 2812-2823.
- Modur V, Li Y, Zimmerman GA, Prescott Sm, McIntyre TM**, 1997. Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha. *The journal of clinical investigation*. **100**: 2752-2756.
- Mohan PF, Cleary MP**, 1991. Short-term effects of dehydroepiandrosterone treatment in rats on mitochondrial respiration. *Journal of nutrition*. **121**: 240-250.
- Moller IM, Kristensen BK**, 2004. Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochemical and photobiological science*. **3**: 730-735.
- Moore DA, Berry SL, Truscott ML, Koziy V**, 2001. Efficacy of a nonantimicrobial cream administered topically for treatment of digital dermatitis in dairy cattle. *Journal of american veterinary medical association*. **219**: 1435-1438.
- Mosser DM**, 2003. The many faces of macrophage activation. *Journal of leukocyte biology*. **73**: 209-212.
- Muller WA**, 1999. Leukocyte-endothelial cell adhesion molecules in transendothelial migration, 3rd edition. In *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. Edited by: Gallin JI and Snyderman R. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 585-592.
- Muller WA**, 2002. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Laboratory investigations*. **82**: 521-533.
- Munck A, Guyre PM**, 1986. Glucocorticoid physiology, pharmacology and stress. *Advances in experimental medicine and biology*. **196**: 81-96.
- Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yasukawa K, Yamanishi K, Taga T, Kishimoto T**, 1993. IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science*. **260**: 1808-1810.
- Narimatsu M, Maeda H, Itoh S, Atsumi T, Ohtani T, Nishida K, Itoh M, Kamimura D, Park SJ, Mizuno K, Miyazaki J, Hibi M, Ishihara K, Nakajima K, Hirano T**, 2001. Tissue-specific autoregulation of the stat3 gene and its role in interleukin-6-induced survival signals in T cells. *Molecular and cellular biology*. **21**: 6615-6625.
- Nathan C**, 1991. Mechanisms and modulation of macrophage activation. *Behring institute mitteilungen*. Feb: 200-207.
- Nathan C**, 2002. Points of control in inflammation. *Nature*. **420**: 846-852.
- Nguyen AT, Lethias C, Zingraff J, Herbelin A, Naret C, Descamps-Latscha B**, 1985. Hemodialysis membrane-induced activation of phagocyte oxidative metabolism detected *in vivo* and *in vitro* within microamounts of whole blood. *Kidney international*. **28**: 158-167.
- Nicod LP**, 1993. Cytokines 1. Overview. *Thorax*. **48**: 660-667.
- Nieschlag E, Loriaux DL, Ruder HJ, Zucker IR, Kirschner MA, Lipsett MB**, 1973. The secretion of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate in man. *Journal of endocrinology*. **57**: 123-134.

- Nilsson SA**, 1963. Clinical, morphological and experimental studies of laminitis in cattle. *Acta veterinaria scandinavica*. **4**, sup 1: 9-304.
- Niu XF, Smith CW, Kubes P**, 1994. Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion molecules to neutrophils. *Circulation research*. **74**: 1133-1140.
- Noakes DE, Wallace L, Smith GR**, 1991. Bacterial flora of the uterus of cows after calving on two hygienically contrasting farms. *The veterinary record*. **128**: 440-442.
- Noyan T, Güler A, Sekeroglu MR, Kamaci M**, 2006. Serum advanced oxidation protein products, myeloperoxidase and ascorbic acid in pre-eclampsia and eclampsia. *Australian and New Zealand journal of obstetrics and gynaecology*. **46**: 486-491.
- O'Donnel MC, Ackerman SJ, Gleich GJ, Thomas LL**, 1983. Activation of basophil and mast cell histamine release by eosinophil granule major basic protein. *The journal of experimental medicine*. **157**: 1981-1991.
- O'Riordan DM, Standing JE, Limper AH**, 1995. *Pneumocystis carinii* glycoprotein A binds macrophage mannose receptors. *Infection and immunity*. **63**: 779-784.
- Ohshima S, Saeki Y, Mima T, Sasai M, Nishioka K, Nomura S, Kopf M, Katada Y, Tanaka T, Suemura M, Kishimoto T**, 1998. Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. **95**: 8222-8226.
- Oliviero S, Morrone G, Cortese R**, 1987. The human haptoglobin gene: transcriptional regulation during development and acute phase induction. *The EMBO journal*. **6**: 1905-1912.
- Opsomer G, Gröhn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, de Kruif A**, 2000. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium. A field study. *Theriogenology*. **53**: 841-857.
- Orsi NM**, 2008. Cytokine networks in the establishment and maintenance of pregnancy. *Human fertility*. **11**:222-230.
- Orsi NM, Tribe RM**, 2008. Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *Journal of neuroendocrinology*. **20**: 462-469.
- Ossent P**, 1995. The pathology of digital disease. *Cattle practice*. **3**: 263.
- Özaydin A, Onaran J, Avsar K, Tezcan V, Sultuybek G**, 2001. Relationship Between Aging and Susceptibility to Oxidative Damage: An Assessment by Erythrocyte Membrane Proteins and Lipids. *Turk J Med Sci*. **31**: 95-101
- Paape M, Mehrzad J, Zhao X, Detilleux J, Burvenich C**, 2002. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. **7**: 109-121.
- Padgett DA, Loria RM**, 1998. Endocrine regulation of murine macrophage function: effects of dehydroepiandrosterone, androstenediol, and androstenetriol. *Journal of neuroimmunology*. **84**: 61-68.
- Palacio JR, Iborra A, Ulcova-Gallova Z, Badia R, Martinez P**, 2006. The presence of antibodies to oxidative modified proteins in serum from polycystic ovary syndrome patients. *Clinical and experimental immunology*. **144**: 217-222.
- Palinski W, Hörkkö S, Miller E, Steinbrecher UP, Powell HC, Curtiss LK, Witztum JL**, 1996. Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of

- oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. *The journal of clinical investigation*. **98**:800-814.
- Palinski W, Koschinsky T, Butler SW, Miller E, Vlassara H, Cerami A, Witztum JL**, 1995. Immunological evidence for the presence of advanced glycosylation end products in atherosclerotic lesions of euglycemic rabbits. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **15**: 571-582.
- Palinski W, Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL**, 1989. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. **86**: 1372-1376.
- Palinski W, Witztum JL**, 2000. Immune responses to oxidative neoepitopes on LDL and phospholipids modulate the development of atherosclerosis. *Journal of internal medicine*. **247**: 371-380.
- Pan J, Xia L, Yao L, McEver RP**, 1998. Tumor necrosis factor-alpha- or lipopolysaccharide-induced expression of the murine P-selectin gene in endothelial cells involves novel kappaB sites and variant activating transcription factor/cAMP response element. *The journal of biological chemistry*. **273**: 10067-10077.
- Parker LN, Odell WD**, 1980. Control of adrenal androgen secretion. *Endocrine review*. **1**: 392-410.
- Parkos CA, Dinauer MC, Walker LE, Allen RA, Jesaitis AJ, Orkin SH**, 1988. Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. **85**: 3319-3323.
- Parris MK**, 1997. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alternative medicine review*. **2**: 155-176.
- Patterson-Delafiels J, Martinez RJ, Lehrer RI**, 1980. Microbicidal cationic proteins in rabbit alveolar macrophages: a potential host defense mechanism. *Infection and immunity*. **30**: 180-192.
- Pilling D, Akbar AN, Girdlestone J, Orteu CH, Borthwick NJ, Amft N, Scheel-Toellner D, Buckley CD, Salmon M**, 1999. Interferon-beta mediates stromal cell rescue of T cells from apoptosis. *European journal of immunology*. **29**: 1041-1050.
- Piroddi M, Depunzio I, Calabrese V, Mancuso C, Aisa CM, Binaglia L, Minelli A, Butterfield A, Galli F**, 2007. Oxidatively-modified and glycated proteins as candidate pro-inflammatory toxins in uremia and dialysis patients. *Amino acids*. **32**: 573-592.
- Platanias LC**, 2005. Mechanisms of type-I- and Type-II-interferon-mediated signaling. *Nature reviews. Immunology*. **5**: 375-386.
- Platzer C, Meisel C, Vogt K, Platzer M, Volk HD**, 1995. Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs. *International immunology*. **7**: 517-523.
- Pober JS, Cotran RS**, 1990. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation*. **50**: 537-544.
- Proctor VA, Cunningham RE**, 1988. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Critical reviews in food science and nutrition*. **26**: 359-395.

- Quaye IK**, 2008. Haptoglobin, inflammation and disease. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*. **102**: 735-742.
- Quinn MT, Evans T, Loetterle LR, Jesaitis AJ, Bokoch GM**, 1993. Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components. *Journal of biological chemistry*. **268**: 20983-20987.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA**, 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *The journal of biological chemistry*. **266**: 4244-4250.
- Rahman I, MacNee**, 2000. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *European respiratory journal*. **16**: 534-554.
- Ramos CL, Pou S, Britigan BE, Cohen MS, Rosen GM**, 1992. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. *The journal of biological chemistry*. **267**: 8307-8312.
- Reaven P, Merat S, Casanada F, Sutphin M, Palinski W**, 1997. Effect of streptozotocin induced hyperglycemia on lipid profiles, formation of advanced glycosylation end products in lesions and extent of atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **17**: 2250-2256.
- Regelson W, Kalimi M**, 1994. Dehydroepiandrosterone (DHEA)-- the multifunctional steroid. II. Effects on the CNS, cell proliferation, metabolic and vascular, clinical and other effects. *Annals of the New York Academy of sciences*. **719**: 564-575.
- Reid GK, Kargman S, Vickers PJ, Mancini JA, Lveillé C, Ethier D, Miller DK, Gillard JW, Dixon RA, Evans JF**, 1990. Correlation between expression of 5-lipoxygenase-activating protein, 5-lipoxygenase, and cellular leukotriene synthesis. *The journal of biological chemistry*. **265**: 19818-23.
- Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB**, 1991. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *The american journal of surgery*. **161**: 488-503.
- Remick D, Manohar P, Bolgos G, Rodriguez J, Moldawer L, Wollenberg G**, 1995. Blockade of tumor necrosis factor reduces lipopolysaccharide lethality, but not the lethality of cecal ligation and puncture. *Shock*. **4**: 89-95.
- Reznick AZ, Packer L**, 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in enzymology*, vol. 233, pp. 357-363.
- Robinson JM**, 2008. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochemistry and cell biology*. **130**: 281-297.
- Robinson JM, Ohira T, Badwey JA**, 2004. Regulation of the NADPH-oxidase complex of phagocytic leukocytes. Recent insights from structural biology, molecular genetics, and microscopy. *Histochemistry and cell biology*. **122**: 293-304.
- Romani L, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Toniatti C, Puccetti P, Bistoni F, Poli V**, 1996. Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *Journal of experimental medicine*. **183**: 1345-1355.

- Romano M, Sironi M, Toniati C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A**, 1997. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*. **6**: 315-325.
- Rook GA, Hernandez-Pando R**, 1997. Pathogenetic role, in human and murine tuberculosis, of changes in the peripheral metabolism of glucocorticoids and antiglyucocorticoids. *Psychoneuroendocrinology*. **22** (suppl. 1): S109-S113.
- Rosati P, Colombo R**, 1997. *La cellula*. Edi.Ermes, Milano.
- Rouzer CA, scott WA, Hamill AL, Liu FT, Katz DH, Cohn ZA**, 1982. Secretion of leukotriene C and other arachidonic acid metabolites by macrophages challenged with immunoglobulin E immune complexes. *Journal of experimental medicine*. **156**: 1077-1086.
- Royal MD, Darwash AO, Flint APF, Webb R, Wooliams JA, Lamming GE**, 2000a. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Animal science*. **70**: 487-501.
- Royal MD, Mann GE, Flint APF**, 2000b. Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *The Veterinary Journal*. **160**: 53-60.
- Ryan GB, Majno G**, 1977. Acute inflammation. *The american journal of pathology*. **86**: 183-276.
- Saccò M, Valenti G, Corvi Mora P, Wu FC, Ray DW**, 2002. DHEA, a selective glucocorticoid receptor antagonist: its role in immune system regulation and metabolism. *Journal of endocrinological investigation*. **25** (10 suppl): 81-82.
- Saeed SA, Ahmad N, Ahmed S**, 2007. Dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase by human haptoglobin: its polymorphism and relation to hemoglobin binding. *Biochemical and biophysical research communications*. **353**: 915-920.
- Saito N, Takemori N, Hirai K, Onodera R, Watanabe S, Naiki M**, 1993. Ultrastructural localization of lactoferrin in the granules other than typical secondary granules of human neutrophils. *Human cell*. **6**: 42-48.
- Salvatore A, Cigliano L, Bucci EM, Corpillo D, Velasco S, Carlucci A, Pedone C, Abrescia P**, 2007. Haptoglobin binding to apolipoprotein A-I prevents damage from hydroxyl radicals on its stimulatory activity of the enzyme lecithin-cholesterol acyltransferase. *Biochemistry*. **46**: 11158-11168.
- Samuelsson B, Dahlén SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN**, 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*. **237**: 1171-1176.
- Santoro F**, 1982. Interaction of complement with parasite surfaces. In *Clinics in immunology and allergy, vol. 2 "immunoparasitology"*. Edited by: A.R.G. Capron. W.B. Saunders Co., London.
- Santos JE, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RL, Galvao KN**, 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal reproduction science*. **82-83**: 513-535.
- Sapolsky R.M.** 1990. Lo stress in natura. *Le scienze*. **259**: 66-72.
- Saran M, Michel C, Bors W**, 1990. Reaction of NO with O₂⁻. Implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Free radical research communication*. **10**: 221-226.

- Savenkova ML, Mueller DM, Heinecke JW**, 1994. Tyrosyl radicals generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein. *The journal of biological chemistry*. **269**: 20394-20400.
- Schafer FQ, Buettner GR**, 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free radical biology and medicine*. **30**: 1191-1212.
- Schauer JE, Schelin A, hanson P, streatman FW**, 1990. Dehydroepiandrosterone and a beta-agonist, energy transducers, alter antioxidant enzyme systems: influence of chronic training and acute exercise in rats. *Archives of biochemistry and biophysics*. **283**: 503-511.
- Schlesinger LS**, 1993. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *Journal of immunology*. **150**: 2920-2930.
- Schuld A, Mullington J, Friess E, Hermann DM, Galanos C, Holsboer F, Pollmächer T**, 2000. Changes in dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate plasma levels during experimental endotoxemia in healthy volunteers. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*. **85**: 4624-4629.
- Schuller-Levis GB, Park E**, 2003. Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS microbiology letters*. **226**: 195-202.
- Schultz H, Weiss JP**, 2007. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease. *Clinica chimica acta*. **348**: 12-23.
- Schurr MJ, Fabian TC, Croce MA, Varnavas LE, Proctor KG**, 1997. Dehydroepiandrosterone, an endogenous immune modulator, after traumatic shock. *Shock*. **7**: 55-59.
- Schweiger D, Furstenberger G, Krieg P**, 2007. Inducible expression of 15-lipoxygenase-2 and 8-lipoxygenase inhibits cell growth via common signaling pathways. *Journal of lipid research*. **48**: 553-564.
- Scott GB**, 1989. Changes in limb loading with lameness for a number of Friesian cattle. *The british veterinary journal*. **145**: 28-38.
- Segal AW, Jones OT**, 1978. Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles from human granulocytes. *Nature*. **276**: 515-517.
- Selmeci L, Seres L, Antal M, Lukacs J, Regoly-Merei A, Acsady G**, 2005. Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique. *Clin Chem Lab Med*. **43**: 294-297.
- Selsted ME, Brown DM, Delange RJ, Lehrer RI**, 1983. Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *The journal of biological chemistry*. **258**: 14485-14489.
- Selsted ME, Szklarek D, Lehrer RI**, 1984. Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. *Infection and immunity*. **45**: 150-154.
- Selye H**. 1974. Stress Without Distress. Philadelphia: PA Lippincott
- Seven A, Guzel S, Aslan M, Hamuryudan V**, 2008. Lipid, protein, DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry*. **41**: 538-543.

- Shanti A, Santanam N, Morales AJ, Parthasarathy S, Murphy AA**, 1999. Autoantibodies to markers of oxidative stress are elevated in women with endometriosis. *Fertility and sterility*. **71**: 1115-1118.
- Shearer JK**, 1996. *Feet and leg problems in dairy cattle*. Presented at the 7th Florida Ruminant Nutrition Symposium, Gainesville, January 11-12, 1996.
- Sheldon IM, Barrett DC, Boyd H**, 2004. The post partum period. In *Bovine medicine disease and husbandry of cattle*. Edited by: Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG. Blackwell science, Oxford. 508-529.
- Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ**, 2009. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biology of reproduction*. **81**: 1025-1032.
- Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc SJ, Gilbert RO**, 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*. **65**: 1516-1530.
- Sheldon IM, Noakes DE**, 1998. Comparison of three treatments for bovine endometritis. *The veterinary record*. **142**: 575-579.
- Shi XY, Hou FF, Niu HX, Wang GB, Xie D, Guo ZJ, Zhou ZM, Yang F, Tian JW, Zhang X**, 2008. Advanced oxidation protein products promote inflammation in diabetic kidney through activation of renal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Endocrinology*. **149**: 1829-1839.
- Shiose A, Sumimoto H**, 2000. Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase. *The journal of biological chemistry*. **275**: 13793-13801.
- Sies H**, 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American journal of medicine*. **91**: 31S-38S.
- Sies H**, 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free radical biology and medicine*. **27**: 916-921.
- Si-Tahar M, Touqui L, Chignard M**, 2009. Innate immunity and inflammation—two facets of the same anti-infectious reaction. *Clinical and experimental immunology*. **156**: 194-198.
- Skinner JG, Brown RA, Roberts L**, 1991. Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. *The veterinary record*. **128**: 147-149.
- Smith CD, Carney JM, Tatsumo T, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR**, 1992. Protein oxidation in aging brain. *Annals of the New York academy of sciences*. **663**: 110-119.
- Smith KL, Greenwood CE**, 2008. Weight loss and nutritional considerations in Alzheimer disease. *Journal of nutrition for the elderly*. **27**: 381-403.
- Smith VG, Edgerton LA, Hafs HD, Convey EM**, 1973. Bovine serum estrogens, progestins and glucocorticoids during late pregnancy, parturition and early lactation. *Journal of animal science*. **36**: 391-396.
- Sordillo LM, Streicher KL**, 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. **7**: 135-146.
- Spitteller G**, 2006. Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free radical biology and medicine*. **41**: 362-387.

- Sprecher DJ, Hostetler DE, Kaneene JB**, 1997. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. *Theriogenology*. **47**: 1179-1187.
- Springer TA**, 1995. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annual review of physiology*. **57**: 827-872.
- SPSS 15.0** (2006). Base user's guide. SPSS Inc., Chicago, IL, USA.
- Stadtman ER, Berlett BS**, 1997, "Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease", *Chemical research in toxicology*, vol. 10, no. 5, pp. 485-494.
- Stadtman ER, Levine RL**, 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids*, vol. 25, no. 3-4, pp. 207-218.
- Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S**, 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The journal of experimental medicine*. **176**: 287-292.
- Steinbeck ML, Khan AU, Karnovsky MJ**, 1992. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *The journal of biological chemistry*. **267**: 13425-13433.
- Straub RH, Lehle K, Hefarth H, weber M, Falk W, Preuner J, Schölmerich J**, 2002. Dehydroepiandrosterone in relation to other adrenal hormones during an acute inflammatory stressful disease state compared with chronic inflammatory disease: role of interleukin-6 and tumor necrosis factor. *European journal of endocrinology*. **146**: 365-374.
- Straub RH, Vogl D, Gross V, Lang B, Schölmerich J, Andus T**, 1998. Association of humoral markers of inflammation and dehydroepiandrosterone sulfate or cortisol serum levels in patients with chronic inflammatory bowel disease. *The american journal of gastroenterology*. **93**: 2197-2202.
- Sugino N**, 2006. Roles of reactive oxygen species in the corpus luteum. *Animal science journal*. **77**: 556-565.
- Sundsmo JS**, 1982. The leukocyte complement system. *Federation proceedings*. **41**: 3094-3098.
- Takahashi M, Keicho K, Takahashi H, Ogawa H, Schultz RM, Okano A**, 2000. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in vitro cultured bovine embryos by comet assay. *Theriogenology*. **54**: 137-145.
- Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, Takeda J, Kishimoto T, Akira S**, 1998. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *Journal of immunology*. **161**: 4652-4660.
- Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S**, 1993. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immunoblized cytokine MIP-1 beta. *Nature*. **361**: 79-82.
- Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N**, 2001. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual review of immunology*. **19**: 623-655.
- Teague TK, Schaefer BC, Hildemen D, Bender J, Mitchell T, Kappler JW, Marrack P**, 2000. Activation-induced inhibition of interleukin 6-mediated T

- cell survival and signal transducer and activator of transcription 1 signaling. *Journal of experimental medicine*. **191**: 915-926.
- Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P**, 1995. The selectins: vascular adhesion molecules. *The FASEB journal*. **9**: 866-873.
- Territo MC, Ganz T, Selsted ME, Lehrer R**, 1989. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *The journal of clinical investigation*. **84**:2017-2020.
- Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH**, 2005. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annual review of immunology*. **23**: 307-336.
- Thomas EL**, 1979. Myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride antimicrobial system: effect of exogenous amines on antibacterial action against *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. **25**: 110-116.
- Thomas EL, Grisham MB, Jefferson MM**,. 1983. Myeloperoxidase-dependent effect of amines on functions of isolated neutrophils. *The Journal of clinical investigation*. **72**: 441-454.
- Thomas JS**, 2000. Overview of plasma proteins. In *Schalm's veterinary haematology*. Edited by: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. Lippincott, Philadelphia. 891-898.
- Tietze F**, 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical biochemistry*. **27**: 502-522.
- Tilley SL, Coffman TM, Koller BH**, 2001. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *The journal of clinical investigation*. **108**: 15-23.
- Tizard IR**, 2000. *Veterinary immunology an introduction*. Saunders company, Philadelphia.
- Tominaga T, Fukata J, Naito Y, Nakai Y, Funakoshi S, Fujii N, Imura H**, 1990. Effects of corticostatin-I on rat adrenal cells in vitro. *The journal of endocrinology*. **125**. 287-292.
- Tough DF, Sprent J**, 1994. Turnover of naïve and memory phenotype T cells. *Journal of experimental medicine*. **179**: 1127-1135.
- Tough DF, Sun S, Zhang X, Sprent J**, 1999. Stimulation of naïve and memory T cells by cytokines. *Immunological reviews*. **170**: 39-47.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J**, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. **76**: 4350-4354.
- Tracey KJ, Lowry SF, Fahey TG 3rd, Albert JD, Fong Y, Hesse D, Beutler B, Manogue KR, Calvano S, Wei H, et al.**, 1987. Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog. *Surgery, gynecology and obstetrics*. **164**: 415-422.
- Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, Nguyen HT, Kuo GC, Beutler B, Cotran RS, Cerami A, Lowry SF**, 1988. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *Journal of experimental medicine*. **167**: 1211-1227.
- Tseng CF, Lin CC, Huang HY, Liu HC, Mao SJ**, 2004. Antioxidant role of human haptoglobin. *Proteomics*. **4**: 2221-2228.

- Uchida E, Katoh N, Takahashi K**, 1993. Appearance of haptoglobin in serum from cows at parturition. *Journal of veterinary medical science*. **55**: 893-894.
- Uchida K**, 2003. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in lipid research*. **42**: 318-343.
- Underhill DM, Ozinsky A**, 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual review of immunology*. **20**: 825-852.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J**, 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and humane disease. *International journal of biochemistry and cell biology*. **39**: 44-84.
- van Arendonk JAM, Stokvisch PE, Korver S, Oldenbroek JK**, 1984. Factors determining the carcass value of culled dairy cows. *Livestock production science*. **11**: 391-400.
- van den Berg JJ, Winterbourn CC, Kuypers FA**, 1993. Hypochlorous acid-mediated modification of cholesterol and phospholipid: analysis of reaction products by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of lipid research*, vol. **34**.: 2005-2012.
- van den Berg RH, Faber-Krol MC, van Wetering S, Hiemstra PS, Daha MR**, 1998. Inhibition of activation of the classical pathway of complement by human neutrophil defensins. *Blood*. **92**: 3898-3903.
- van der Poll T, Romijn JA, Endert E, Borm JJ, Buller HR, Sauerwein HP**, 1991. Tumor necrosis factor mimics the metabolic response to acute infection in healthy humans. *American journal of physiology*. **261**: E457-E465.
- van Vollenhoven RF, Engleman EG, McGuire JL**, 1995. Dehydroepiandrosterone in systemic lupus erythematosus. Results of a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Arthritis and rheumatism*. **38**: 1826-1831.
- van Vollenhoven RF, Park JL, Genovese MC, West JP, McGuire JL**, 1999. A double-blind, placebo-controlled, clinical trial of dehydroepiandrosterone in severe systemic lupus erythematosus. *Lupus*. **8**: 181-187.
- Vella T, Dow S, Potter TA, Kappler J, Marrack P**, 1998. Cytokine-induced survival of activated T cells *in vitro* and *in vivo*. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. **95**: 3810-3815.
- Vestweber D, Blanks JE**, 1999. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiological reviews*. **79**: 181-213.
- Villareal DT, Holloszky JO, Kohrt WM**, 2000. Effects of DHEA replacement on bone mineral density and body composition in elderly women and men. *Clinical endocrinology*. **53**: 561-568.
- Vissers MCM, Winterbourn CC**, 1991. Oxidative damage to fibronectin : I. The effects of the neutrophil myeloperoxidase system and HOCl. *Arch. Biochem. Biophys.***285**: 53-59
- Von Adrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher E**, 1995. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell*. **82**: 989-999.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P**, 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation*. **10**: 45-65.
- Wakabayashi Y, Fujita H, Morita I, Kawaguchi H, Murota S**, 1995. Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in bovine carotid artery endothelial cells induced by activated neutrophils:

- involvement of adhesion molecules. *Biochimica et biophysica acta*. **1265**: 103-109.
- Wallace DC, Ye JH, Neckelmann SN, Singh G, Webster KA, Greenberg BD**, 1987. Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. *Current genetics*. **12**: 81-90.
- Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY**, 1994. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *Journal of immunology*. **152**: 5014-5021.
- Wanidworanun C, Strober W**, 1993. Predominant role of tumor necrosis factor alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *Journal of immunology*. **151**: 6853-6861.
- Warnick LD, Janssen D, Guard CL, Grohn YT**, 2001. The effect of lameness on milk production in dairy cows. *Journal of dairy science*. **84**: 1988-1997.
- Wassom DL, Gleich GJ**, 1979. Damage to *Trichinella spiralis* newborn larvae by eosinophil basic protein. *The american journal of tropical medicine and hygiene*. **28**: 860-863.
- Wassom DL, Loegering DA, Solley GO, Moore SB, schooley RT, Fauci AS, Gleich GJ**, 1981. Elevated serum levels of the eosinophil granule major basic protein in patients with eosinophilia. *The journal of clinical investigation*. **67**: 651-661.
- Weinberg A, Krisanaprakornkit S, Dale BA**, 1998. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Critical reviews in oral biology and medicine*. **9**:399-414.
- Weiss SJ**, 1989. Tissue destruction by neutrophils. *The New England journal of medicine*. **320**: 365-376.
- Wentworth P Jr, McDunn JE, Wentworth AD, Takeuchi C, Nieva J, Jones T, Bautista C, Ruedi JM, Gutierrez A, Jada KD, Babior BM, Eschenmoser A, Lerner RA**, 2002. Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science*. **298**: 2195-2199.
- Werr J, Xie X, Hedqvist P, Ruoslahti E, Lindbom L**, 1998. β_1 integrins are critically involved in neutrophil locomotion in extravascular tissue *in vivo*. *The journal of experimental medicine*. **187**: 2091-2096.
- White AC, Thannickal VJ, Fanburg BL**, 1994. Glutathione deficiency in human disease. *Journal of nutrition and biochemistry*. **5**: 218-226.
- Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW**, 1993. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *The biochemical journal*. **296**: 557-561.
- Wientjes FB, Panayotou G, Reeves E, Segal AW**, 1996. Interactions between cytosolic components of the Nadph oxidase: p40phox interacts with both p67phox and p47phox. *The biochemical journal*. **317**: 919-924.
- Wilder RL**, 1996. Hormones and autoimmunity: animal models of arthritis. *Bailliere's clinical rheumatology*. **10**: 259-271.
- Winterbourn CC**, 1985. Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of the oxidant to hypochlorite", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 840, no. 2, pp. 204-210.
- Winterbourn CC**, 1992. Dietary selenium. *The New Zealand medical journal*. **105**: 946-481.

- Winterbourn CC**, 2002. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology*. **181-182**: 223-227.
- Wise Th, Caton D, Thatcher WW, Lehrer AR, Fields Mj**, 1982. Androstenedione, dehydroepiandrosterone and testosterone in ovarian vein plasma and androstenedione in peripheral arterial plasma during the bovine oestrus cycle. *Journal of reproduction and fertility*. **66**: 513-518.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B**, 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uraemia. *Kidney international*. **49**: 1304-1313.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B**, 1998. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *Immunology*. **161**: 2524-2532.
- Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Jungers P, Drüeke TB, Descamps-Latscha B**, 1999. Advanced oxidation protein products as novel molecular basis of oxidative stress in uraemia. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. **14**: 76-78.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L**, 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. **80**: 617-653.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND**, 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *The journal of nutrition*. **134**: 489-492.
- Xie Q, Nathan C**, 1994. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *Journal of leukocyte biology*. **56**: 576-582.
- Xiong YQ, Kupferwasser LI, Zack PM, Bayer AS**, 1999. Comparative efficacies of liposomal amikacin (MiKasome) plus oxacillin versus conventional amikacin plus oxacillin in experimental endocarditis induced by *Staphylococcus aureus*: microbiological and echocardiographic analyses. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **43**: 1737-1742.
- Yakes FM, Van Houten B**, 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. **94**: 514-519.
- Yamada J, Sakuma M, Suga T**, 1992. Induction of peroxisomal beta-oxidation enzymes by dehydroepiandrosterone and its sulfate in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochimica et biophysica acta*. **11**: 231-236.
- Yan LJ, Traber MG, Kobuchi H, Matsugo S, Tritschler HJ, Packer L**, 1996. Efficacy of hypochlorous acid scavengers in the prevention of protein carbonyl formation. *Archives of biochemistry and biophysics*. **327**: 330-334.
- Yan, L. & Sohal, R.S.** 1998. Gel Electrophoretic Quantitation of Protein Carbonyls Derivatized with Tritiated Sodium Borohydride. *Analytical Biochemistry*. **265**:176-182.
- Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schroder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ**,

1999. B-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. **286**: 525-528.
- Yao L, Pan J, Setiadi H, Patel KD, McEver RP**, 1996. Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. *The journal of experimental medicine*. **184**: 81-92.
- Yoshida Y, Itoh N, Hayakawa M, Piga R, Cynshi O, Jishage K, Niki E**, 2005. Lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride and its inhibition by antioxidant as evaluated by an oxidative stress marker, HODE. *Toxicology and applied pharmacology*. **208**: 87-97.
- Zamze S, Martinez-Pomares L, Jones H, Taylor PR, Stillion RJ, Gordon S, Wong SY**, 2002. Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. *The journal of biological chemistry*. **277**: 41613-41623.
- Zhan S, Vazquez N, Zhan S, Wientjes FB, Budarf ML, Schrock E, Ried T, Green ED, Chanock SJ**, 1996. Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the p40-phox, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex. *Blood*. **88**: 2714-2721.
- Zhang Z, Araghi-Niknam M, Liang B, Inserra P, Ardestani SK, Jiang S, Chow S, Watson RR**, 1999. Prevention of immune dysfunction and vitamin E loss by dehydroepiandrosterone and melatonin supplementation during murine retrovirus infection. *Immunology*. **96**: 291-297.
- Zhao X, Lacasse P**, 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Journal of animal science*. **86**: 57-65.
- Zlotnik A, Yoshie O**, 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. **12**: 121-127.