

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Sede Consorzziata: Fondazione Callerio Onlus, Università degli Studi di Trieste

Dipartimento di Scienze del Farmaco

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : SCIENZE FARMACOLOGICHE

INDIRIZZO: FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA E TERAPIA

CICLO: XXV

STUDIO DEL LISOZIMA NEL CONTESTO DELLA NEFROPATIA DIABETICA

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Pietro Giusti

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Pietro Palatini

Supervisore :Ch.mo Prof. Gianni Sava

Dottorando : Davide Gallo

A Nicole
Alla mia famiglia

Introduzione

1. Introduzione

1.1 Il diabete e le sue complicanze

Il diabete mellito è una malattia caratterizzata da disordini metabolici, accomunati da uno stato di iperglicemia cronica a cui i pazienti sono soggetti (Fowler et al., 2008). Il diabete è uno stato patologico particolarmente invalidante di forte impatto a livello mondiale e di grande rilievo socio-economico per l'entità della sua distribuzione e la gravità delle sue complicanze. Una stima della *World Health Organisation* (WHO), ha attestato, nel settembre 2012, a 347 milioni i malati di diabete nel mondo (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>). Sempre secondo la WHO, nel 2004 i pazienti deceduti per cause associabili al diabete sono stati 3,4 milioni e, proiezioni riferite al 2030, prevedono un incremento di due terzi di questa cifra in un periodo compreso tra il 2008 e il 2030.

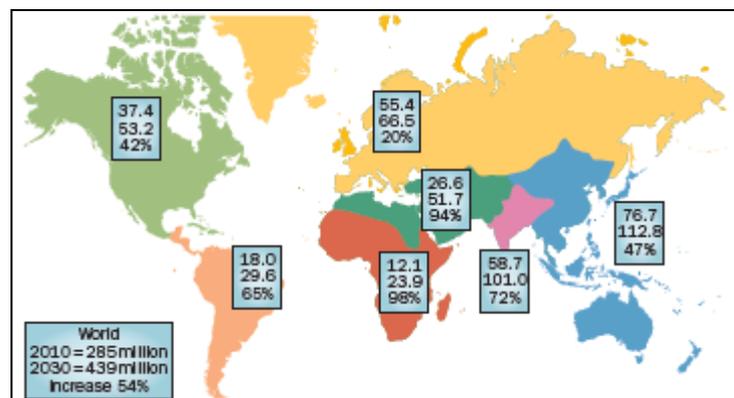


Figura 1: Casi di diabete nel 2010 e proiezioni per il 2030 (Chen et al., 2011)

Come accennato in precedenza, l'impatto economico che il diabete ha sui Servizi Sanitari Nazionali è rilevante. I dati pubblicati dalla WHO danno la misura del problema: il costo totale della salute di una persona malata di diabete, sfiora il doppio o il triplo del costo di una persona normoglicemica.

L'impatto economico del diabete non è da attribuire solo alle cure portate ai pazienti (costi diretti), ma anche alla riduzione della

1. Introduzione

produttività ad esso associata (costi indiretti) e al peggioramento della qualità della vita (costi intangibili) (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs236/en/>).

Vista la cronicità e l'attuale incurabilità del diabete, gran parte degli sforzi economici degli stati sono orientati al trattamento delle complicanze ad esso associate (Williams et al., 2002). Le complicanze diabetiche, strettamente correlate all'iperglicemia cronica, si distinguono in due principali gruppi: complicanze macrovascolari e microvascolari. Alle prime appartengono malattie coronariche, malattie alle arterie periferiche ed infarto, mentre alle seconde nefropatia diabetica, neuropatia e retinopatia (Fowler, 2008).

Tabella 1: Complicanze croniche associate al diabete e potenziali effetti sull'economia (Williams et al., 2002).

System affected	Disease	Potential economic implications
Eyes	Retinopathy, Glaucoma Cataracts Blindness	Photocoagulation therapy Social assistance, loss of productivity Cataract removal surgery. Drug therapy
Blood vessels	Coronary artery disease (CAD) Cerebral vascular disease (CVD) Peripheral vascular disease (PVD) Hypertension	Drug therapy Emergency hospitalization Hospitalisation Surgical interventions (CABG, PTCA) Home help/living assistance Death – loss of productivity
Kidneys	Renal insufficiency Kidney failure	Drug therapy Hospitalisation – Dialysis Renal transplantation Death – loss of productivity
Nerves	Neuropathies Autonomic neuropathy	Drug therapy Orthotics Hospitalisation – Surgery Rehabilitation Hospitalisation
Skin , Muscle, Bone	Advanced infections Cellulitis Gangrene Amputation	Drug therapy Orthotics Hospitalisation – Surgery Rehabilitation

1. Introduzione

1.2 La nefropatia diabetica

Nell'arco di questo Dottorato di Ricerca, l'attenzione è stata focalizzata sulla nefropatia diabetica. La nefropatia diabetica è considerata la principale causa di malattie renali terminali in America e nell'Occidente sviluppato (US Renal Data System, 2007). La nefropatia è caratterizzata dall'incremento delle proteine escrete con l'urina: la fase precoce è caratterizzata da un piccolo aumento dell'albumina nelle urine ed è nota come fase della microalbuminuria o della nefropatia incipiente. La malattia più avanzata è definita, invece, dalla presenza di macroalbuminuria o proteinuria, alla quale fa seguito l'ultima fase, definita nefropatia conclamata (Zelmanovitz et al., 2009).

Dal punto di vista patogenetico, le principali alterazioni alla base dell'insorgenza e progressione della nefropatia, si manifestano a carico glomerulare e tubulare (Nielsen et al., 2009).

La membrana basale glomerulare (GBM) fornisce il supporto strutturale primario per la funzionalità glomerulare. I podociti, formano la barriera finale nei confronti della perdita di proteine. Proprio questo ruolo cruciale correla il danno podocitario ad una marcata proteinuria (Asanuma et al., 2003). Tuttavia, pur essendo il danno glomerulare particolarmente studiato, evidenze sperimentali stanno mettendo in evidenza l'importante ruolo svolto dal danno tubulare nella progressione della nefropatia (Magri et al., 2009). La proteinuria tubulare precede la microalbuminuria ed, inoltre, la nefropatia diabetica è correlata con *marker* urinari di danno tubulo-interstiziale (L-FABP, liver-type fatty acid-binding protein) (Ginevri et al., 1993). Il tubulo prossimale gioca un ulteriore ruolo cruciale nella patogenesi nella nefropatia, essendo suscettibile ad una grande varietà di stimoli metabolici ed emodinamici associati al diabete, in particolar modo all'iperglicemia. Il glucosio, infatti, transita a livello tubulare, mediante una via insulino-indipendente, rendendo le cellule tubulari particolarmente sensitive agli effetti deleteri dello stato cronicizzato di iperglicemia (Thomas et al., 2005).

1. Introduzione

I principali fattori di rischio per lo sviluppo della nefropatia sono di carattere metabolico (iperglicemia, denominatore comune a tutte le complicanze diabetiche) e emodinamico (ipertensione arteriosa) (Kanwar et al., 2008). Una volta presente la nefropatia, alcuni fattori possono favorirne la progressione, portandola agli stadi più avanzati. Tra gli altri, spiccano l'iperglicemia (The Microalbuminuria Collaborative Study Group, 1999; Gall et al., 1997; Ravid et al., 1998), il fumo (Forsblom et al., 1998; Ravid et al., 1998), la dieta (Toeller et al., 1997) e fattori genetici (Krolewski, 1999; Krolewski et al., 2001).

Dal punto di vista terapeutico, esistono perlopiù strategie che rallentano la progressione della nefropatia diabetica. Gli approcci "classici", in tal senso, sono rappresentati da uno stretto controllo glicemico o dall'utilizzo di farmaci mirati al controllo pressorio, alcuni sviluppati per agire a livello di sistema renina-angiotensina (RAS) (ACE-inibitori, antagonisti dell'aldosterone) e altri RAS-indipendenti (diuretici, beta-bloccanti) (Abdel-Rahman et al., 2011). Tuttavia, negli ultimi anni stanno emergendo nuove strategie terapeutiche, quali farmaci che agiscono su molecole particolarmente coinvolte nel danno renale diabetico, come i prodotti finali della glicosilazione avanzata (AGE).

Tabella 2: Strategie terapeutiche per il trattamento della nefropatia diabetica (Abdel-Rahman et al., 2011).

Current therapy	Emerging therapy
1- Intensive glucose control	1. TZDs/PPAR-gamma agonists
a- Medication	2. ACE-2
b- Pancreatic transplantation	3. Endothelin blockers
2- Blood Pressure Control	4. AGEs inhibitor
a- Affectin RAAS:	5. Vitamin D activation
i. ACEi	6. Inflammation modulation
ii. ARBs	
iii. Renin inhibitors	
b- Not affectin RAAS:	
i. CCB	
ii. Beta blockers	
iii. Diuretics	
3- Dyslipidemia and lipid-lowering drugs	
4- Multifactorial intervention	

1. Introduzione

1.3 AGE e terapia anti-AGE

I prodotti finali della glicosilazione avanzata (AGE) sono un gruppo chimicamente eterogeneo di macromolecole, ad attività altamente ossidante, coinvolte significativamente nel diabete e in molte altre malattie croniche (Browlee, 2001; Ulrich et al., 2001; Vlassara et al., 2004; Goldin et al., 2006; Huebschmann et al., 2006; Bohlender et al., 2005). La formazione degli AGE inizia mediante una reazione non-enzimatica, nota come reazione di Maillard (o *browning reaction*), tra zuccheri riducenti e gruppi amminici liberi di proteine, lipidi o acidi nucleici (O'Brien et al., 1989). La formazione degli AGE avviene in condizioni fisiologiche nell'arco di tutta la vita, ma risulta drammaticamente incrementata nei pazienti affetti da diabete a causa dell'iperglicemia cronica che li caratterizza.

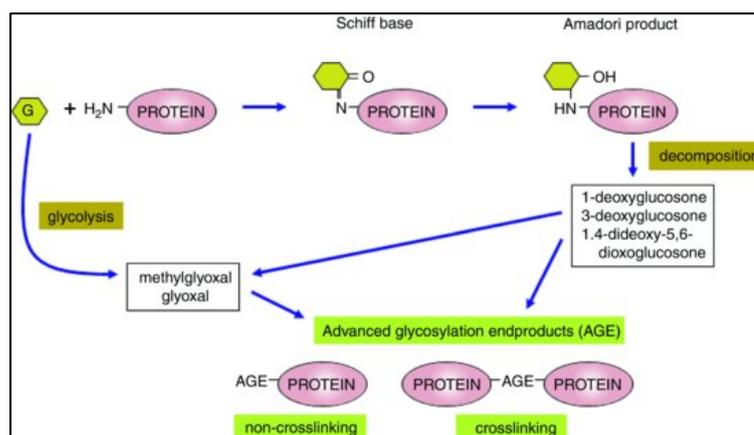


Figura 3: Meccanismo di formazione degli AGE (Vallon et al., 2011)

Il *pool* di AGE in circolo non dipende quantitativamente solo dalla formazione endogena, ma viene incrementato con la dieta. Gli AGE sono naturalmente presenti in numerosi cibi non cotti, derivati dagli animali, ed, inoltre, la cottura stessa o i processi termici a carico dei cibi determinano un incremento delle concentrazioni di AGE (Uribarri et al., 2010; O'Brien et al., 1989; Goldberg et al., 2004).

1. Introduzione

Gli effetti patologici degli AGE sono correlati alla loro abilità di legare irreversibilmente le proteine a lento turnover, alterandone struttura e funzionalità (Eble et al., 1983; Vlassara, 2001; Schmidt et al., 1999). Inoltre, essi sono in grado di promuovere stress ossidativo e risposte infiammatorie, interagendo con dei recettori di membrana, tra cui il meglio caratterizzato è RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End Products*).

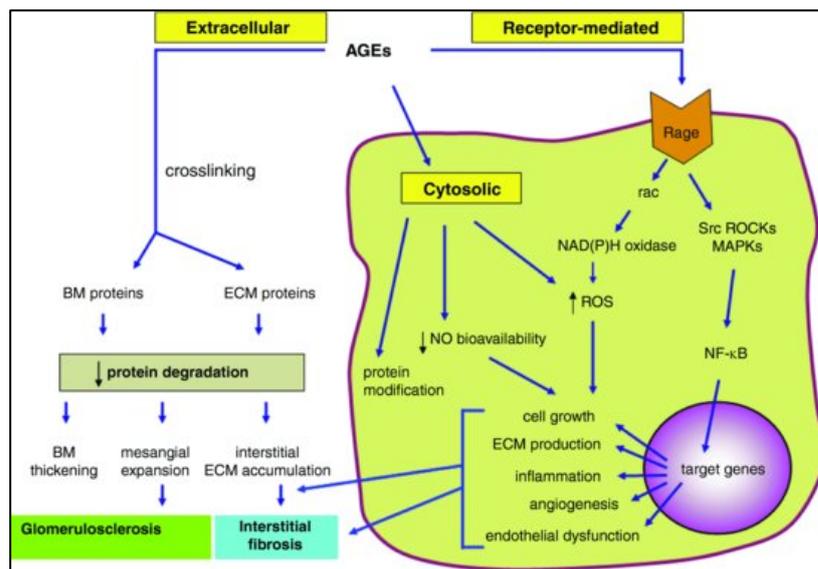


Figura 4: Gli effetti indotti dagli AGE dipendono dal cross-link con proteine a lento turnover e dall'interazione con dei recettori di membrana, tra cui RAGE è il più noto (Vallon et al., 2011).

Di particolare interesse è l'interazione AGE-RAGE, evento alla base di numerosi effetti patologici associati agli AGE. Questa interazione modula eventi molecolari, quali l'espressione di molecole di adesione e l'espressione di molecole proinfiammatorie/protrombotiche, come VCAM-1; ed eventi tissutali quali la produzione di collagene e la migrazione, la proliferazione e l'espressione di molecole in grado di modificare la matrice extracellulare (Ramasamy et al., 2005). Un effetto particolarmente marcato è la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Studi focalizzati sulla *pathway* AGE-RAGE hanno evidenziato che questa interazione, attraverso l'attività di NADPH

1. Introduzione

(Yamagishi, 2011), è in grado di attivare la cascata delle MAPK e di indurre un *target* chiave delle ROS a livello cellulare, cioè l'attivazione del fattore trascrizionale NF- κ B (Yan et al., 1994). NF- κ B è implicato nella trasduzione di una varietà di segnali infiammatori, pro- ed anti-apoptotici, oltre ad up-regolare lo stesso RAGE (Ramasamy et al., 2005).

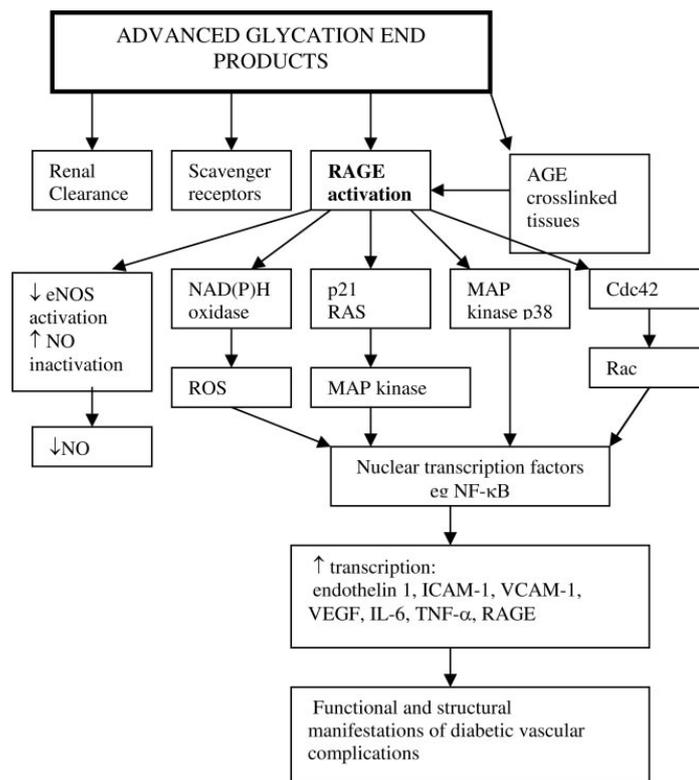


Figura 5: Effetti degli AGE focalizzati sull'interazione AGE-RAGE (Goh et al., 2008).

Visto il rilevante ruolo attribuito agli AGE nello sviluppo e progressione delle complicanze diabetiche, molte linee di ricerca hanno rivolto l'attenzione allo sviluppo di agenti terapeutici in grado di agire riducendo gli effetti AGE-indotti. Un primo possibile approccio consiste nella riduzione dell'assunzione di AGE mediante la dieta (Vlassara et al., 2002). Sono noti, poi, ulteriori interventi terapeutici: terapie che hanno come *target* l'inibizione della formazione di AGE; agenti in grado

1. Introduzione

di rompere i legami AGE-proteina; molecole in grado di bloccare RAGE e altre in grado di aumentare la *clereance* degli AGE (Goh et al., 2008).

Tra gli inibitori della formazione di AGE emerge l'amminoguanidina (Brownlee et al., 1986); tra gli agenti in grado di rompere il cross-link tra AGE e proteine, il più noto è l'alagebrium (3-phenylacyl-4,5-dimethylthiazolium chloride) (Forbes et al., 2001; Peppia et al., 2006); tra i RAGE-bloccanti spiccano anticorpi anti-RAGE o forme solubili di RAGE in grado di legare il recettore (Goh et al., 2008), mentre tra i composti *scavenger* degli AGE, il lisozima è il principale protagonista (Zheng et al., 2001; Cocchietto et al., 2008).

Tabella 3: Strategie terapeutiche anti-AGE (Goh et al., 2008).

Action	Compound/therapeutic agent	Effect in animal studies	Human/clinical trials (phase)	Safety concerns/advers effects
Inhibition of AGE formation	Aminoguanidine	↓ Neuropathy ↓ Nephropathy ↓ Retinopathy	↓ Nephropathy ↓ Retinopathy (III)	Glomerulonephritis ↓ Vit B6 ↓ iNOS
	ALT-946	↓ Nephropathy ↓ Renal AGE		
	Pyridoxamine	↓ Nephropathy ↓ Retinopathy ↓ Cholesterol ↓ Weight		
	OBP-9195	↓ Nephropathy ↓ Stenosis after vascular injury		↓ Vit B6
	LR-90	↓ BP ↓ Nephropathy ↓ Oxidative stress ↓ ECM fibrosis		Weight gain
Putative cross-link breakers	PTB	↓ AGE		
	Alagebrium (ALT-711)	↓ Nephropathy ↓ BP	↓ Arterial stiffness ↓ Pulse pressure ↑ Diastolic heart function (III)	
RAGE blockade	Anti-RAGE F(ab') ₂ and sRAGE	↓ Nephropathy		
AGE clereance	Lysozyme	↓ Atherogenesis ↓ Neuropathy ↓ Nephropathy ↓ AGE ↓ Atherosclerosis		
Reducing exogenous exposure	Low-AGE diet		↓ AGE ↓ CRP	

BP, Blood pressure; CRP, C-reactive protein; iNOS, inducible nitric oxide synthase; Vit B6, vitamin B6

1.4 Il lisozima

Il lisozima (1, 4 – β - N- acetil- muramidasi), enzima scoperto da Fleming nel 1922 (Fleming et al., 1922), è una proteina globulare di 129

1. Introduzione

amminoacidi pressoché ubiquitaria essendo presente in numerosi fluidi biologici.

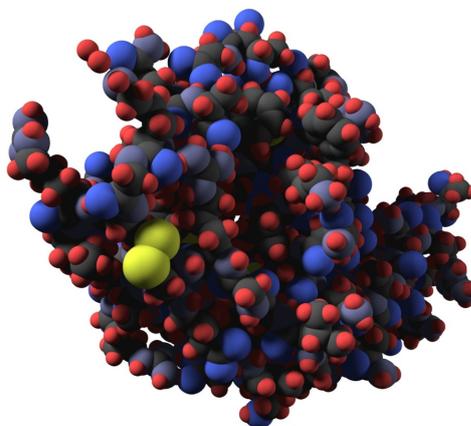


Figura 6: Struttura tridimensionale del lisozima

Il lisozima è noto per la sua attività batteriolitica, derivante dalla sua capacità di lisare il peptidoglicano batterico, agendo tra il C-1 dell'acido N- acetilmuramico (MurNAc) ed il C-4 dell'N-acetil-D-glucosammina (GlcNAc).

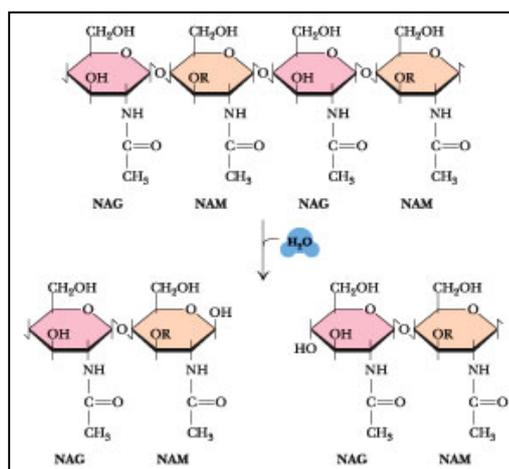


Figura 7: Meccanismo d'azione del lisozima nei confronti del peptidoglicano

Oltre ad essere una muramidasi, il lisozima presenta attività immunomodulante (Jolles, 1996; Pacor et al., 1996; Zorzini et al., 2006) e ha mostrato proprietà interessante nel contesto della terapia

1. Introduzione

antitumorale (Sava et al., 1988; Sava et al., 1989; Cocchietto et al., 2008).

Più recentemente, sono state evidenziate proprietà del lisozima che hanno aperto nuove prospettive per un suo possibile impiego nel contesto della patologia diabetica.

1.4.1 Lisozima, AGE e nefropatia diabetica

A partire dalla seconda metà degli anni '90, sono stati condotti degli studi che hanno definito i presupposti scientifici per un possibile utilizzo del lisozima nel contesto della nefropatia diabetica (Li et al., 1995). Da tali studi è emerso che il lisozima, in un *range* di concentrazioni fisiologiche (4-9 µg/ml), era in grado di legare gli AGE, in modo reversibile, con una K_d pari a 50 nM (Zheng et al., 2001).

Un'ulteriore ricerca ha evidenziato, mediante l'utilizzo di una matrice funzionalizzata con il lisozima, che questo enzima era in grado di ridurre i livelli serici di AGE in pazienti diabetici (Mitsuashi et al., 1997).

Zheng e colleghi, (Zheng et al., 2001), hanno condotto degli studi *in vivo* ed *in vitro* per investigare l'azione del lisozima nei confronti degli AGE. I risultati ottenuti *in vivo* hanno dimostrato che il lisozima era in grado di ridurre gli elevati livelli di AGE circolanti, grazie ad un aumento della *clearance* renale. Dagli studi *in vitro*, effettuati su macrofagi in presenza di lisozima, è emerso che il legame specifico degli AGE alla superficie cellulare era significativamente incrementato e che il lisozima era in grado di contrastare l'aumentata produzione di TNF α AGE-indotta. Studi su cellule mesangiali, hanno poi dimostrato che il lisozima era in grado di inibire l'aumentata espressione di fattori quali PDGF-B o collagene di tipo IV α_1 , associati alla disfunzione renale.

A implementare questa serie di studi, una più recente ricerca (Cocchietto et al., 2008), ha dimostrato che il lisozima è in grado di prevenire l'insorgenza di alcune delle principali manifestazioni precoci

1. Introduzione

della nefropatia diabetica, quali microalbuminuria ed ipertrofia glomerulare.

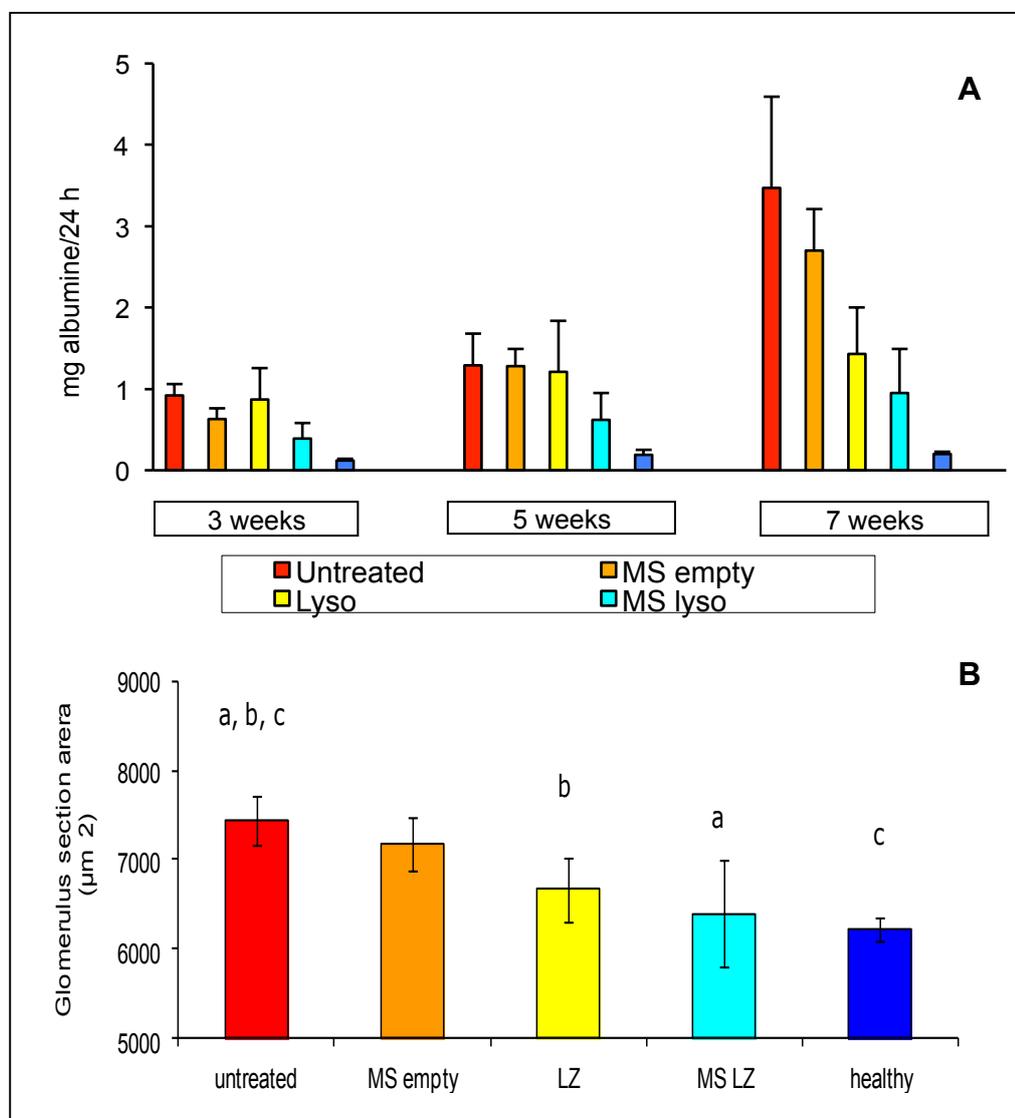


Figura 8: Pannello A: Effetto del lisozima microincapsulato, somministrato oralmente a 3, 5 e 7 settimane dall'inizio del trattamento, sulla concentrazione urinaria di albumina in ratti diabetici.

Pannello B: Effetto del lisozima microincapsulato, somministrato oralmente sul livello di ipertrofia glomerulare in ratti diabetici. L'ipertrofia glomerulare è stata misurata mediante analisi morfometrica di preparati istologici.

In questo lavoro il lisozima microincapsulato, è stato somministrato oralmente e per 7 settimane in un modello preclinico di ratti con diabete indotto mediante streptozotocina. È verosimile

1. Introduzione

supporre che, almeno in parte, l'effetto nefroprotettivo descritto sia correlato all'abilità del lisozima di sequestrare ed eliminare gli AGE per via renale. Tuttavia, l'azione del lisozima potrebbe non essere limitata al solo effetto *scavenger* anti-AGE dell'enzima stesso, ma dovuta anche a meccanismi molecolari in grado di bilanciare gli effetti indotti dagli AGE stessi, quali l'upregolazione del recettore RAGE o fenomeni ossidativi/infiammatori.

1.5 Somministrazione orale e microincapsulazione

Come precedentemente esposto, la ricerca è focalizzata nello sviluppo di trattamenti in grado di rallentare in maniera significativa l'avanzamento della patologia. Parallelamente, gran parte dell'interesse delle industrie farmaceutiche è indirizzato allo sviluppo di prodotti adatti alla somministrazione orale. La via di somministrazione orale, infatti, è quella con la maggior *compliance* dei pazienti essendo meno invasiva e di più semplice utilizzo. Accanto agli indubbi benefici, i trattamenti orali presentano anche dei limiti associati perlopiù alle caratteristiche strutturali e funzionali del tratto gastro-intestinale. I bassi valori di pH a livello gastrico ed i processi digestivi enzimatici ecc, infatti, sono associati a ridotto assorbimento o efficacia dei principi attivi.

Per ovviare a questi effetti limitanti si può ricorrere a diverse strategie, tra le quali la microincapsulazione (Cap 1.4.1). Presso i laboratori della Fondazione Callerio Onlus, è stato sviluppato e brevettato un microsistema costituito da componenti naturali per la veicolazione orale di principi biologicamente attivi (Cocchietto et al., 2008) (Brevetto Internazionale WO2005/013941).

Il microsistema è composto da una matrice di alginato ed idrossipropilmetilcellulosa contenente lisozima. Essa è rivestita da chitosano che conferisce caratteristiche di muco adesività. Il vantaggio di questo tipo di microsistemi è che, oltre ad essere completamente naturali, sono in grado di resistere a diversi processi enzimatici e ai livelli di acidità dello stomaco. Il meccanismo col quale il lisozima viene

1. Introduzione

rilasciato è pH-dipendente e consente alla particella ed al suo contenuto di arrivare intatti all'intestino dove il pH basico fa sì che la microsfera rilasci il principio.

1.6 *In vivo* o *in vitro*, questo è il problema

Gli studi su modelli *in vivo* rivestono un ruolo centrale nella ricerca scientifica. L'impiego di questi modelli risulta fondamentale per lo studio e la comprensione delle malattie o per studi di carattere farmacologico per quanto concerne tossicità o attività di molecole candidate (Robinson, 2005).

Va tuttavia considerato che i modelli *in vivo* pongono alcuni importanti questioni di carattere etico e scientifico.

Dal punto di vista etico, un ruolo centrale, nello svolgimento dei protocolli sperimentali, spetta al rispetto del "principio delle 3R", il cui significato è:

- Rimpiazzo, cioè l'utilizzo di modelli non-animale, quali colture cellulari, *computer modelling*.
- Raffinamento, cioè l'utilizzo di metodi che allevino o minimizzino potenziali dolori e sofferenze e che accrescano il benessere degli animali per i casi in cui non possono essere rimpiazzati.
- Riduzione, cioè l'utilizzo di metodi che permettano ai ricercatori di ottenere un numero comparabili di informazioni con l'uso di un minor numero di animali, o un maggior numero di informazioni con lo stesso numero di animali (Robinson, 2005).

Dal punto di vista scientifico, il principale limite è dato dal fatto che i modelli animali offrono solo una ragionevole approssimazione della patologia umana e non possono riprodurla esattamente. I modelli preclinici danno un contributo fondamentale nella comprensione dei meccanismi patologici e dei trattamenti farmacologici ma rappresentano un modello non direttamente trasferibile all'uomo (Garattini, 2006).

1. Introduzione

In accordo con i principi etici delle 3R e come conseguenza dei limiti scientifici attribuibili ai modelli *in vivo*, appare opportuno un utilizzo dei modelli *in vitro*. Questi modelli, pur avendo dei limiti intrinseci (cellule immortalizzate possono avere caratteristiche diverse dalle cellule dell'organo o tessuto che rappresentano; assenza del microambiente) (Brandon et al., 2003; Wang et al., 2005), sono utili per integrare i dati ottenuti *in vivo* e per limitare al minimo indispensabile l'utilizzo dei modelli animali nella ricerca scientifica. Proprio per queste ragioni, i modelli *in vitro* per decenni hanno rappresentato, e tuttora rappresentano, la tecnica di studio maggiormente impiegata nella ricerca scientifica (Arnaud et al., 2007).

Scopo della ricerca

2. Scopo della ricerca

2. Scopo della ricerca

La cronicità e l'attuale incurabilità del diabete hanno fatto sì che gran parte degli sforzi della ricerca siano stati orientati al trattamento delle complicanze associate al diabete. Tra le diverse complicanze, la nefropatia diabetica, considerato il suo impatto sull'economia e la qualità della vita (è la principale causa di malattie renali terminali e una delle patologie maggiormente invalidanti) risulta di particolare interesse.

È in questo contesto che viene a collocarsi il presente lavoro di tesi che costituisce una parte di un progetto di più ampio respiro, volto all'investigazione degli aspetti molecolari alla base dell'azione nefroprotettiva del lisozima nel contesto della nefropatia diabetica, attività identificata da recenti studi *in vitro* (Zheng et al., 2001) ed *in vivo* (Zheng et al., 2001; Cocchietto et al., 2008).

Per perseguire l'obiettivo è stato messo a punto un modello cellulare adeguato, sensibile ai trattamenti con gli AGE, con il fine di studiare gli effetti del lisozima su eventi AGE-indotti. Nella fattispecie le cellule HK-2, ottenute da tubulo prossimale umano, sito dove l'iperglicemia esercita gran parte delle sue alterazioni patologiche.

Per l'investigazione di alcuni significativi aspetti molecolari alla base dell'attività nefroprotettiva del lisozima nel contesto della nefropatia diabetica è stato ricercato un *marker* di effetti AGE-indotti sul quale il lisozima potesse agire. La selezione del *marker*, avvenuta tra diverse possibili *pathway* citotossiche associate all'interazione AGE-RAGE, ha evidenziato il ruolo centrale rivestito dall'interleuchina IL-6. In base alla rilevanza di IL-6, ci si è focalizzati sulla capacità del lisozima di agire su *pathway* direttamente correlate ad IL-6, quali p38 o la degradazione lisosomiale.

Considerando che i pregressi studi *in vivo* hanno dimostrato la maggior efficacia del lisozima microincapsulato rispetto ad un equidose di lisozima somministrato libero, è stato inoltre allestito un modello *in vivo* al fine di verificare se la maggior efficacia del lisozima microincapsulato fosse dovuta alla capacità dei microsistemi di veicolare nel circolo

2. Scopo della ricerca

emativo il principio terapeutico più efficacemente rispetto a quanto non avvenga con la forma libera.

Materiali e metodi

3. Materiali e metodi

3.1 Materiali utilizzati

Sigma- Aldrich® Chemical Co., St. Louis, MO, USA

Acido tricloroacetico (TCA)

Acrilamide

Albumina serica bovina (BSA)

Ammonio persolfato (APS)

Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (AMP) ciclico

β-mercaptoetanolo

Bisacrilamide

BSA fatty acid free, low endotoxin

Cristal violetto

Dimetilsolfossido (DMSO)

Eparina

Siero umano (NHS)

Fattore di crescita endoteliale (EGF)

Glicerolo

Glicina

Glutaraldeide

Holo-Transferrina

Idrocortisone

Insulina da pancreas suino

Micrococcus luteus

N,N,N',N' tetrametilendiamina (TEMED)

Primer per RT-PCR

Prostaglandina E₁ (PGE₁)

RPMI 1640

Sodio Selenite

Sodiododecilsolfato (SDS)

Solforodamina B (SRB)

Tris-HCl pH 6,8

TrizmaBase Tween-20

3. Materiali e metodi

2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (ABAP)

3, 3', 5, 5' – Tetrametilbenzidina (TMB)

3, 3', 5 – Triiodo – L – Tironina (T3) 5 pg/ml

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

Euroclone®, Devon, UK

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose

Ham's F12

L-Glutamina

Medium 199

Penicillina/Streptomicina

Siero fetale di vitello neonato (NBCS)

Siero fetale di vitello (FCS)

2', 7' – diidrodiclorofluoresceina diacetato (H₂DCFDA)

Antibiotics s. p. a., Carlo Erba Reagenti, Rodano, Milano, Italia

Acido acetico glaciale

Chitosano

Cloruro di calcio

Etanolo

Fluoresceina isotiocianato (FITC)

Idrossipropilmetilcellulosa (HPMC)

Sodio Alginato

Rodamina B

3.2 Linee Cellulari

In questo lavoro di dottorato sono state utilizzate: una coltura primaria di cellule umane di endotelio del microcircolo dermico (adult dermal microvascular endothelial cells, ADMEC), una linea cellulare di tubulo prossimale renale suino (LLC-PK₁), una linea cellulare di tubulo prossimale renale umano (HK-2), una linea cellulare di monociti umani (U937).

3. Materiali e metodi

3.2.1 Cellule umane di endotelio del microcircolo dermico ADMEC

La coltura primaria ADMEC, gentilmente fornita dalla Dott.ssa F. Bossi (Dip. Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste), è stata isolata da biopsie di pelle umana. Le cellule non sono in grado di sintetizzare la matrice extracellulare e per questo motivo i supporti sui quali le cellule vengono fatte aderire, sono stati rivestiti con fibronectina (20 µg/ml).

Terreno di coltura
Medium 199
NBCS 5%
NHS 5%
EGF 3 mg/ml
Eparina 2,5 mg/ml
Idrocortisone 500 µg/ml
AMP ciclico 25 mg/ml
Penicillina/Streptomicina 1%

3.2.2 Linea cellulare di tubulo prossimale renale suino LLC-PK1

La linea cellulare LLC-PK₁, gentilmente fornita dalla Prof.ssa G. de Corti (Dip. Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste), è stata isolata da reni di suino maschio Hampshire ed è caratterizzata dalla morfologia tipica delle cellule epiteliali (Hull et al., 1976).

Terreno di coltura
Medium 199
FCS 10%
L-Glutamina 1%
Penicillina/Streptomicina 1%

3. Materiali e metodi

3.2.3 Linea cellulare di tubulo prossimale renale umano HK-2

La linea cellulare HK-2, gentilmente fornita dalla Prof.ssa R. Bulla (Dip. Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste), è una linea di cellule epiteliali tubulari umane immortalizzate con il retrovirus ricombinante HPV 16. Le cellule HK-2 mantengono le caratteristiche funzionali dell'epitelio tubulare prossimale (Ryan et al., 1994).

Terreno di coltura

DMEM low glucose/Ham's F12 1:1

FCS deplementato 5%

Insulina 5 µg/ml

Transferrina 5 µg/ml

EGF 10 ng/ml

Sodio Selenite 5 ng/ml

Idrocortisone 5 ng/ml

T3 5 pg/ml

PGE₁ 5 pg/ml

L-Glutammina 1%

Penicillina/Streptomicina 1%

3.2.4 Linea cellulare di monociti umani U937

La linea cellulare U937, gentilmente fornita dalla Prof.ssa S. Pacor (Dip. Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste), è una linea di cellule maligne ottenute da diffusioni pleurali di pazienti con linfoma istiocitico. Le cellule U937, mantenute in sospensione, possono essere indotte alla differenziazione terminale monocitica.

Terreno di coltura

RPMI-1640

Fetal Calf Serum (FCS)

L-Glutammina 1%

Penicillina/Streptomicina 1%

3. Materiali e metodi

3.2.5 Condizioni di crescita

Le cellule utilizzate nella parte sperimentale di questa tesi sono state fatte crescere ciascuna nel proprio terreno di coltura completo specifico e mantenute in termostato-incubatore a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ e 100% di umidità relativa.

3.3 Composti utilizzati

3.3.1 Lisozima

Nell'arco di questo progetto di dottorato sono stati utilizzati i seguenti principi attivi: lisozima da bianco d'uovo (Lysoch 40000, Handary, Belgio) e lisozima umano ricombinante, gentilmente fornito dal Prof. P. Veronesi (Therapicon Srl, Milano, Italia).

3.3.2 Prodotti finali della glicosilazione avanzata (AGE)

Gli AGE-BSA sono stati preparati come descritto da Makita e colleghi (Makita et al., 1992). Una soluzione di 50 mg/ml di BSA con glucosio 0,5 M in tampone fosfato 0,2 M (pH 7,4) è stata messa ad incubare, al buio e in condizioni di sterilità, per 60 giorni. Il glucosio non legato è stato successivamente rimosso mediante dialisi prolungata in PBS. La soluzione è stata successivamente liofilizzata ottenendo una polvere di colore bruno, caratteristico degli AGE.

3.4 Test di vitalità: MTT

Il saggio MTT è un test colorimetrico che consente di misurare la vitalità cellulare e la proliferazione mediante l'analisi dell'attività mitocondriale (Moosman, 1983; Alley et al., 1988). Il saggio sfrutta l'abilità delle deidrogenasi mitocondriali di convertire l'MTT (giallo) in formazano (porpora).

3. Materiali e metodi

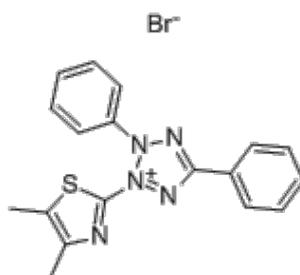


Figura 1: struttura chimica dell'MTT

Per eseguire il test, un numero appropriato di cellule è stato seminato in piastre multipozzetto (96 pozzetti). Al momento dell'analisi, in ogni pozzetto è stata aggiunta una soluzione di MTT 5 mg/ml, in ragione di un volume di 10 μ l per ogni 100 μ l di terreno. La piastra è stata poi lasciata in termostato a 37°C con il 5% di CO₂ di 100% di umidità relativa per 4 h nel caso delle linee cellulari LLC-PK₁ e HK-2 o per 24 h nel caso della coltura primaria ADMEC.

Al termine del periodo di incubazione il terreno è stato rimosso, avendo cura di non aspirare i cristalli di formazano formatasi, e si è sciolto il formazano con DMSO, 200 μ l per pozzetto. A solubilizzazione avvenuta, l'assorbanza è stata misurata ad una lunghezza d'onda di 570 nm, mediante spettrofotometro (SpectraCount™ Packard). La quantità di formazano formatasi, e quindi l'assorbanza misurata, è direttamente proporzionale al numero di cellule attive.

La vitalità cellulare è stata valutata in seguito ai trattamenti con diverse concentrazioni di AGE e lisozima effettuati per diversi tempi in terreno privato di siero.

3.5 Test di vitalità: solforodamina B (SRB)

Il saggio SRB è un test colorimetrico che permette di quantificare la vitalità cellulare, misurando il contenuto proteico di cellule in adesione e in sospensione (Skehan et al., 1990): la SRB è, infatti, un aminoxantene di colore rosa brillante che, mediante i suoi due gruppi

3. Materiali e metodi

solfonici, in condizioni leggermente acide, è in grado di legare i residui basici proteici.

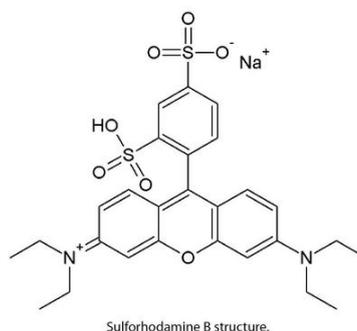


Figura 2: struttura chimica dell'SRB

Per eseguire il test, un numero appropriato di cellule è stato seminato in piastre multi pozzetto (96 pozzetti). Al momento dell'analisi, le cellule sono state fissate con 50 µl/pozzetto di acido tricloroacetico (TCA) 10% p/v per un'ora a 4°C. Alla scadenza del tempo, il TCA è stato eliminato e la piastra lavata tre volte con acqua distillata (200 µl/pozzetto). Dopo aver lasciato asciugare la piastra (circa 30'), si sono aggiunti 50 µl/pozzetto di SRB, 0,4% p/v in acido acetico 1% v/v, per 30' a temperatura ambiente. In seguito, la SRB è stata rimossa e la piastra lavata per ulteriori tre volte con acido acetico 1% v/v. Dopo aver lasciato asciugare la piastra, il colorante è stato solubilizzato con 100 µl/pozzetto di TrisBase 10 mM, ph 10,5. L'assorbanza è stata misurata mediante spettrofotometro (SpectraCount™ Packard) ad una lunghezza d'onda di 570 nm. L'assorbanza è direttamente proporzionale al contenuto di proteine delle cellule analizzate.

La vitalità cellulare è stata valutata in seguito a trattamenti con diverse concentrazioni di AGE e lisozima, in terreno senza siero, per tempi differenti.

3.6 Quantificazione dei livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Il saggio permette di quantificare i livelli intracellulari di ROS, sfruttando le proprietà chimiche del colorante 2', 7' -

3. Materiali e metodi

diidrodiclorofluoresceina diacetato (H_2DCFDA). Questa sonda è una molecola apolare che non sviluppa fluorescenza sino a quando è in forma acetilata ed è in grado di penetrare facilmente attraverso le membrane. Quando, mediante un taglio enzimatico da parte di esterasi intracellulari dei gruppi acetilici, si ottiene una forma polare della sonda (H_2DCF), questa viene trattenuta nella cellula e può essere ossidata nella forma fluorescente (DCF) per mezzo delle ROS.

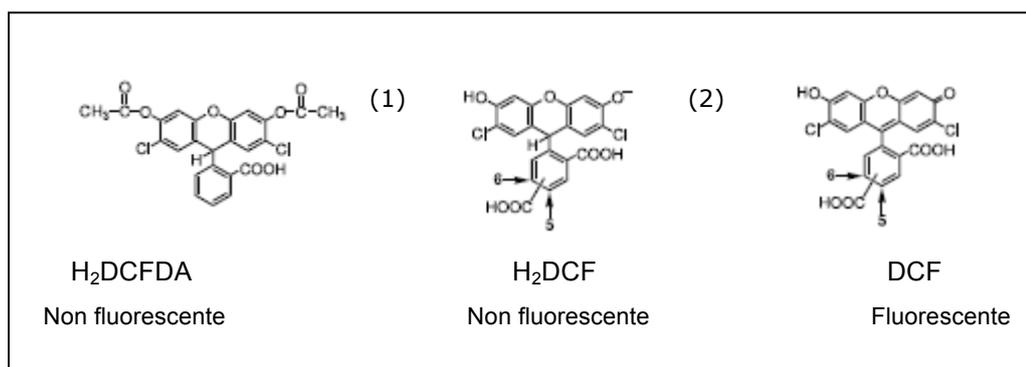


Figura 3: Idrolisi di H_2DCFDA da parte di esterasi cellulari (1) e ossidazione di H_2DCF in presenza di ROS (2)

Prima di svolgere l'esperimento sono state effettuate alcune prove preliminari al fine di determinare la concentrazione di H_2DCFDA e il tempo di ritenzione ottimali per le linee in esame. Per tutte le linee impiegate (ADMEC, LLC-PK1, HK-2), i valori ottimali sono risultati $10 \mu M$ e 1 h rispettivamente. Per eseguire il test, un numero appropriato di cellule è stato seminato in piastre multi pozzetto (96 pozzetti). Giunte all'80% di confluenza le cellule sono state trattate con AGE e LZ per diversi tempi e a diverse concentrazioni. Al termine del trattamento si è proceduto con la quantificazione delle ROS. Dopo aver rimosso l'agente trattante, è stato effettuato un lavaggio con CMF-DPBS. Successivamente, è stata aggiunta la sonda con concentrazione $10 \mu M$ per 1 h a $37^\circ C$. Nello svolgere l'esperimento sono stati adottati ulteriori controlli negativi e positivi, quali:

1. Controlli negativi: soluzione di H_2DCFDA $10 \mu M$ in assenza di cellule; cellule in DPBS senza sonda

3. Materiali e metodi

2. Controlli positivi: soluzione di H₂DCFDA 10 µM e ABAP 1 mM in presenza di cellula. L'ABAP viene utilizzato per stimolare la produzione di ROS.

La piastra è stata messa ad incubare per 1 h a 37°C. Allo scadere di questo periodo la fluorescenza è stata misurata mediante lo spettrofotometro a fluorescenza alla lunghezza d'onda di 485 nm di eccitazione e 530 nm di emissione.

3.7 Analisi dei livelli di mRNA di RAGE e IL-6: RT-PCR

La RT-PCR (real time polymerase chain reaction) è una tecnica altamente sensibile nel riconoscimento e quantificazione di RNA messaggero (mRNA) di interesse. Questa metodologia consta di due fasi: 1. Estrazione degli mRNA e sintesi del cDNA (DNA copia) a partire dall'mRNA del gene d'interesse e 2. l'amplificazione dello specifico cDNA mediante la reazione a catena polimerasica.

3.7.1 Estrazione dell'mRNA totale e sintesi del cDNA

Un numero appropriato di cellule è stato seminato in una piastra multipozzetto (24 pozzetti). Quando le cellule sono giunte all'80% di confluenza sono stati fatti i trattamenti con AGE e lisozima a diverse concentrazioni e per diversi tempi. Alla scadenza dei trattamenti, gli stessi sono stati eliminati e si è proceduto all'estrazione degli mRNA mediante il kit Euroclone® - EuroGold Total RNA kit, procedura descritta in seguito.

- 400 µL di RNA Lysis Buffer T sono stati aggiunti ad ogni pozzetto.
- A lisi completata, il lisato è stato trasferito nella *DNA Removing Column* inserita in una provetta tipo Eppendorf da 2 ml. Il dispositivo citato è caratterizzato dalla presenza di una membrana in grado di legare con alta affinità il DNA.
- Si è proceduto con una centrifugazione a 10000xg per 1' a temperatura ambiente.

3. Materiali e metodi

- La *DNA Removing Column* è stata scartata, mentre all'eluato, passato nella provetta tipo Eppendorf sottostante, è stato aggiunto un ugual volume di etanolo 70%.
- La soluzione è stata trasferita nella *PerfectBind RNA Column* inserita in un'altra provetta tipo Eppendorf da 2 ml. Questo dispositivo è in grado di legare l'RNA con alta affinità. Si è effettuata un'altra centrifugazione a 10000xg, per 1' a temperatura ambiente.
- La soluzione passata attraverso la *PerfectBind RNA Column* e raccolta nella provetta tipo Eppendorf è stata eliminata, mentre nella colonnina, inserita in un'altra provetta tipo Eppendorf, sono stati aggiunti 500 µL di *RNA Wash Buffer I*.
- Si è centrifugato a 10000xg, per 15" a temperatura ambiente. L'eluato passato oltre il dispositivo è stato eliminato, mentre nella *PerfectBind RNA Column* sono stati aggiunti 600 µL di *RNA Wash Buffer II*.
- Si è centrifugato a 10000xg per 15" a temperatura ambiente.
- I due punti precedenti sono stati ripetuti per una seconda volta.
- È stata effettuata un'ulteriore centrifugazione a 10000xg, per 1' a temperatura ambiente per asciugare la membrana.
- Il dispositivo è stato inserito in una provetta tipo Eppendorf da 1,5 ml e sono stati aggiunti 50 µL di acqua sterile *RNase-free*.
- Si è centrifugato a 5000xg, per 1' a temperatura ambiente.
- Si è eliminata il dispositivo e in ciò che è passato nella provetta tipo Eppendorf è stato aggiunto 1 µL di inibitore di *RNase* con diluizione 1:50.

Per retrotrascrivere gli mRNA estratti in cDNA è stato utilizzato un kit BioRad: in una provetta tipo Eppendorf da 0,5 ml sono stati trasferiti 1 µL di mRNA, Buffer di trascrizione 5x (diluizione finale 1x), 1

3. Materiali e metodi

μ L di trascrittasi inversa e acqua DEPC. La provetta tipo Eppendorf è stata posta nel termociclatore.

3.7.2 Amplificazione di cDNA mediante RT-PCR

Inizialmente, i *primer* (Tab 3.1) per i geni di interesse sono stati diluiti 1:10 in acqua DEPC. Per amplificare i cDNA è stato utilizzato un kit Finnzymes (Dynamo™ Flash Sybr®Green qPCR kit): in un'Eppendorf da 10 μ L sono stati posti i *primer*, la soluzione Master Mix contenente oligonucleotidi e le componenti necessarie per permettere alla polimerasi di lavorare e i cDNA.

I campioni sono stati quindi posti nella RT-PCR (Corbett, Explera, Ancona, Italia).

Tabella 3.1: *Primer* utilizzati nell'esperimento di RT-PCR

Sample	Primers	Sequence 5' → 3'	Annealing Temperature (°C)
18 S	Forward	ATCCCTGAAAAGTTCCAGCA	60°C
	Reverse	CCCTCTTGGTGAAGGTCAATG	
RAGE	Forward	GGGCAGTAGTAGGTGCTCAAA	61°C
	Reverse	CGGCCTGTGTTCCAGTTTCAT	
IL-6	Forward	GTACATCCTCGACGGCATC	60°C
	Reverse	CCAGGCAAGTCTCTCATTG	

3.8 Quantificazione di IL-6 mediante saggio ELISA

Un appropriato numero di cellule è stato seminato in piastre multipozzetto (96 pozzetti). All'80% di confluenza le cellule sono state trattate per 24 h con AGE e lisozima in diverse concentrazioni. Al termine del trattamento i sovranatanti sono stati raccolti e conservati alla temperatura di -80°C, fino al loro utilizzo.

3. Materiali e metodi

Per il saggio ELISA è stato utilizzato un kit PeproTech – Human IL-6 ELISA Development kit, descritto di seguito.

- L'anticorpo di cattura è stato diluito in PBS ad una concentrazione di 1 µg/ml e 100 µL di questa soluzione sono stati distribuiti nei pozzetti, *overnight* a temperatura ambiente.
- Successivamente, i pozzetti sono stati svuotati e, dopo 4 lavaggi con 300 µL di *Wash Buffer*, sono stati aggiunti 300 µL per pozzetto di *Block Buffer* per 1 h a temperatura ambiente.
- Al termine del periodo di incubazione sono stati effettuati 4 lavaggi con *Wash Buffer*.
- 100 µL di standard (IL-6 umana), dalla concentrazione 1 µg/ml alla concentrazione 2 ng/ml, e di sovrantanti sono stati aggiunti nei pozzetti. Si è lasciato ad incubare per 2 h a temperatura ambiente.
- Le soluzioni sono state aspirate e i pozzetti lavati per 4 volte con il *Wash Buffer*.
- 100 µL di anticorpo di riconoscimento, diluito a 0,25 µg/ml, sono stati aggiunti ad ogni pozzetti. Si è lasciato ad incubare per 2 h a temperatura ambiente.
- Successivamente, dopo aver eliminato il precedente trattamento e aver lavato la piastra per 4 volte con il *Wash Buffer*, sono stati aggiunti 100 µL di avidina coniugata con HRP diluita 1:2000 per 30', a temperatura ambiente.
- Si è eliminata l'avidina, la piastra è stata lavata 4 volte con *Wash Buffer* e, successivamente, sono stati aggiunti 100 µL per pozzetto di TMB.
- Si è osservata la variazione di intensità della colorazione e si è bloccata la reazione con acido solforico 1N (100 µL per pozzetto).
- La piastra è stata letta ad una lunghezza d'onda di 450 nm (PowerWave, X Bio-Tek Instruments, Ink).

3. Materiali e metodi

3.9 Saggio di migrazione

Il saggio di migrazione permette di misurare il potenziale migratorio di cellule, verificando la capacità di migrare attraverso un'apposita membrana verso uno stimolo chemiotattico.

Nel corso di questo esperimento è stata misurata l'abilità dei monociti umani U937, differenziati a macrofagi, di migrare verso uno stimolo rappresentato dai sovranatanti delle cellule HK-2 trattate con AGE e lisozima. Come riportato sopra, per eseguire l'esperimento è stato necessario differenziare i monociti in macrofagi. A tal fine, un numero appropriato di monociti è stato seminato in *flask* da 25 cm² e a questi è stata aggiunto PMA 50 ng/ml per indurre la differenziazione e l'adesione al supporto. Dopo 72 h di incubazione a 37°C, il terreno completo è stato sostituito con terreno privato di siero ma arricchito con BSA 0,1% per 24 h. Al termine di questo periodo, le cellule sono state raccolte e seminate in appositi inserti. Sul fondo degli inserti è presente una membrana porosa, i cui pori hanno diametro di 8 µm. Al di sotto degli inserti sono stati posti i sovranatanti derivati dal trattamento delle cellule HK-2. La piastra è stata lasciata ad incubare per 90' a 37°C. Alla scadenza di questo periodo, le cellule sono state fissate, colorate con cristal violetto e, successivamente, l'assorbanza è stata letta allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 590 nm.

3.9.1 Fissaggio e colorazione delle cellule con cristal violetto

Al termine del periodo di incubazione, si rimuove il terreno dalla piastra e dagli inserti. Con l'ausilio di un tampone, le cellule che non hanno migrato e che quindi si trovano sulla parte superiore della membrana dell'inserto vengono eliminate, mentre quelle rimaste nel filtro vengono fissate utilizzando la glutaraldeide (700 µL per pozzetto) ad una concentrazione di 1,1% per pozzetto. Dopo 15', tempo necessario affinché la glutaraldeide agisca, la stessa viene eliminata e la piastra e gli inserti vengono lavati per tre volte con acqua distillata.

3. Materiali e metodi

Quando gli inserti sono completamente asciutti, le cellule vengono colorate con cristal violetto 0,1% in tampone borato 200 mM, a pH 9, lasciato per 20' in agitazione. Allo scadere del tempo si effettuano 3 lavaggi con acqua distillata, si elimina l'eccesso di colorante con un tampone e si lascia asciugare all'aria.

Per poter quantificare l'invasione, si deve solubilizzare il colorante: la solubilizzazione avviene con acido acetico 10% v/v, per 10', in agitazione. L'acquisizione dei dati viene eseguita allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 590 nm.

3.10 Microscopia confocale

Un numero appropriato di cellule HK-2 è stato seminato in vetrini multipozzetto (LabTek[®], Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA), nel proprio terreno. Raggiunto l'80% di confluenza, il terreno di crescita è stato eliminato e sono stati aggiunti i trattamenti con per AGE marcati con la Rodamina B, lisozima marcato con FITC 1 h a 37°C.

Al termine del periodo di esposizione, i trattamenti sono stati eliminati e, in seguito ad un lavaggio con PBS, è stato aggiunto per 15' a 37°C un tracciante di membrana, il *Cell Mask*. Trascorso questo periodo, il *Cell Mask* viene eliminato e, in seguito ad un ulteriore lavaggio, si è aggiunta paraformaldeide (PFA) 4% per 10' a 37°C per fissare le cellule. La PFA è stata eliminata e, dopo un lavaggio, i pozzetti sono stati lasciati ad asciugare *overnight*.

Successivamente sono stati montati dei vetrini coprioggetto con Mowiol[®] (Polysciences Inc, Valley Road Warrington, PA). I vetrini sono stati osservati al microscopio confocale.

3.10.1 Marcatura di lisozima con il FITC e di AGE con RhoB

200 mg di lisozima sono stati sospesi in 20 ml di tampone carbonato 0,1 M a pH 9. 1,5 ml di FITC/DMSO (10 mg/ml) sono stati aggiunti goccia a goccia a 20 ml di lisozima. La soluzione è stata lasciata al buio in agitazione per 45' a temperatura ambiente.

3. Materiali e metodi

Successivamente, per eliminare la FITC non legata, la soluzione è stata estensivamente dializzata in PBS per 24 h, utilizzando membrane con *cut-off* di 12.000 Dalton. Il dializzato recuperato è stato congelato a -80°C e successivamente liofilizzato.

Per marcare gli AGE è stata utilizzata la stessa procedura, utilizzando come marcatore la rodamina B e la FITC.

3.11 Produzione di microsistemi di alginato e HPMC rivestiti di chitosano contenenti lisozima

La produzione di microsistemi di alginato, rivestiti di chitosano, contenenti lisozima è alla base dei successivi studi *in vivo*. Per poter ottenere i microsistemi, è prima necessario produrre una soluzione alimentante, la quale successivamente viene processata in un impianto *airless spray-gun*.

3.11.1 Preparazione della soluzione alimentante

La soluzione alimentante viene preparata *ex novo* ogniqualvolta si effettua un ciclo produttivo. Per un litro di soluzione si procede come indicato di seguito:

- 4,7 g di lisozima sono stati sciolti in 453 ml di acqua distillata, sotto agitazione.
- A dissoluzione completata, sono stati addizionati 18,5 g di sodio alginato (corrispondenti al 4% p/v rispetto al volume di acqua distillata) e miscelati mediante un minipimer.
- Una volta che la soluzione presenta un aspetto uniforme e privo di grumi si addizionano 547 ml di HPMC (preparata sciogliendo 10 g di HPMC in 2,5 l di una soluzione, composta da 1 l di etanolo assoluto e 2,5 L di acqua distillata) e si miscelano al resto della soluzione con il minipimer.

3. Materiali e metodi

3.11.2 Ciclo produttivo

La soluzione alimentante è stata versata nel recipiente di caricamento della pompa ed è stato riempito il circuito. Si è settato il temporizzatore in modo da ottimizzare lo spruzzo di micronizzato. Si è posizionato lo *spray-gun* sopra un recipiente contenente 1,6 l di una soluzione di gelificazione-rivestimento (preparata sciogliendo 1 g di chitosano in 1 l di acqua distillata contenente 1,25 ml di acido acetico glaciale; a solubilizzazione avvenuta sono stati sciolti nella soluzione 150 g di cloruro di calcio) e posta al di sopra di una piattaforma rotante. A questo punto, si può iniziare a spruzzare la soluzione alimentante nella soluzione gelificante, fino ad esaurimento della soluzione alimentante nel circuito.

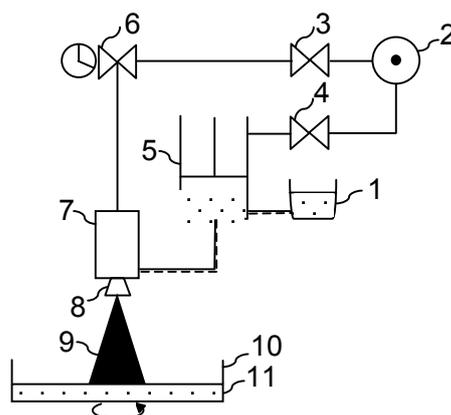


Figura 3: Impianto produttivo: (1) contenitore per la *feed solution*; (2) compressore e sistema di regolazione per l'aria; (3) regolatore pressorio dello *spray-gun*; (4) regolatore di pressione della pompa a pistone; (5) pompa a pistone; (6) timer; (7) *spray-gun*; (8) tip; (9) gocce micronizzate; (10) contenitore rotante per la gelazione e di raccolta; (11) microparticelle.

I microsistemi sospesi nella soluzione di gelificazione-rivestimento sono stati raccolti e centrifugati (IEC FL40R centrifuge – Thermo Scientific) a 4000 rpm per 5'. Terminata la centrifuga, il fondello è stato recuperato mentre il surnatante costituito dal liquido gelificante è stato eliminato. I microsistemi, risospesi in etanolo assoluto, dopo 1' di agitazione per favorire la disidratazione, sono stati nuovamente centrifugati a 4000 rpm per 5'. Il fondello è stato recuperato e risospeso in etanolo assoluto. Si è quindi proceduto con la filtrazione utilizzando una camera d'acciaio con un filtro ad alta resistenza in polivinile,

3. Materiali e metodi

collegato al sistema ad aria compressa. Il fondello impaccato è stato recuperato ed essiccato in stufa a 37°C *overnight*. I microsistemi asciutti sono stati raccolti in un mortaio e lavorati in maniera da disgregare i grumi. Le polveri ottenute sono state setacciate attraverso setacci seriali con maglie comprese tra 160 e 50 µm. Sono state utilizzate le polveri con diametro medio di 62,5 µm.

3.12 Quantificazione lisozima serico

Per quantificare il lisozima serico è stato effettuato un esperimento *in vivo*. Sei ratti Wistar (Harlan Laboratories, Nossan, Italia) maschi, peso compreso tra 400-600 g, sono stati incannulati a livello dell'arteria caudale.

3.12.1 Incannulazione dell'arteria caudale di ratti

La sera prima del test i ratti sono stati messi in gabbia con acqua a volontà e in condizione di digiuno, per evitare disomogeneità dovute a diversi tempi di transito e assorbimento. La mattina seguente la coda è stata lavata bene con acqua per identificare il tracciato di vene ed arterie e, con un pennarello indelebile, è stato effettuato un segno sull'arteria visibile come sottile linea bluastra di 3-5 cm sotto l'orifizio anale. A questo punto l'animale è trasferito nella camera di costrizione. Si gira l'animale in modo da mettere in evidenza il segno fatto con il pennarello. Con una siringa da 1 ml e un ago da 24 G si iniettano 600 µl di lidocaina per anestetizzare l'area. Si attendono 3-4', massaggiando la radice della coda per favorire l'effetto dell'anestetico. Quando non ci sono più riflessi, con un paio di forbici robuste si esegue un taglio trasversale di 7-8 mm, nella zona dove finisce il segno tracciato, in modo da tagliare la pelle. Sul lato destro di questo taglio, se ne esegue uno ulteriore ma longitudinale, di 1 cm circa, in maniera da formare una L. Si scolla il tessuto e, all'altezza dell'intersezione della L, lo si pinza con una pinza Cocker. Appoggiando la pinza sul tavolo, si tiene sollevato e fermo il lembo del tessuto, ottenendo una visione chiara del

3. Materiali e metodi

vaso sottostante che si intende incannulare. Con un paio di forbici si scolla il tessuto che sovrasta il vaso e con un paio di pinze arrotondate si prende lo stesso. Si preparano due fili di cotone di 12 cm, il primo lo si lega strettamente sotto il vaso sanguigno. Dopo aver versato la lidocaina rimasta, goccia a goccia sul vaso, e aver atteso 3-4' l'azione dell'anestetico, si pinza la radice della coda per fermare il sangue. Si prende la cannula e si infila la punta per 2-3 mm dentro il vaso, si toglie l'ago e si spinge la cannula in su. Per verificare che l'incannulazione sia andata bene, si toglie un attimo la molletta, e il sangue dovrebbe cominciare a fluire. Verificato ciò, si ripone la molletta, si effettua la seconda legatura, si infila il *device* stringitubo nel gommino, si stringe, si toglie la molletta e si controlla che non perda.

Si ancora il *device* alla radice della coda con del filo robusto, si sparge una polvere cicatrizzante e si arrotola del cerotto sulla zona operata. Sopra il *device* si stende una retina di acciaio inox per proteggere la zona dal morso del ratto e si inseriscono 0,3 ml di soluzione fisiologica con sodio citrato nella cannula. Dopo la somministrazione con *gavage* si è proceduto alla raccolta dei campioni di sangue ai tempi prestabiliti.

A incannulazione completata il lisozima microincapsulato (preparato mediante la procedura di cui al capitolo 3.10) o un'equidose di lisozima libero sono stati somministrati mediante *gavage* orale (siringa con ago bottonuto 18 G). A diversi tempi dalla somministrazione (0', 30', 1h, 2h e 4h) sono stati prelevati dei campioni di sangue. Per ottenere i sieri su cui effettuare lo studio, i campioni di sangue sono stati posti per 1 h a 37°C per favorire la formazione del coagulo. Trascorso questo tempo, il sangue non coagulato è stato raccolto e posto *overnight* a 4°C. Successivamente, i campioni sono stati centrifugati per 5' a 300xg.

3. Materiali e metodi

3.12.2 Saggio turbidimetrico

Il saggio si basa sulla capacità del lisozima di lisare *Micrococcus luteus*, chiarificando una soluzione torbida. Si prepara la curva di taratura partendo da una concentrazione di lisozima 1 mg/ml, ed effettuando diluizioni seriali. 0,006 g di *Micrococcus luteus* vengono risospesi in 30 ml di una soluzione Fosfato (0,067 M)/Sodio Cloruro (0,0154 M)/sodio azide (8 mM). 10 µl di campione di plasma e delle diluizioni della curva di taratura vengono posti in una piastra da 96 pozzetti. In seguito vengono aggiunti 200 µl di soluzione di *Micrococcus luteus* ad ogni pozzetto e si legge la piastra a 450 nm. Si effettua una prima lettura subito dopo aver aggiunto la soluzione di *Micrococcus luteus* e successivamente dopo 30' se ne esegue un'altra. La torbidità della soluzione è inversamente proporzionale alla concentrazione di lisozima.

3.13 Espressione della proteina p38

Per verificare l'influenza dei trattamenti con AGE e lisozima sull'espressione della proteina p38, è stata utilizzata la tecnica del *western blot*. Per effettuare questo saggio in primo luogo sono state estratte le proteine dalle cellule, sono state quantificate, fatte correre in un gel con elettroforesi e trasferite su una membrana di nitrocellulosa. A questo punto è stato effettuato il saggio mediante l'utilizzo di anticorpi specifici.

3.13.1 Estrazione proteica

Le proteine che devono essere analizzate mediante elettroforesi/*western blot* devono essere innanzitutto estratte dalle cellule. A tal fine è necessario che, prima, le cellule vengano lisate attraverso l'utilizzo di un appropriato tampone.

Un adeguato numero di cellule è stato seminato in *flasks* da 25 cm². Giunte all'80% della confluenza, il terreno di crescita è stato rimosso e sono stati aggiunti i trattamenti con AGE e lisozima 10 per 24 h.

3. Materiali e metodi

Trascorso il tempo, le cellule sono state staccate con tripsina e centrifugate per 7' a 300xg. Il pellet ottenuto è stato lavato con 1 ml di PBS freddo e successivamente centrifugate a 3000xg per 5'. Il sovrnatante è stato eliminato ed è stato aggiunto il tampone di lisi (100 μ L per $1,5 \times 10^6$ cellule), risospendendo bene le cellule.

Tabella 3.1: tampone di lisi per l'estrazione delle proteine

Sostanza	Funzione
0,5% Na-deossicolato	Detergente anionico, denaturante
1% Igepal	
50 mM Hepes	
150 mM NaCl	
1 mM Na-ortovanadato	Inibitore tirosin-fosfatasi
50 mM Na-fluoruro	
20 mM β -glicerofosfato	
0,1 μ M Acido Okadaico	Inibitore protein-fosfatasi tipo 1 e 2A
50 μ g/ml Leupeptina	Inibitore serin- e cistein-fosfatasi
50 μ g/ml Aprotinina	Inibitore serin-fosfatasi
10 μ M Pepstatina	Inibitore protein-fosfatasi
1 mM PMSF	Inibitore serin- e cistein-fosfatasi
Acqua distillata	

La sospensione è stata successivamente sonicata per far sì che tutte le cellule entrino in contatto con il *buffer* e per favorire la rottura delle membrane. Dopo un'incubazione di 15' in ghiaccio, la sospensione è stata centrifugata per 20' a 12000xg. Il sovrnatante, contenente l'estratto proteico è stato conservato a -80°C , fino all'utilizzo.

3.13.2 Dosaggio proteico

Il dosaggio proteico è un test colorimetrico che, attraverso il viraggio del reattivo di Bradford[®] (costituito da brilliant blue G-250) (CBB) in acido ortofosforico 8,5% e metanolo 0,04%) da marrone a diversi livelli di gradazione di blu, permette di quantificare le proteine

3. Materiali e metodi

presenti nei lisati cellulari. La procedura è basata sulla formazione di un complesso tra il colorante brilliant-blue G-250 e le proteine in soluzione. Tale complesso causa uno spostamento dell'assorbanza massima del colorante da 465 nm a 595 nm. L'assorbanza è proporzionale alla concentrazione di proteina presente. Come riferimento standard è stata utilizzata la BSA a concentrazione da 0,008 mg/ml a 1 mg/ml. L'assorbanza è stata misurata mediante spettrofotometro (SpectraCount™ Packard) a 590 nm.

3.13.3 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of protein)

La tecnica SDS-PAGE permette di dissociare le proteine polipeptidiche nelle loro subunità individuali e di minimizzare gli aggregati. Il detergente fortemente anionico SDS è usato in combinazione con un agente riducente (β -mercaptoetanololo) e con la bollitura dei campioni, per dissociare le proteine prima che queste vengano caricate nel gel. Poiché la quantità di SDS legato è quasi sempre proporzionale al peso molecolare del polipeptide ed è indipendente dalla sua sequenza, i complessi polipeptidici-SDS migrano attraverso il gel di poliacrilamide in funzione del peso della proteina.

3.13.3.1 Preparazione della camera

Per la corsa delle proteine viene allestita una camera costituita da un gel “di caricamento” sul quale vengono caricati i campioni (e che ha lo scopo di compattare le proteine prima della corsa) e da un gel “di corsa” al 12% di poliacrilamide sul quale avviene la separazione delle proteine in base al loro peso molecolare. I gel vengono montati su appositi vetrini e posizionati nella cella di corsa (Mini-Protean® 3, Bio-Rad Laboratoires, Hercules, CA, USA).

3. Materiali e metodi

3.13.3.2 Preparazione dei campioni

Per ogni campione vengono caricati 20 µg di proteine che vengono diluite nel Laemmli Sample Buffer, un tampone riducente. Poco prima del caricamento nel gel, i campioni vengono bolliti per 5' per denaturare le proteine. Sul gel è stata caricata anche una soluzione di pesi molecolari che consiste in una miscela di 8 proteine, ciascuna delle quali associata ad un colore differente. Queste proteine permettono di controllare la migrazione delle proteine campione durante l'elettroforesi e l'efficacia del loro trasferimento sulla membrana di nitrocellulosa durante il *blotting*.

3.13.3.3 Corsa del gel

Dopo il caricamento dei campioni la camera viene collegata alla corrente a voltaggio costante di 140 V (per 2 gel).

3.13.3.4 Ricette dei gel

Gel di caricamento (stacking gel)

- 3,75% v/v di acrilamide-bisacrilamide 29:1
- 375 mM tris base pH 6,8
- 0,1% p/v SDS
- 0,2% p/v ammonio persolfato
- 0,1% v/v TEMED
- Acqua distillata

Gel di corsa (running gel)

- 12% v/v miscela di acrilamide-bisacrilamide 29:1
- 375 mM tris base pH 8,8
- 0,1% p/v SDS
- 0,2% p/v ammonio persolfato
- 0,1% v/v TEMED

3. Materiali e metodi

- Acqua distillata

3.13.3.5 Tamponi utilizzati

Tampone di corsa (Electrode Buffer)

- 50 mM tris base
- 384 mM glicina
- 0,1% p/v SDS
- Acqua distillata

Leammi Sample Buffer 4X (riducente)

- 200 mM tris-HCl pH 6,8
- 0,8% p/v SDS
- 40% v/v glicerolo
- 0,08% p/v blu di bromofenolo
- 20% v/v β -mercaptoetanolo*
- Il β -mercaptoetanolo deve essere aggiunto immediatamente prima dell'uso, ossia al momento della preparazione dei campioni e solo nell'aliquota da usare poiché è molto volatile.

3.13.4 Western Blot

Con la tecnica di Western Blot è possibile trasferire le proteine separate che si trovano nel gel su un supporto solido, come la membrana di nitrato di cellulosa (spessore 0,45 μ m) (Trans-Blot[®] Transfer Medium Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), con la quale si legano covalentemente. Il trasferimento viene effettuato utilizzando una cella di trasferimento Mini Trans-Blot[®] (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

3.13.4.1 Preparazione della camera

Il gel e la membrana di nitrocellulosa vengono poste a contatto formando una sorta di "sandwich". Inserito all'interno della cella, il gel

3. Materiali e metodi

risulta posto dalla parte del catodo, mentre la membrana dalla parte dell'anodo. Le proteine migreranno verso l'anodo, andando ad attaccarsi alla membrana.

3.13.4.2 Trasferimento delle proteine

La corrente viene applicata ad un amperaggio costante di 250 mA per circa 2 ore. Per evitare il sovra-riscaldamento, il processo viene condotto sempre in ghiaccio. Terminato il trasferimento, la membrana viene incubata con il tampone di blocco, per saturare i siti aspecifici di legame, per 1 h a temperatura ambiente in agitazione. Quindi viene lavata 3 volte con il tampone di lavaggio per 5' in agitazione.

3.13.4.3 Tamponi Utilizzati

Tampone di trasferimento (Transfer Buffer)

- 25 mM tris base
- 192 mM glicina
- 20% v/v metanolo
- Acqua distillata

Tampone di blocco

- 5% p/v latte scremato in polvere
- TBS tween 0,1%

Tampone di lavaggio (TBS-Tris Buffered Saline-Tween 0,1%)

- 12,5 mM tris base
- 125 mM NaCl
- 0,1% tween-20
- Acqua distillata

3. Materiali e metodi

3.13.5 Incubazione con gli anticorpi

In questa fase, la membrana di nitrocellulosa viene incubata con un anticorpo non marcato, specifico per la proteina target che si va a cercare, disciolto nel tampone di blocco. Il filtro viene quindi lavato con il tampone di lavaggio e incubato con un anticorpo secondario associato alla perossidasi di rafano. Dopo ulteriori lavaggi, i complessi antigene-anticorpi, primario e secondario, vengono rilevati mediante reazione immunoenzimatica e sviluppati con chemiluminescenza.

Tabella 3.2: Anticorpi utilizzati nel saggio di Western Blot

<i>Anticorpi primari</i>	<i>Diluizione</i>	<i>Ospite</i>	<i>Ditta produttrice</i>
<i>p38MAPK</i>	1:1000	Coniglio	Cell Signalling Technology, Milano, Italia
<i>p-p38MAPK</i>	1:1000	Coniglio	Cell Signalling Technology, Milano, Italia

<i>Anticorpi secondary</i>	<i>Diluizione</i>	<i>Ditta produttrice</i>
<i>Anti-Rabbit-HRP conjugate</i>	1:2000	Cell Signalling Technology, Milano, Italia

3.13.6 Sviluppo con chemiluminescenza

Il complesso antigene-anticorpo è stato rilevato mediante il metodo della chemiluminescenza. Il sistema di detenzione con il metodo della chemiluminescenza è il miglior metodo per lo sviluppo dei Western Blot, poiché è molto veloce e sensibile. La perossidasi di rafano (HRP), coniugata con l'anticorpo secondario viene attivata da specifici substrati chemiluminescenti che generano il segnale luminoso. Il substrato chemiluminescente da noi utilizzato (Sigma Aldrich, St.

3. Materiali e metodi

Louis, MO, USA) è un sistema basato sul luminolo. In presenza del perossido di idrogeno, la perossidasi di rafano converte il luminolo in un intermedio dianionico eccitato che emette luce nel tornare al suo stato energetico basale. L'emissione della luce è massima immediatamente dopo l'esposizione del substrato all'HRP e continua per 1 ora. La luce viene catturata dalle lastre fotografiche (Hyperfilm™, Amersham Biosciences UK, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) in seguito ad un'esposizione con il nitrato chemiluminescente per pochi secondi/minuti, all'interno della cassetta per autoradiografia (Hypercassette™ Autoradiography Cassette, Amersham Biosciences UK, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

Il nitrato di cellulosa, in seguito ai lavaggi, è stato incubato con la miscela chemoluminescente per un minuto; quindi il nitrato chemiluminescente è stato posto a contatto con la lastra fotografica, per un tempo variabile da 1' a 4' a seconda della sensibilità degli anticorpi. Una volta terminata l'incubazione, la lastra è viene immersa nella soluzione di sviluppo (Kodak Processing Chemicals for Autoradiography Films, SIGMA, St. Louis, MO, USA) per un tempo sufficiente per poter visualizzare le bande proteiche. La lastra viene lavata in acqua e quindi immersa in una soluzione di fissativo (Kodak Processing Chemicals for Autoradiography Films, SIGMA, St. Louis, MO, USA), fino a quando appare trasparente. In seguito ad un ultimo lavaggio in acqua, la lastra viene lasciata asciugare. Le bande impresse vengono quantificate con un programma di densitometria, in seguito a scannerizzazione.

3.14 Citofluorimetria a flusso

Un numero appropriato di cellule è stato seminato in *flasks* da 75 cm². Giunte all'80% della confluenza, le cellule sono state staccate mediante tripsina/EDTA, risospese in PBS e contate. 1x10⁶ cellule sono state dispensate in Eppendorf e centrifugate. Il sovrantante è stato eliminato e sono stati aggiunti i trattamenti di AGE-Fitc e LZ-Fitc 20 µM

3. Materiali e metodi

per 1 ora a 37°C. Alla scadenza del periodo di incubazione, sono stati effettuati tre lavaggi con PBS. Dopo l'ultimo lavaggio, le cellule sono state risospese in 500 µl di PBS e si è proceduto con l'analisi al citofluorimetro a flusso (FACSCalibur, Becton Dickinson).

3.15 Studio dei lisosomi

Per effettuare questo saggio è stato utilizzato il kit Enzo Life Sciences Lyso-ID Green Detection kit. Un numero appropriato di cellule è stato seminato in vetrini multipozzetto. Giunte all'80% della confluenza, le cellule sono state trattate con LZ e AGE-rodamina per 1 h a 37°C. Precedentemente era stato aggiunto il trattamento con cloroquina 100 µM per 4 h. Alla scadenza del periodo di incubazione i trattamenti sono stati eliminati, le cellule sono state lavate con PBS e si è aggiunto per 30' a 37°C, il tracciante lisosomiale (verde) e il tracciante nucleare (Hoechst 33342, blu). Trascorso il tempo, i traccianti non internalizzati sono stati eliminati e le cellule lavate con PBS. Si è aggiunto vetrino coprioggetto e sono state acquisite le immagini mediante microscopia a fluorescenza (Leica Microsystem, Witzler, Germania).

3.16 Optical Imaging

L'*Optical Imaging* (O. I.) è una tecnologia di indagine non invasiva che permette la visualizzazione di eventi molecolari in animali viventi in tempo reale. Questa tecnica acquisisce il segnale fluorescente del colorante usato per visualizzare la molecola di interesse all'interno del modello animale vivente (comunemente viene utilizzato il topo), fornendo informazioni sulla sua biodistribuzione e tempo di emivita (Hillman et al., 2011). Nel presente lavoro di dottorato la tecnologia O. I. è stata per la prima volta utilizzata per visualizzare la biodistribuzione dopo somministrazione orale.

Per effettuare questa prova sono stati utilizzati due campioni:

- Microsistemi contenenti LZ fluorescente

3. Materiali e metodi

- Lisozima libero (non microincapsulato)

Le due concentrazioni utilizzate, che corrispondono come intensità di fluorescenza, sono state normalizzate attraverso fluorimetro.

I microsistemi sono stati prodotti mediante una soluzione madre di LZ fluorescente, come descritto al capitolo 3.10.

I campioni sono stati addizionati a mangime a bassa fluorescenza e somministrati a due topi Balb/c di tre mesi in bolo mediante *gavage* orale. I topi anestetizzati sono stati messi, singolarmente, nella camera di lettura. L'esperimento è stato svolto presso il laboratorio di Optical Imaging del CBM, Trieste).

3.17 Analisi statistica

I dati sperimentali ottenuti in questa tesi sono stati sottoposti ad analisi statistica della varianza ad una via (ANOVA) e post-test di Tukey-Kramer. I valori riportati nei grafici sono la media \pm la deviazione standard dei parametri considerati.

Risultati

4. Risultati

4.1 Citotossicità degli AGE

4.1.1 Vitalità delle cellule ADMEC in seguito a trattamenti con AGE

Nella Fig. 4.1 sono riportati i risultati relativi agli effetti degli AGE sulla vitalità cellulare, misurata mediante test MTT.

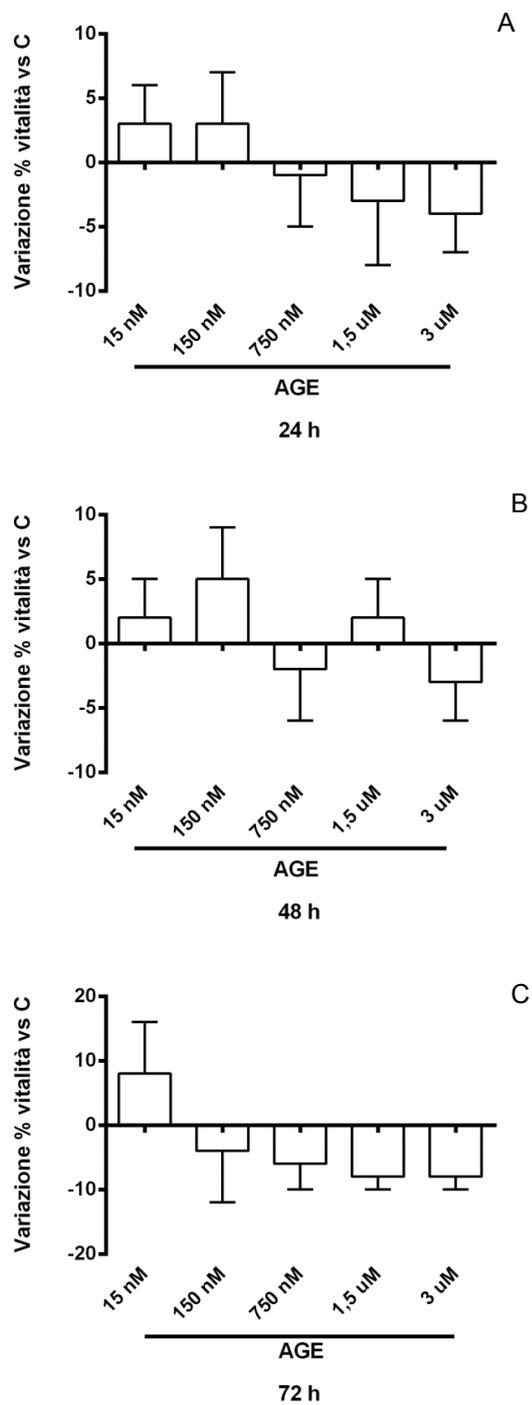


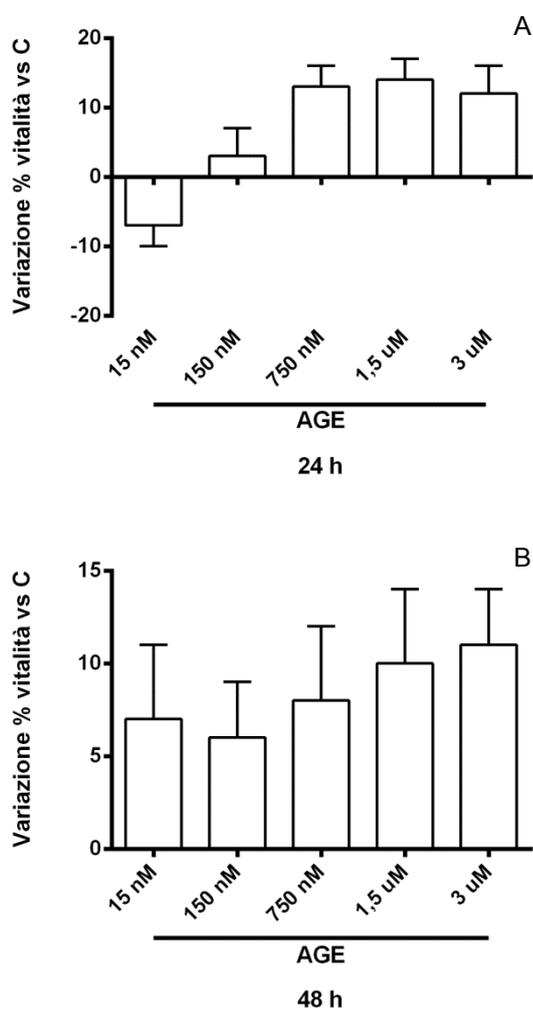
Fig 4.1: Valutazione della vitalità cellulare delle cellule ADMEC, mediante test MTT, in seguito a trattamenti con AGE (*range* di concentrazioni 15 nM – 3 μM) per 24 h

4. Risultati

(pannello A), 48 h (pannello B) e 72 h (pannello C). Analisi statistica: Anova + Tukey-Kramer.

Per quel concerne la vitalità misurata con il test MTT, il trattamento con AGE non ha indotto variazioni significative rispetto ai controlli a nessuna delle concentrazioni (15 nM – 3 μ M) e dei tempi (24 h – 72 h) adottati (Fig.4.1, pannelli A, B e C).

La vitalità delle cellule ADMEC è stata anche valutata mediante saggio SRB. I risultati ottenuti sono riportati nella fig. 4.2.



4. Risultati

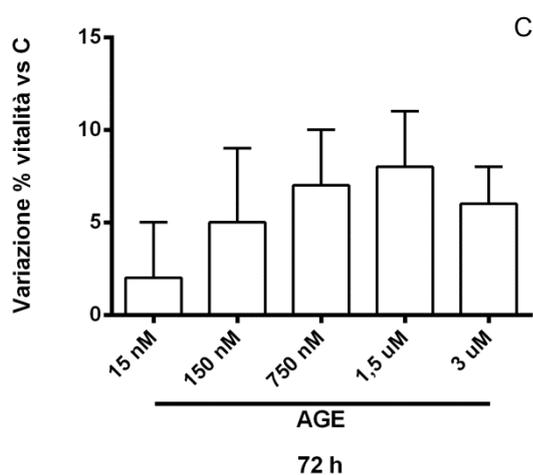
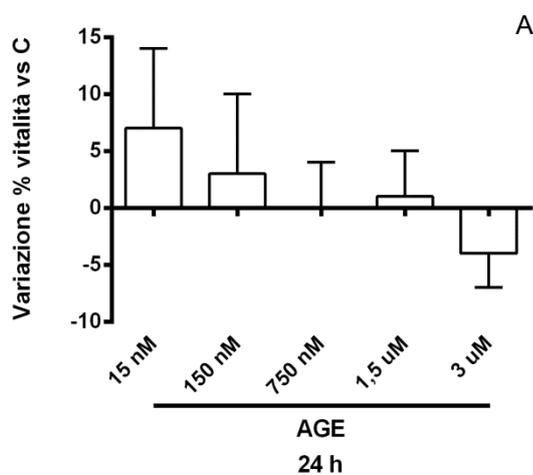


Fig 4.2: Valutazione della vitalità cellulare delle cellule ADMEC, mediante test SRB, in seguito a trattamenti con AGE (range di concentrazioni 15 nM – 3 μM) per 24 h (pannello A), 48 h (pannello B) e 72 h (pannello C). Analisi statistica: Anova + Tukey-Kramer.

La vitalità delle cellule ADMEC, misurata mediante test SRB, non ha indotto variazioni significative rispetto ai controlli in nessuna delle condizioni sperimentali adottate.

4.1.2 Vitalità delle cellule LLC-PK₁ in seguito a trattamenti con AGE

La vitalità delle cellule LLC-PK₁, misurata mediante il saggio MTT e mediante il test SRB è illustrata, rispettivamente, nelle Fig 4.3 e 4.4.



4. Risultati

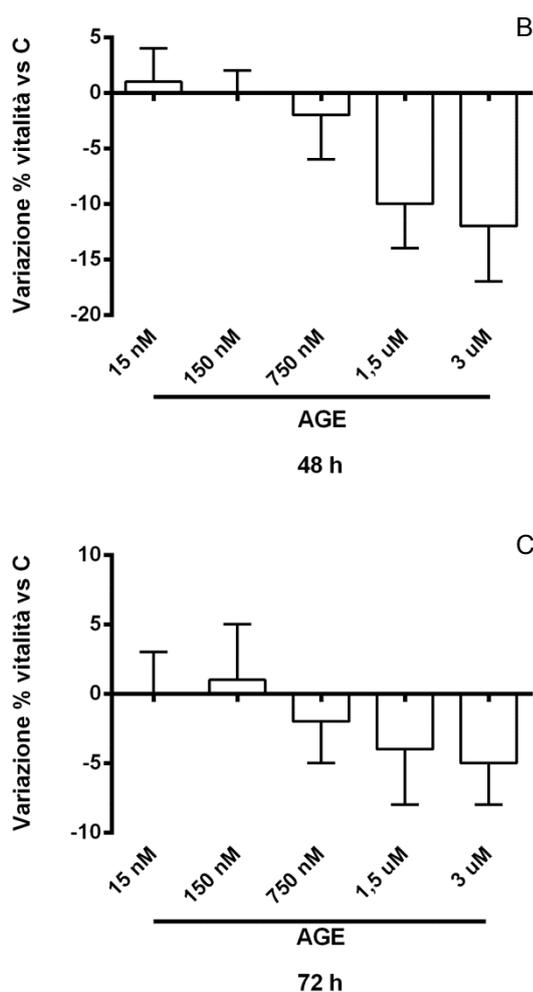


Fig. 4.3: Valutazione della vitalità cellulare delle cellule LLC-PK₁, mediante test MTT, in seguito a trattamenti con AGE (*range* di concentrazioni 15 nM – 3 μM) per 24 h (pannello A), 48 h (pannello B) e 72 h (pannello C). Analisi statistica: Anova + Tukey-Kramer.

Per quel che riguarda il test MTT (Fig. 4.3) i trattamenti con AGE, ad un *range* di concentrazioni compreso tra 15 nM – 3 μM, per 24 h (pannello A), 48 h (pannello B) e 72 h (pannello C), non hanno indotto variazioni significative rispetto i controlli.

Il test SRB (Fig 4.4) non ha evidenziato variazioni significative nelle cellule trattate con AGE rispetto ai controlli in tutte le condizioni adottate.

4. Risultati

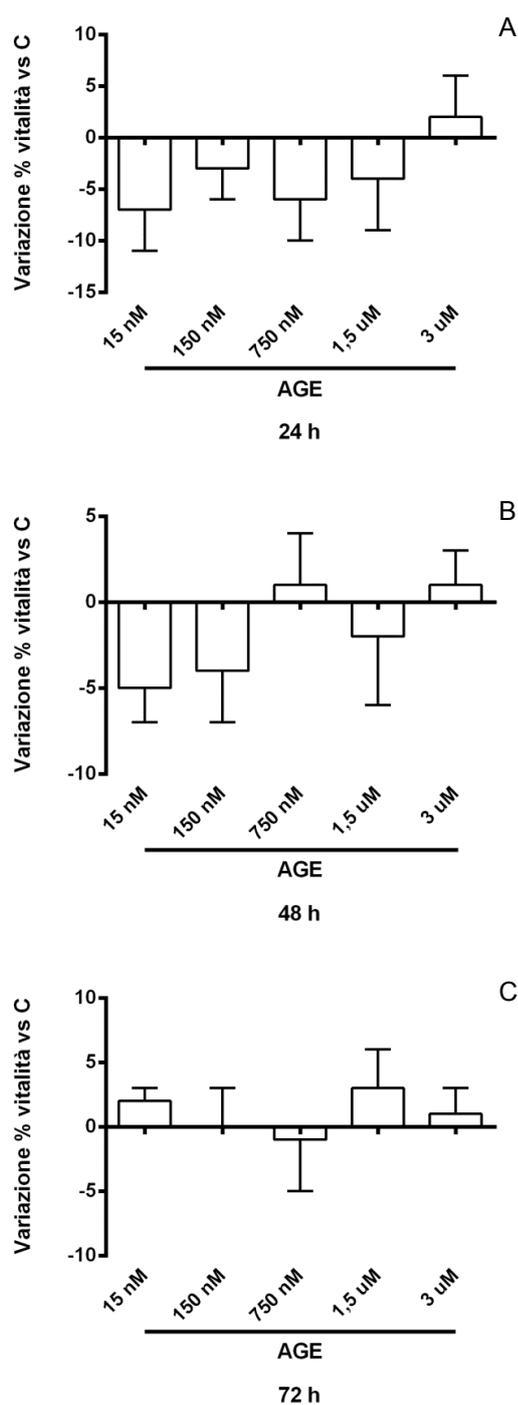


Fig. 4.4: Valutazione della vitalità cellulare delle cellule LLC-PK₁, mediante test SRB, in seguito a trattamenti con AGE (*range* di concentrazioni 15 nM – 3 μM) per 24 h (pannello A), 48 h (pannello B) e 72 h (pannello C). Analisi statistica: Anova + Tukey-Kramer.

4.1.3 Vitalità delle cellule HK-2 in seguito a trattamenti con AGE

I risultati relativi agli effetti degli AGE sulla vitalità delle cellule HK-2 sono riportati nella Fig. 4.5.

4. Risultati

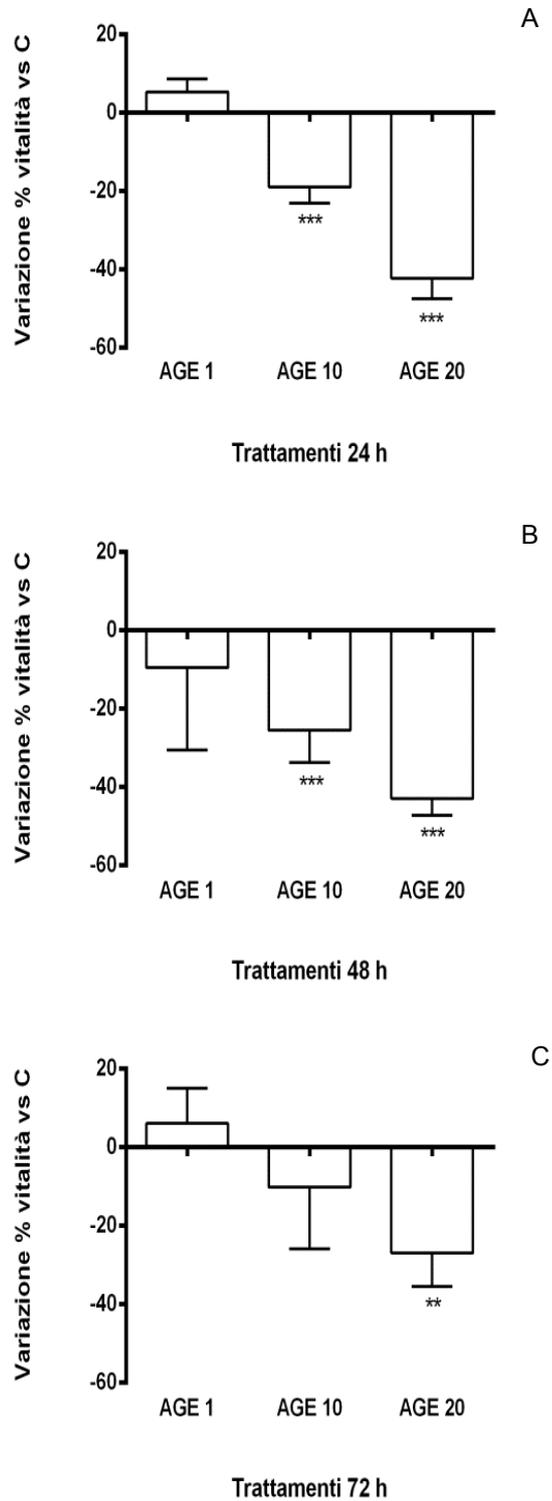


Fig 4.5: Valutazione della vitalità cellulare delle cellule LLC-PK₁, mediante test SRB, in seguito a trattamenti con AGE (*range* di concentrazioni 15 nM – 3 μM) per 24 h (pannello A), 48 h (pannello B) e 72 h (pannello C). Analisi statistica: Anova + Tukey-Kramer. Pannello A: *** p<0,001 vs C. Pannello B: *** p<0,001 vs C. Pannello C: ** p<0,01 vs C.

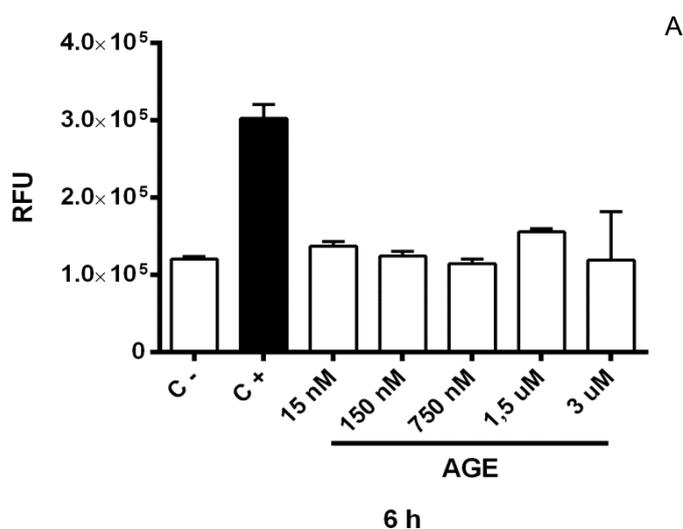
4. Risultati

I trattamenti con AGE 10 μM e 20 μM per 24 h (pannello A) hanno ridotto significativamente la vitalità cellulare (dal 20% al 50%), secondo un *trend* dose-dipendente. I risultati ottenuti a 48 h e 72 h sono comparabili a quanto misurato dopo 24 h di trattamento senza un ulteriore incremento della citotossicità (pannello B e pannello C). I trattamenti con il lisozima, fino alla concentrazione di 20 μM e per 72 h di esposizione, non ha determinato variazioni significative della vitalità cellulare. La citotossicità indotta dagli AGE non presenta variazioni significative nel caso di co-trattamenti con il lisozima, a concentrazioni comprese tra 1 μM – 20 μM (risultati non riportati). Le dosi di lisozima sono state scelte in maniera da avere un rapporto equimolare con gli AGE.

4.2 Quantificazione della produzione di ROS intracellulari

4.2.1 Livelli intracellulari di ROS nelle cellule ADMEC

In Fig. 4.6 sono riportati i risultati relativi alla quantificazione delle ROS intracellulari nelle cellule ADMEC, in seguito a trattamenti di 6 h (pannello A) e 24 h (pannello B) con AGE (15 nM – 3 μM).



4. Risultati

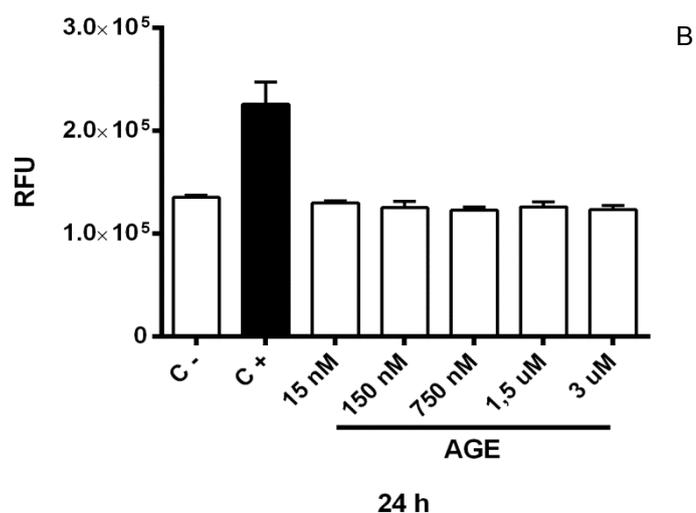


Fig 4.6: Quantificazione delle ROS intracellulari, mediante sonda H₂DCFDA, nelle cellule ADMEC, in seguito a trattamenti con AGE (*range* di concentrazioni 15 nM – 3 μM) per 6 h (pannello A) e 24 h (pannello B). Analisi statistica: ANOVA + Tukey-Kramer.

I trattamenti con AGE, a tutte le concentrazioni e tempi utilizzati, non hanno mostrato variazioni significative rispetto al controllo negativo. Il controllo positivo (ABAP) ha indotto un incremento significativo rispetto al controllo negativo.

4.2.2 Livelli intracellulari di ROS nelle cellule LLC-PK₁

I risultati ottenuti quantificando le ROS nelle cellule LLC-PK₁, dopo trattamento con AGE (15 nM – 3 μM) per 6 h e 24 h, sono presentati nella Fig. 4.7, rispettivamente nel pannello A e nel pannello B.

4. Risultati

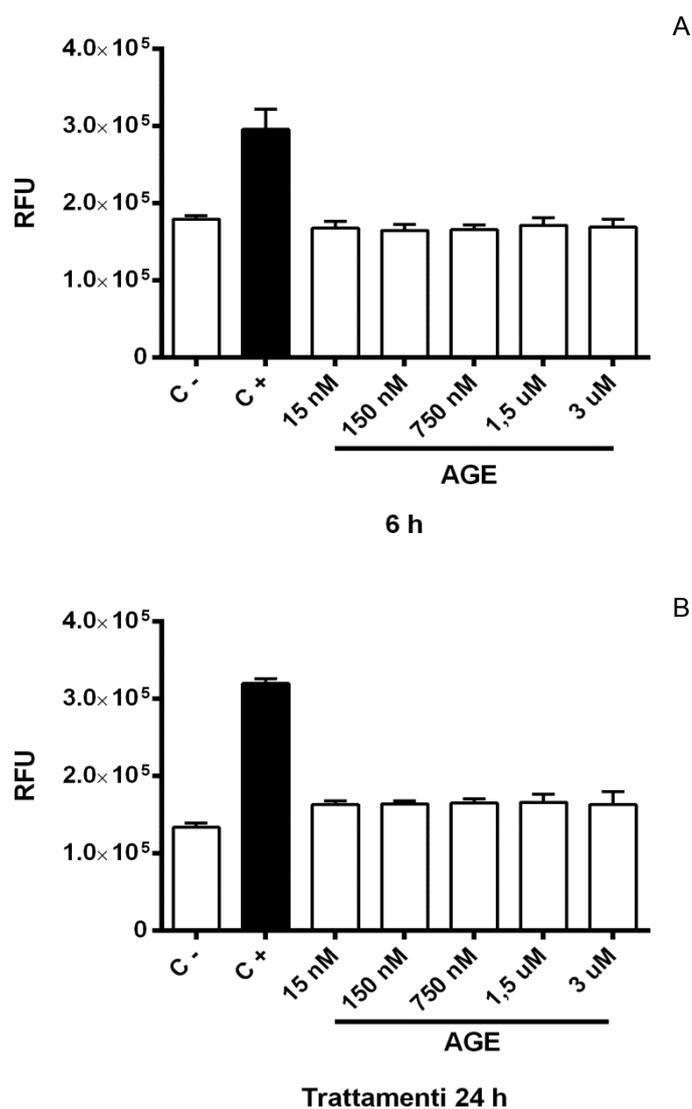


Fig 4.7: Quantificazione delle ROS intracellulari, mediante sonda H₂DCFDA, nelle cellule LLC-PK₁, in seguito a trattamenti con AGE (*range* di concentrazioni 15 nM – 3 μ M) per 6 h (pannello A) e 24 h (pannello B). Analisi statistica: ANOVA + Tukey-Kramer.

Le condizioni sperimentali utilizzate in questo saggio non hanno messo in evidenza variazioni significative per quel che riguarda la produzione di ROS intracellulari, in seguito ai trattamenti con AGE. Il controllo positivo ABAP ha indotto un incremento nei livelli di ROS intracellulari rispetto al controllo negativo.

4. Risultati

4.2.3 Livelli intracellulari di ROS nelle cellule HK-2

In Fig. 4.6 sono riportati i risultati relativi alla quantificazione delle ROS intracellulari nelle cellule HK-2, in seguito a trattamenti di 6 h (pannello A) e 24 h (pannello B) con AGE (10 μ M – 50 μ M).

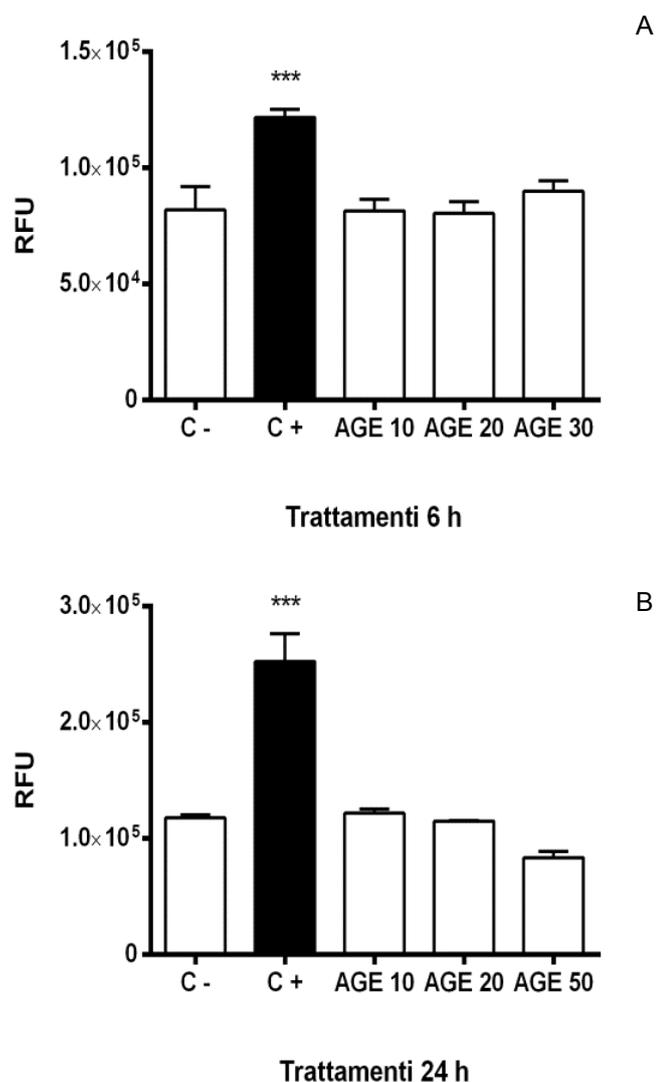


Fig. 4.8: Fig 4.7: Quantificazione delle ROS intracellulari, mediante sonda H₂DCFDA, nelle cellule HK-2, in seguito a trattamenti con AGE (*range* di concentrazioni 10 μ M – 50 μ M) per 6 h (pannello A) e 24 h (pannello B). Analisi statistica: ANOVA + Tukey-Kramer.

I trattamenti con AGE non hanno indotto incrementi significativi dei livelli di ROS a nessuna delle dosi e dei tempi utilizzati.

4. Risultati

4.3 Quantificazione dei livelli di mRNA del recettore RAGE

I livelli di espressione del recettore RAGE nelle cellule HK-2, in seguito all'esposizione al lisozima (concentrazioni comprese tra 1 μM – 20 μM), per 24 h (pannello A) e 96 h (pannello B) sono riportati nella Fig. 4.9.

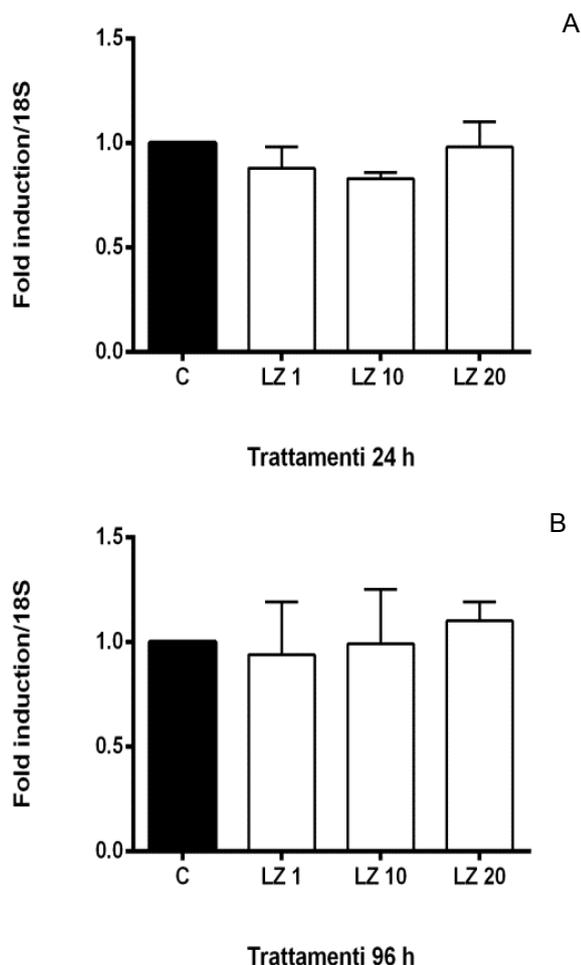


Fig. 4.9: Quantificazione dei livelli di mRNA del recettore RAGE nelle cellule HK-2, mediante RT-PCR, in seguito a trattamenti con LZ 1 μM – 20 μM , per 24 h e 96 h. Analisi statistica: ANOVA + Tukey-Kramer.

Le cellule HK-2 trattate con il lisozima 1 μM – 20 μM , per 24 h e 96 h, non hanno mostrato variazioni significative nei livelli di mRNA per RAGE, a nessuna delle dosi e dei tempi utilizzati.

Un *trend* simile è stato ottenuto valutando l'espressione di mRNA per RAGE nelle cellule HK-2, in seguito ad esposizione per 24 h e 96 h agli AGE, a concentrazioni comprese tra 1 μM – 20 μM .

4. Risultati

4.4 Quantificazione dei livelli di mRNA di IL-6

I dati presentati in Fig. 4.10 mostrano che il trattamento con gli AGE è in grado di indurre un significativo aumento nella produzione di mRNA per IL-6.

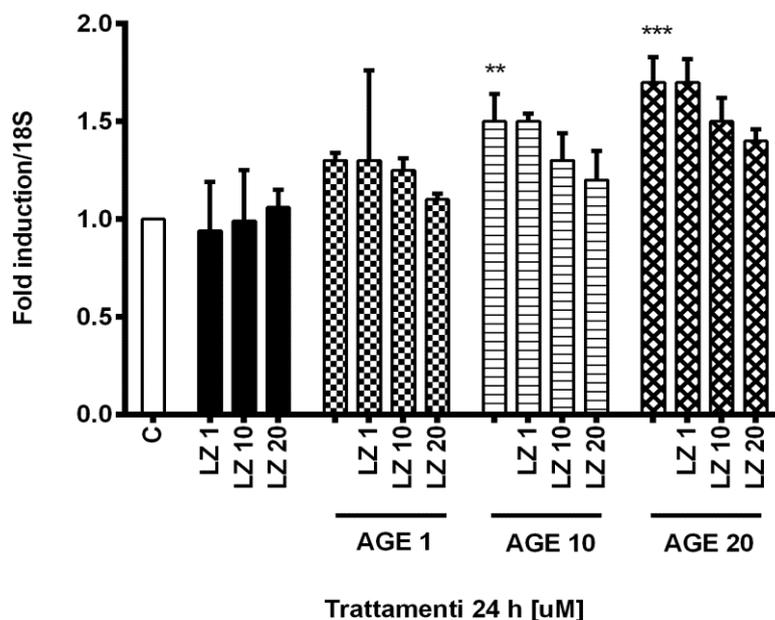


Fig. 4.10: Quantificazione dei livelli di mRNA di IL-6 nelle cellule HK-2, mediante RT-PCR, trattate con AGE (1 μ M – 20 μ M) e lisozima (1 μ M – 20 μ M) per 24 h. Analisi statistica: ANOVA + Tukey-Kramer: ** $p < 0,01$ vs C; *** $p < 0,001$ vs C.

I risultati riportati nella Fig. 4.10 mostrano che gli AGE sono in grado di indurre un significativo incremento dei livelli di mRNA di IL-6, secondo un *trend* dose-dipendente, (+30% alla concentrazione più bassa, +70% alla concentrazione più elevata). Nelle stesse condizioni sperimentali, il lisozima, come atteso, non ha indotto variazioni significative dei livelli di mRNA di IL-6. In co-trattamento con gli AGE, il lisozima si è dimostrato in grado di prevenire la stimolazione AGE-indotta, in maniera dose-dipendente (riduzione fino al 20% alla concentrazione più elevata).

4. Risultati

4.5 Quantificazione del rilascio di IL-6 nei sovrantanti

Il lisozima, a concentrazioni comprese tra 1 μM – 20 μM , si è dimostrato, inoltre, capace di prevenire il rilascio di IL-6 nei sovrantanti delle cellule HK-2, trattate con AGE 1 μM – 20 μM (Fig. 4.11).

I dati presentati evidenziano un incremento dose-dipendente indotto dagli AGE (incremento di 2 volte alla concentrazione 1 μM fino, aumento di 5 volte alla concentrazione 20 μM). Il test ha dimostrato, inoltre, la corrispondente prevenzione, dose-dipendente, di tale rilascio causato dalla concomitante presenza del lisozima (da 30% ad 1 μM fino al 200% a 20 μM). Il lisozima da solo, come atteso, non ha modulato il rilascio della citochina in esame.

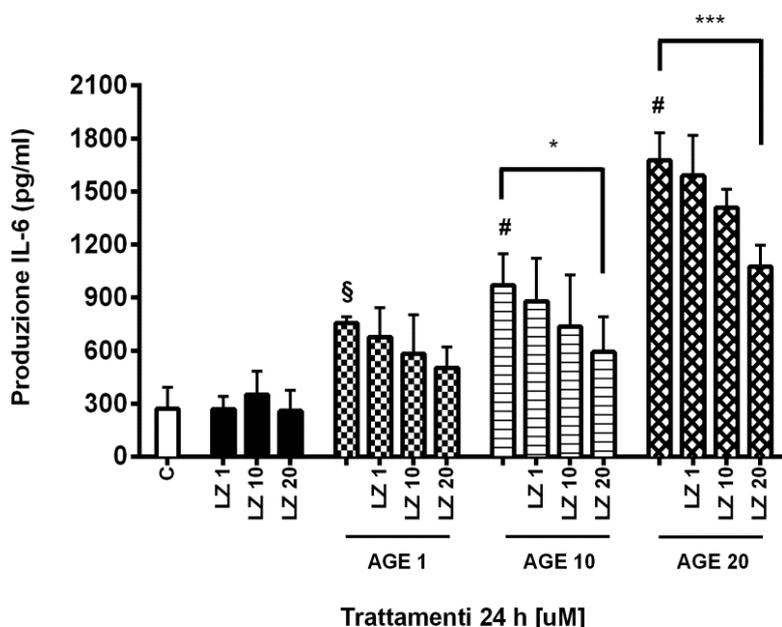


Fig. 4.11: Quantificazione, mediante saggio ELISA, del rilascio di IL-6 nei sovrantanti delle cellule HK-2 trattate con AGE (1 μM – 20 μM) e lisozima (1 μM – 20 μM) per 24 h. Analisi statistica: ANOVA + Tukey-Kramer: § = ** p<0,01 vs C; # = *** p<0,001 vs C; * p<0,5 vs AGE 10+LZ 20; *** p<0,001 vs AGE 20+LZ 20.

4.6 Saggio di migrazione

I dati riportati nella Fig. 4.12 sono relativi alla capacità dei macrofagi U937 di migrare in risposta ad uno stimolo rappresentato dal *medium* condizionato dalle HK-2, trattate con AGE e gli effetti del lisozima sul controllo di questo fenomeno.

4. Risultati

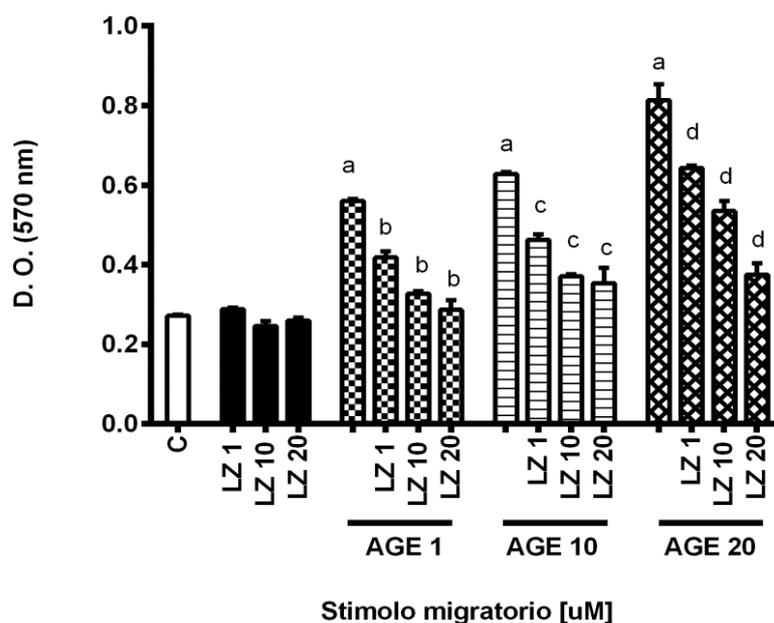


Fig 4.12: Migrazione dei macrofagi U937 verso il medium condizionato dalle HK-2 trattate con AGE (1 μ M – 20 μ M) e lisozima (1 μ M – 20 μ M). Analisi statistica: ANOVA + Tukey-Kramer: a = $p < 0,001$ vs C; b = $p < 0,001$ vs AGE 1; c = $p < 0,001$ vs AGE 10; d = $p < 0,001$ vs AGE 20.

L'utilizzo dei sovrinatanti di cellule HK-2 in coltura, trattate per 24 h con AGE 1, 10 e 20 μ M ha indotto un significativo incremento, dose-dipendente, del tasso migratorio. I sovrinatanti delle cellule esposte al lisozima, da 1 a 20 μ M, non hanno indotto influenza sulla migrazione macrofagica, mentre il lisozima, in co-trattamento con gli AGE, è stato in grado di prevenire significativamente, secondo un *trend* dose-dipendente, l'induzione alla migrazione dei macrofagi (dal 25% a 1 μ M al 50% a 20 μ M).

4.7 Microscopia confocale

Le immagini riportata in Fig. 4.13, sono relative ai trattamenti con AGE 20 μ M e lisozima 20 μ M per 1 h.

4. Risultati

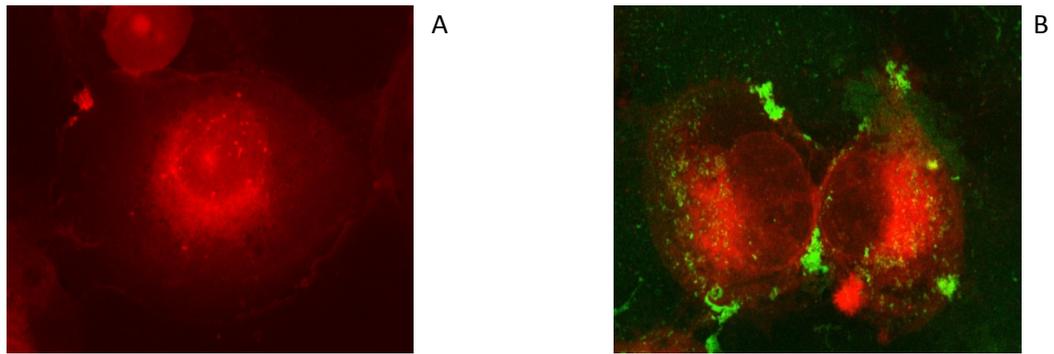


Fig 4.13: Immagini, acquisite al microscopio confocale, di cellule HK-2 trattate con AGE (rosso) 20 μ M (pannello A) e lisozima (verde) 20 μ M (pannello B) per 1 h. Ingrandimento 60x.

Nel pannello A, si può osservare come gli AGE (rosso) siano in grado di penetrare attraverso la membrana cellulare e localizzarsi all'interno della cellula. Nel pannello B, l'immagine relativa al lisozima, evidenzia come anch'esso sia in grado di penetrare all'interno della cellula.

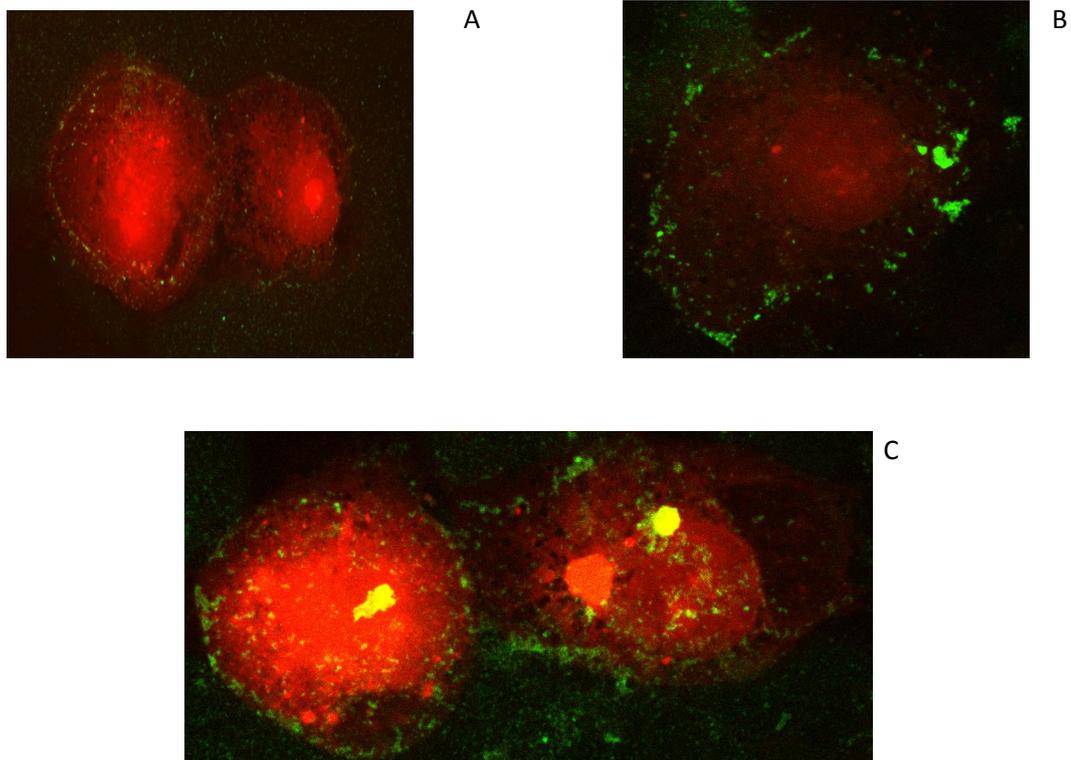


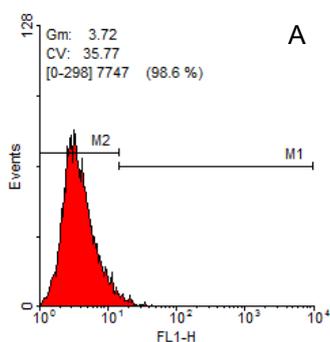
Fig 4.14: 3 differenti campi, acquisite al microscopio confocale, di cellule HK-2 co-trattate con AGE (rosso) 20 μ M (pannello A) e lisozima (verde) 20 μ M (pannello B) per 1 h. Ingrandimento 60x.

4. Risultati

Nell'immagine 4.14 sono riportate le immagini relative al co-trattamento con AGE 20 μ M e lisozima 20 μ M. Queste immagini hanno confermato la capacità degli AGE e del lisozima di penetrare nella cellula, tuttavia non è possibile stabilire in maniera univoca se la presenza del lisozima sia in grado di influenzare l'ingresso nella cellula degli AGE o viceversa.

4.8 Analisi mediante citometria a flusso

I risultati ottenuti mediante analisi di citometria a flusso sono riportati nella Fig. 4.15. La fluorescenza misurata dopo il trattamento di 1 h con lisozima 20 μ M evidenzia la capacità del lisozima di penetrare all'interno della cellula (pannello B). La fluorescenza misurata dopo trattamento con Trypan Blue (*quenchant* di membrana) supporta che il lisozima si trova all'interno della cellula e non solo a livello di membrana. Gli AGE (20 μ M) (pannello C) dimostrano la capacità di penetrare all'interno della cellula, oltre che accumularsi sulla membrana cellulare. Il co-trattamento (lisozima-fitc+AGE, pannello D e AGE-fitc+lisozima, pannello E) non evidenzia variazioni significative determinate dalla presenza del lisozima o AGE rispettivamente sui livelli intracellulari di AGE e lisozima.



4. Risultati

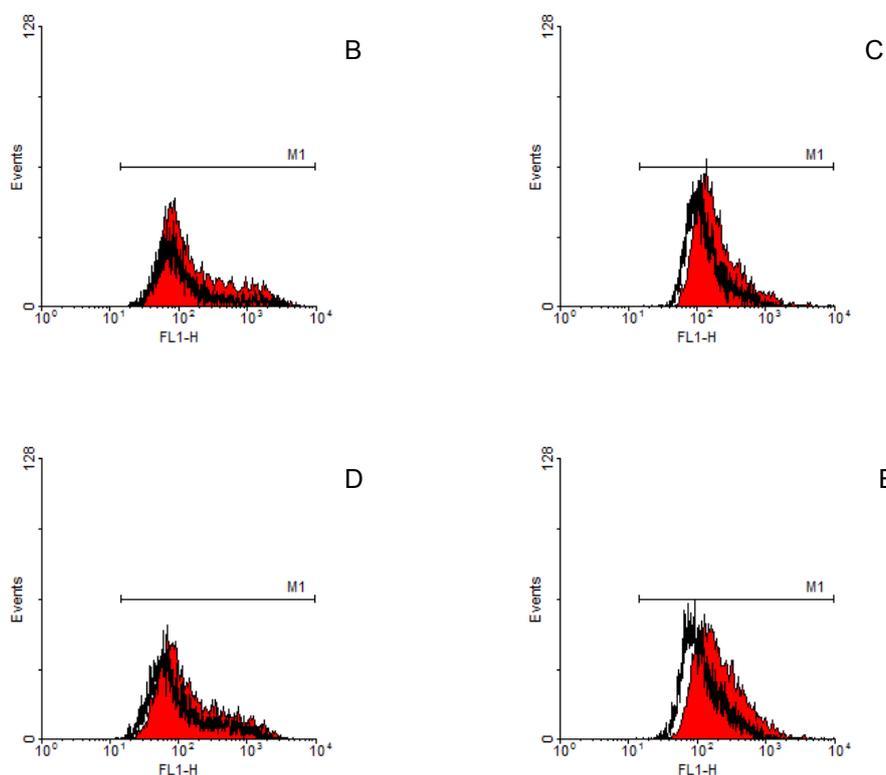


Fig. 4.15: Analisi citometrica di cellule HK-2 (pannello A, autofluorescenza), trattate per 1 h con lisozima-fits (20 μ M) (pannello B), AGE-fits (20 μ M) (pannello C), lisozima-fits+AGE (pannello D) e AGE-fits+lisozima (pannello E). L'area rossa rappresenta la fluorescenza totale delle cellule trattate con lisozima o AGE fluorescenti. L'area sottesa dal segnale nero esclude la fluorescenza associata alla membrana e rappresenta, quindi, la fluorescenza intracellulare.

4.9 Quantificazione del lisozima serico

Nella Fig. 4.16 sono riportati i dati relativi alla quantificazione del lisozima serico di ratti trattati oralmente con lisozima microincapsulato (62,5 mg/kg di micro particelle, corrispondente a 25 mg/kg di lisozima) o un'equidose di lisozima in forma libera. I profili relativi alle due somministrazioni mostrano un andamento simile, con un *trend* lineare nella fase immediatamente successiva alla somministrazione (1 h), un picco a 2 h dalla somministrazione e un ritorno ai livelli basali a 4 h dalla somministrazione. Il lisozima microincapsulato mostra un incremento significativo, del 40%, a 2 h dalla somministrazione rispetto al lisozima libero.

4. Risultati

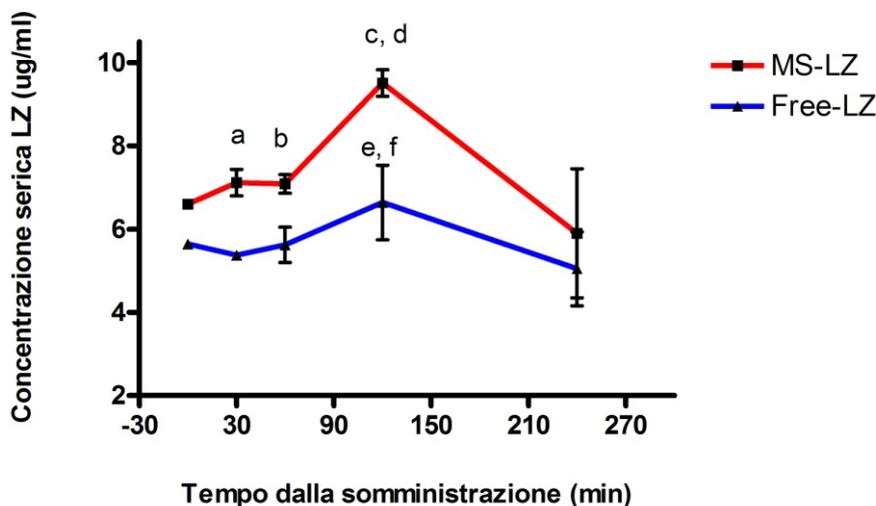


Fig. 4.16: Quantificazione del lisozima serico, mediante saggio turbidimetrico, in seguito a somministrazione orale in ratti Wistar di 62,5 mg/kg di MS-LZ ed un'equidose di lisozima libero. Analisi statistica: ANOVA + Tukey-Kramer: a = *** $p < 0,001$ vs Free-LZ $t=30'$; b = * $p < 0,05$ vs Free-LZ $t=1h$; c = *** $p < 0,001$ vs Free-LZ $t=2h$; d = *** $p < 0,001$ vs MS-LZ $t=0'$, $t=30'$, $t=60'$, $t=240'$; e = ** $p < 0,01$ vs Free-LZ $t=0'$, $t=60'$; f = * $p < 0,05$ vs Free-LZ $t=30'$.

4.10 Microscopia a fluorescenza

Le immagini acquisite con il microscopio a fluorescenza sono riportate nella Fig. 4.17. Le cellule trattate con cloroquina (100 μM per 4 h, controllo positivo, pannello B), evidenziano un aumento della presenza dei lisosomi (verde) rispetto al controllo negativo (pannello A). Il lisozima (20 μM per 1 h) non ha mostrato la capacità di variare le concentrazioni di lisosomi (pannello C), mentre gli AGE (20 μM per 1 h) determinano un aumento della concentrazione di lisosomi con un *trend* simile a quello osservato per la cloroquina, senza tuttavia localizzarsi all'interno dei lisosomi stessi (pannello D). Il co-trattamento non ha variato la concentrazione di lisosomi rispetto al trattamento con i soli AGE, ma favorisce la co-localizzazione del segnale degli AGE (rosso) e dei lisosomi (verde) (pannello E).

4. Risultati

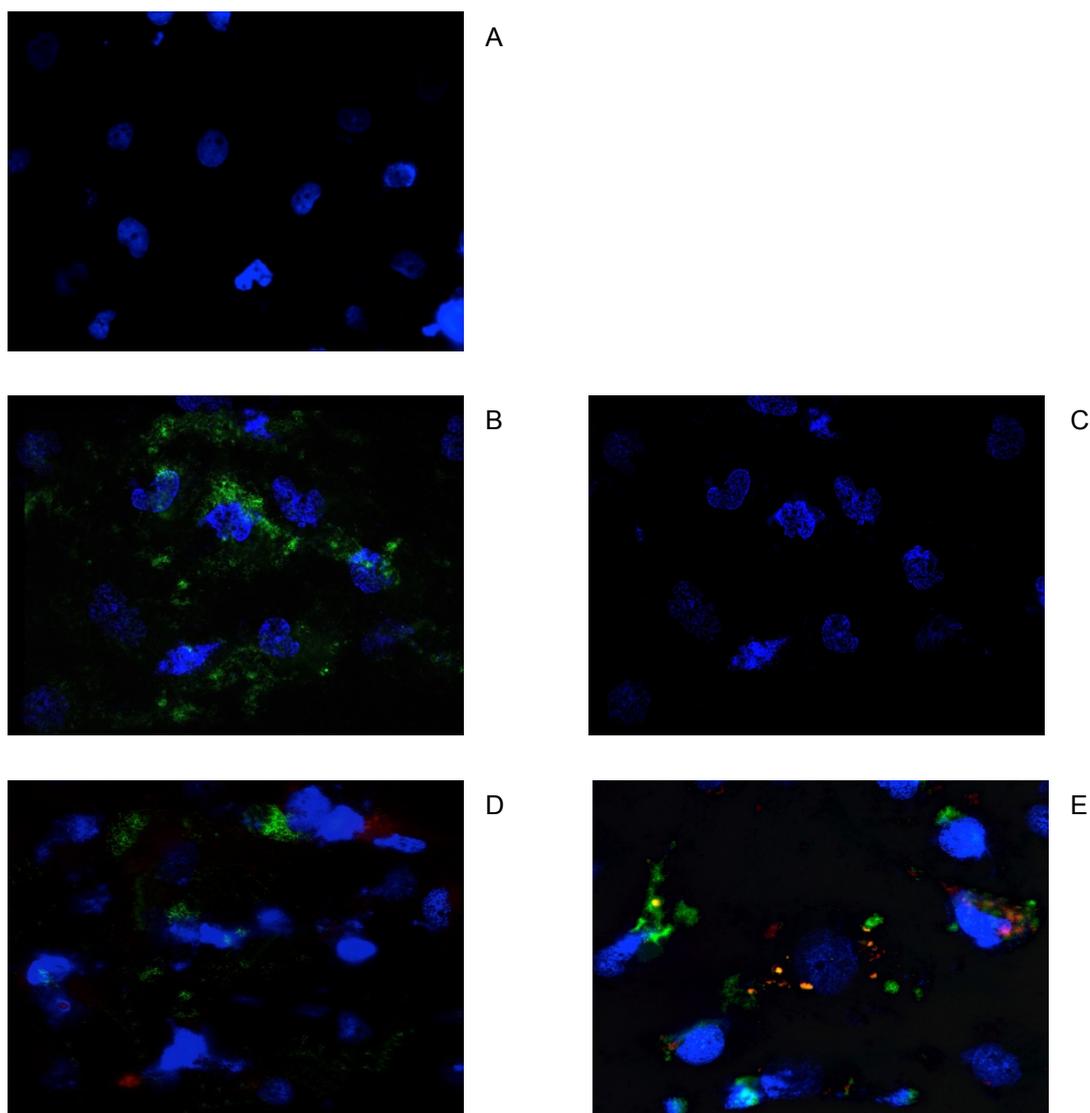


Fig. 4.17: Analisi di microscopia a fluorescenza su cellule HK-2 non trattate (pannello A), trattate con cloroquina (pannello B), trattate con lisozima (pannello C), trattate con AGE (pannello D), co-trattate con lisozima e AGE (pannello E). Blu: tracciante nucleare (Hoechst 33342). Rosso: AGE-rodamina. Verde: tracciante lisosomiale (Lyso-ID).

4.11 Espressione p38 fosforilata

I risultati relativi lo studio dell'espressione di p38 fosforilata sono riportati nella Fig. 4.18. Le cellule trattate con gli AGE (20 μ M per 1 h) hanno indotto un incremento nell'espressione di p38 fosforilata. Il trattamento con il lisozima non ha determinato variazioni nei livelli di p38 fosforilato. Il trattamento con una dose equimolare di lisozima e AGE, ha evidenziato una prevenzione nell'incremento della fosforilazione di p38.

4. Risultati

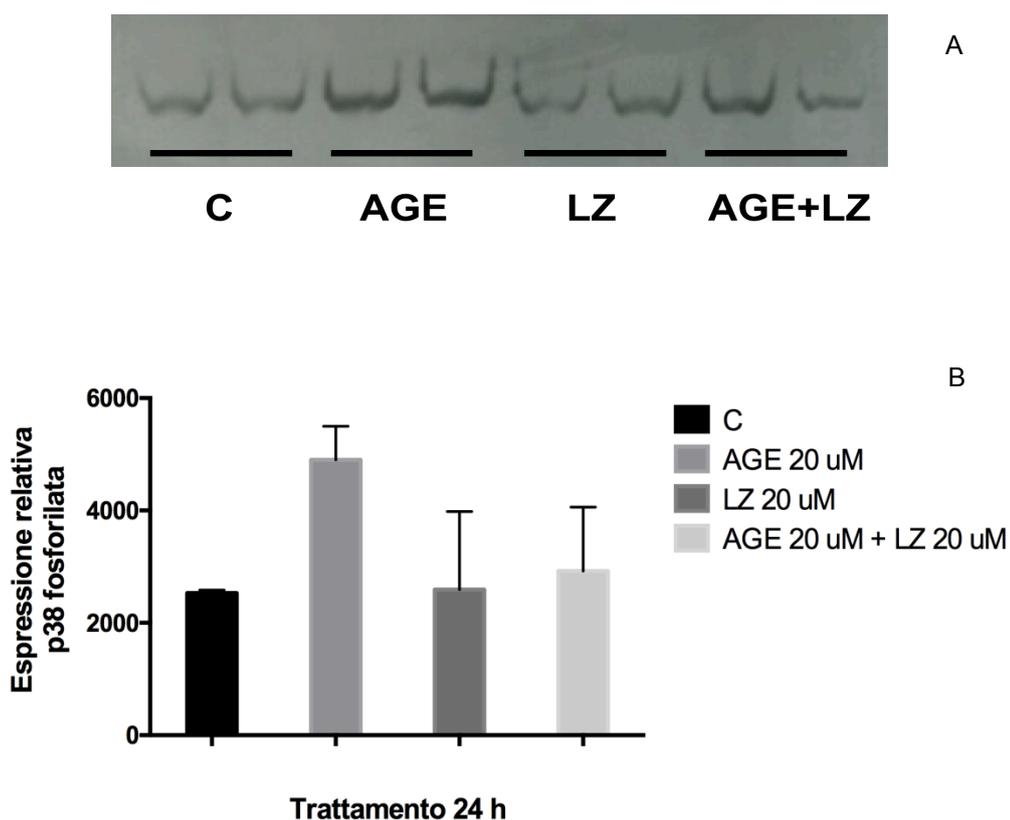


Figura 4.18: Espressione di p38 fosforilata, analizzata mediante western blot. Nel pannello A sono riportate le bande relative ai trattamenti con AGE e LZ 20 μ M di 24 h. Nel pannello B è riportata l'analisi densitometrica delle bande. Analisi statistica: ANOVA+Tukey-Kramer.

Discussione e conclusioni

5. Discussione e conclusioni

5. Discussione

Il diabete è la principale causa di malattie renali terminali nell'Occidente sviluppato. Evidenze sperimentali correlano l'insorgenza e la progressione della nefropatia diabetica all'abnorme formazione ed accumulo degli AGE evidenziata nei pazienti diabetici. Recentemente, è stata identificata un'interessante e promettente proprietà del lisozima, ossia quella di *scavenger* anti-AGE (Zheng et al., 2001). Evidenze sperimentali hanno, infatti, dimostrato l'efficacia del lisozima microincapsulato nel prevenire l'insorgenza dei sintomi precoci della nefropatia diabetica, quali microalbuminuria ed ipertrofia glomerulare (Cocchietto et al., 2008).

Per conseguire l'obiettivo di investigare gli aspetti molecolari, alla base dell'attività nefroprotettiva del lisozima, è stato identificato un modello cellulare adeguato ad approfondire *in vitro* alcuni aspetti dell'attività AGE-protettiva del lisozima. La scelta è avvenuta nell'ambito di tre differenti tipi cellulari: una coltura primaria di cellule endoteliali (ADMEC), per via della nota implicazione del tessuto vascolare nel diabete (Fowler, 2011) e due linee cellulari di tubulo prossimale renale, LLC-PK₁ (di origine suina) e HK-2 (di origine umana), per via del coinvolgimento tubulare nel contesto della nefropatia diabetica (Magri et al., 2009). Per questioni di ordine pratico e logistico: "finestra operativa" limitata, scarsa riproducibilità della coltura primaria, origine suina delle cellule LLC-PK₁ e per questioni di ordine scientifico: espressione del recettore RAGE e sensibilità ai trattamenti con AGE, la scelta è ricaduta sulla linea cellulare HK-2, la cui sensibilità ai trattamenti con AGE in termini di vitalità, misurata mediante MTT e SRB, ha mostrato un decremento dose-dipendente e tempo-indipendente, non contrastato dalla presenza del lisozima.

Un aspetto cruciale della risposta infiammatoria è il reclutamento macrofagico (Crane et al., 2009). Come atteso, il *medium* condizionato dalle cellule HK-2, stimulate con gli AGE, ha significativamente incrementato la migrazione dei macrofagi mentre il co-trattamento con il

5. Discussione e conclusioni

lisozima ne ha prevenuta la migrazione, riportando il tasso migratorio a livelli comparabili ai controlli. Il reclutamento macrofagico in una sede di infiammazione può dipendere da numerosi fattori solubili rilasciati, quali interleuchine, TNF- α , molecole di adesione (Schmidt et al., 1999; Basta et al., 2002; Cipollone et al., 2003). L'attenzione è stata posta su IL-6, la cui modulazione del rilascio e della produzione è un evento cruciale nello sviluppo della nefropatia diabetica. Evidenze sperimentali hanno, infatti, dimostrato che le cellule infiltrate nel mesangio, nell'interstizio e nei tubuli erano positive per mRNA codificante per IL-6 (Suzuki et al., 1995). Queste evidenze sono state, successivamente, confermate da un lavoro nel quale è stato dimostrato che IL-6 era overespressa a livello renale in ratti diabetici, con elevati livelli di mRNA codificante per IL-6 nella corteccia renale, eventi direttamente associati ad una presenza di IL-6 nelle urine (Navarro-Gonzalez et al., 2006). Inoltre, in un altro lavoro (Seizuka et al., 1994), è stato dimostrato che i livelli serici di IL-6 in pazienti con nefropatia diabetica, erano significativamente più elevati rispetto i pazienti senza insulto renale. Nel presente lavoro, è stato dimostrato che il lisozima è capace di prevenire l'incremento di mRNA per IL-6 indotto dagli AGE, nelle cellule HK-2, rispetto ai controlli. Questi risultati sono stati confermati mediante un saggio ELISA che ha dimostrato la capacità del lisozima di inibire il rilascio di IL-6 nei sovrannatanti delle cellule trattate, secondo un andamento dose-dipendente.

I meccanismi noti che portano alla produzione ed al rilascio di IL-6 sono molteplici. In questa parte del lavoro, ci si è focalizzati sul ruolo del recettore RAGE e delle ROS, fattori associati agli AGE e strettamente correlati alla produzione e rilascio di IL-6. L'interazione AGE-RAGE, infatti, può indurre numerosi eventi, incluso un aumento dello stress ossidativo (Goh et al., 2008). Il lisozima non ha indotto variazioni significative dell'espressione del recettore RAGE, nonostante l'utilizzo di un ampio *range* di concentrazioni e tempi. Un andamento simile è stato misurato anche in seguito a trattamento con AGE (dati non riportati).

5. Discussione e conclusioni

Sulla base a queste evidenze, è ipotizzabile che le cellule HK-2, *in vitro* rispetto alla loro condizione originale, possano perdere la capacità di modulare l'espressione del recettore RAGE. Ipotesi confermata dall'assenza di variazioni significative rispetto ai controlli per quel che concerne la produzione di ROS intracellulari, in seguito a trattamenti con AGE. Il mancato aumento nella produzione di ROS potrebbe, infatti, dipendere dal fatto che non è inducibile un'overespressione del recettore RAGE.

L'attività del lisozima è associata anche alla sua azione di *scavenger* degli AGE (Zheng et al., 2001). Considerando tale aspetto, è stato investigato, mediante microscopia confocale, se la presenza del lisozima potesse influenzare la capacità degli AGE di penetrare nella cellula. Le immagini acquisite con questa tecnica hanno permesso di stabilire che gli AGE e il lisozima sono in grado di penetrare attraverso la membrana cellulare, mentre per quel che riguarda il co-trattamento sono stati necessari alcuni studi di citometria a flusso. I risultati suggeriscono che il lisozima non è in grado, in questo modello cellulare, di ridurre l'ingresso degli AGE nella cellula, escludendo che l'azione di *scavenger* sia alla base della prevenzione della produzione di IL-6 *in vitro*.

Ulteriori possibili *pathways* coinvolte nella produzione di IL-6 sono la cascata delle MAPK con p38 (Yang et al., 2010) e la via di degradazione lisosomiale (Zheng et al., 2001). I dati preliminari ottenuti hanno evidenziato che un possibile ruolo è attribuibile a p38, chinasi coinvolta nella produzione e rilascio di IL-6. Gli AGE, infatti, sono in grado di incrementare i livelli di fosforilazione di questa proteina, effetto ridotto dalla concomitante presenza di una dose equimolare di lisozima. Promettenti sono anche i primi dati ottenuti mediante lo studio di co-localizzazione degli AGE, in presenza di lisozima, nei lisosomi. Le immagini acquisite confermano, infatti, l'ipotesi che il lisozima sia in grado di veicolare gli AGE nei lisosomi, favorendone la degradazione ed eliminazione.

5. Discussione e conclusioni

Al fine di investigare se la maggior efficacia del lisozima microincapsulato sia dovuta alla capacità dei microsistemi di veicolare il lisozima nel torrente circolatorio più efficacemente di quanto non avvenga con la forma libera è stato messo a punto un modello *in vivo* nell'ambito del quale il lisozima è stato somministrato oralmente microincapsulato oppure libero. Nel corso di tale prova sono stati quantificati i livelli serici di lisozima mediante un saggio di attività. Confrontando l'attività associata al lisozima serico rispetto alla curva concentrazione-attività muramidasi di riferimento, è plausibile affermare che il lisozima somministrato microincapsulato raggiunge concentrazioni significativamente superiori rispetto ad una somministrazione di un'equidose di lisozima in forma libera. Non va comunque escluso l'aumento di lisozima riscontrato possa dipendere anche da una risposta macrofagica ai microsistemi. Ciò può essere spiegato basandosi su alcune delle principali caratteristiche dei microsistemi sviluppati presso la Fondazione Callerio, ovvero la gastroresistenza che protegge i principi attivi dai bassi valori di pH dello stomaco, il rilascio pH-dipendente a livello intestinale, la rugosità della superficie della micro particella e la sua mucoadesività dovuta al rivestimento esterno di chitosano.

Nell'arco di questo lavoro, è stata eseguita una prova pilota con tecnologia di Optical Imaging, nel corso della quale è stata dimostrata la tracciabilità del lisozima microincapsulato (marcato con una sonda fluorescente e prodotto con un sistema dedicato specificamente sviluppato) in un sistema vivente. Saranno necessari ulteriori studi, al fine di analizzare, con maggiore precisione, la cinetica e la localizzazione del lisozima, in seguito alla sua somministrazione orale in forma microincapsulata e libera.

In conclusione, vanno discussi alcuni importanti aspetti emersi nell'arco della ricerca. È necessario porre l'accento sulla difficoltà di simulare *in vitro* gli eventi AGE-indotti: la difficoltà nella selezione di un modello cellulare adeguato sensibile ai trattamenti con gli AGE, ma anche, e soprattutto, l'assenza di risposta in termini di stress ossidativo

5. Discussione e conclusioni

sono stati due aspetti rilevanti da superare. Evidenze bibliografiche e sperimentali avevano, infatti, insistito sul ruolo cruciale svolto dalle ROS, evento che nel nostro modello cellulare non è stato possibile simulare, nonostante l'utilizzo di diversi tipi di AGE.

Ciononostante, è stato possibile dimostrare il ruolo di IL-6 come *marker* di effetti AGE-indotti. Il lisozima ha dimostrato la capacità di agire su questa citochina, riducendone espressione intracellulare e rilascio, confermando *in vitro* la sua attività protettiva nei confronti degli AGE, già studiata *in vivo*. I meccanismi mediante i quali il lisozima possa limitare la produzione e il rilascio di IL-6 richiedono ulteriori studi, tuttavia sono promettenti i primi risultati ottenuti studiando il ruolo di p38. I dati acquisiti con la citofluorimetria e con la microscopia confocale, inoltre, hanno dimostrato la capacità di AGE e lisozima di accumularsi nella cellula, ma in distretti differenti, aprendo nuove ipotesi riguardo i meccanismi molecolari che potrebbero essere attivati dal lisozima.

I risultati presentati in questo lavoro, da soli, non sono sufficienti a descrivere completamente il meccanismo molecolare alla base dell'attività nefroprotettiva del lisozima. A tal fine, infatti, sarà necessario investigare ulteriori *pathway* coinvolte nella risposta infiammatoria, quali TNF- α , IL-1 o NF- κ B. Tuttavia, la presente ricerca ha dato il suo contributo nell'individuare il lisozima come possibile molecola coinvolta nella prevenzione della risposta infiammatoria, evento chiave nel danno nefropatico.

Le prove *in vivo* effettuate in questo studio hanno, inoltre, dimostrato la capacità dei microsistemi di veicolare il lisozima nel torrente circolatorio, in maniera significativamente maggiore rispetto ad un'equidose di lisozima non microincapsulato.

È verosimile ipotizzare, in conclusione, che un'azione sinergica dei meccanismi cinetici (maggior concentrazione plasmatica) e molecolari (riduzione della risposta infiammatoria), oltre alla nota azione di scavenging, conferisca al lisozima un importante ruolo nel trattamento della nefropatia diabetica.

5. Discussione e conclusioni

La conferma di queste attività potrebbe aprire nuove finestre di ricerca per il lisozima, attribuendogli un possibile impiego come coadiuvante nella terapia per la nefropatia diabetica.

Bibliografia

6. Bibliografia

- Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus – present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol.* 2011; 8: 228-236.
- Williams R, Van Gaal L, Lucioni C. Assessing the impact of complications on the costs of Type II diabetes. *Diabetologia.* 2002; 45: 13-17.
- Fowler MJ. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical Diabetes.* 2008; 26: 77-82.
- US Renal Data System (USRDS). Annual Data Report. The national Institutes of Health, National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases: Bethesda, MD, 2007.
- Zelmanovitz T, Gerchmann F, Balthazar APS, Thomazelli FCS, Matos JD, Canani LH. Diabetic nephropathy. *Diabetology & Metabolic Syndrome.* 2009; 1: 10.
- Nielsen SE, Sugaya T, Tarnow L, Lajer M, Schjoedt KJ, Austrup AS, Baba T, Parving HH, Rossing P. Tubular and glomerular injury in diabetes and the impact of ACE inhibition. *Diabetes Care.* 2009; 32: 1684-1688.
- Asanuma K, Mundel P. The role of podocyte in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol.* 2003; 7: 255-259.
- Magri CJ, Fava S. The role of tubular injury in diabetic complications. *European Journal of Internal Medicine.* 2009; 20: 551-555.
- Ginevri F, Piccotti E, Alinovi R, Detoni T, Biagini C, Chiggeri GM, Gusmano R. Reversible tubular proteinuria precedes microalbuminuria and correlates with the metabolic status in diabetic children. *Pediatr Nephrol Feb.* 1993; 7: 23-26.
- Thomas MC, Burns WC, Cooper ME. Tubular changes in early diabetic nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2005; 12: 177-186.
- Kanwar YS, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner EI, Chen S, Chugh S, Danesh FR. Diabetic nephroathy: mechanisms of renal disease progression. *Exp Biol Med.* 2008; 233: 4-11.

6. Bibliografia

- The Microalbuminuria Collaborative Study Group. Predictors of the development of microalbuminuria in patients with type I diabetes mellitus: a seven-year prospective study. *Diabet Med.* 1997; 16: 18-925.
- Gall MA, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving HH. Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus: prospective, observational study. *BMJ.* 1997; 314: 783-788.
- Ravid M, Brosh D, Ravid-Safran D, Levy Z, Rachmani R. Main risk factors for nephropathy in type 2 diabetes mellitus are plasma cholesterol levels, mean blood pressure and hyperglycemia. *Arch Intern Med.* 1998; 158: 998-1004.
- Forsblom CM, Groop PH, Elkstrand A, Totterman KJ, Sane T, Saloranta C, Groop L. Predictors of progression from normoalbuminuria to microalbuminuria in NIDDM. *Diabetes Care.* 1998; 21: 1932-1938.
- Toeller M, Buyken A, Heitkamp G, Bramswig S, Mann J, Milne R, Gries FA, Keen H. Protein intake and urinary albumin excretion rates in the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia.* 1997; 40: 1219-1226.
- Krolewski AS. Genetics of diabetic nephropathy: evidence for major and minor gene effects. *Kidney Int.* 1999; 55: 1582-1596.
- Krolewski AS, Ng DP, Canani LH, Warram JH. Genetics of diabetes nephropathy: how far are we from finding susceptibility genes? *Adv Nephrol Necker Hosp.* 2001; 31: 295-315.
- Abdel-Rahman EM, Saadulla L, Reeves WB, Awad AS. Therapeutic modalities in diabetic nephropathy: standard and emerging approaches. *J Gen Intern Med.* 2011; 27: 458-468.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001; 414: 813-820.
- Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res.* 2001; 56: 1-21.

6. Bibliografia

- Vlassara H, Uribarri J. Glycooxidation and diabetic complications: Modern lessons and a warning? *Rev Endocrin Metab Disord.* 2004; 5: 181-188.
- Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 2006; 114: 597-605.
- Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JEB. Diabetes and advanced glycooxidation end products. *Diabetes Care.* 2006; 29: 1420-1432.
- Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289: 645-659.
- O'Brien J, Morrissey PA. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in food. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1989; 28: 211-248.
- Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE, Vlassara H. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc.* 2010; 110: 911-916.
- Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H. Advanced glycation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc.* 2004; 104: 1287-1291.
- Eble AS, Thorpe SR, Baynes JW. Nonenzymatic glycosylation and glucose-dependent cross-linking of proteins. *J Biol Chem.* 1983; 258: 9406-9412.
- Vlassara H. The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Metab Rev.* 2001; 17: 436-443.
- Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res.* 1999; 84: 641-648.

6. Bibliografia

- Ramasamy R, Vannucci SJ, Yan SSD, Herold K, Yan SF, Schmidt AM. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology*. 2005; 15: 16-25.
- Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. *Experimental Gerontology*. 46: 217-224.
- Yan SD, Schmidt AM, Anderson G, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation endproducts with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem*. 1994; 269: 9889-9897.
- Vlassara H, Cai W, Crandall J, Goldberg T, Oberstein R, Dardaine V, Peppas M, Rayfield EJ. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc Natl Acad Sci*. 2002; 99: 15596-15601.
- Goh SY, Cooper ME. The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 96: 1143-1152.
- Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science*. 1986; 232: 1629-1632.
- Forbes JM, Soulis T, Thallas V, Panagiotopoulos S, Long DM, Vasan S, Wagle D, Jerums G, Cooper ME. Renoprotective effects of a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetologia*. 2001; 44: 108-114.
- Peppas M, Brem H, Cai W, Zhang JG, Basgen J, Li Z, Vlassara H, Uribarri J. Prevention and reversal of diabetic nephropathy in db/db mice treated with alagebrium (ALT-117). *Am J Nephrol*. 2006; 26: 430-436.
- Zheng F, Cai W, Mitsuhashi T, Vlassara H. Lysozyme enhances renal excretion of advanced glycation endproducts. *Molecular Medicine*. 2001; 7: 737-747.

6. Bibliografia

- Cocchietto M, Zorzin L, Toffoli B, Candido R, Fabris B, Stebel M, Sava G. Orally administered microencapsulated lysozyme downregulates serum AGE and reduces the severity of the first stage of diabetic nephropathy. *Diabetes & Metabolism*. 2008; 34: 589-594.
- Fleming A, Allison VD. *Br J Exp Pathol*. 1922; 5: 252-275.
- Jolles P. A possible physiological function of lysozyme. *Biomedicine*. 1976; 25: 275-276.
- Pacor S., Giacomello E., Bergamo A., Gagliardi R., Cocchietto M., Sava G., 1996 - Cytofluorimetric analysis of gut-intraepithelial and mesenteric lymph node lymphocytes of tumour-bearing mice fed with egg-white lysozyme. *Anticancer Res*. **16**, 145-150.
- Zorzin L., Cocchietto M., Voinovich D., Marcuzzi A., Filipovic-Grcic J., Mulloni C., Crembiale G., Casarsa C., Bulla R., Sava G., 2006 - Lysozyme-containing chitosan-coated alginate microspheres for oral immunisation. *J Drug Del Sci Techn*. **16**, 413-420.
- Sava G, Ceschia V, Zabucchi G. Evidence for host-mediated antitumor effects of lysozyme in mice bearing the MCa mammary carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1988; 24: 1737-1743.
- Sava G, Benetti A, Ceschia V, Pacor S. Lysozyme and cancer: role of exogenous lysozyme as anticancer agent. *Anticancer Res*. 1989; 9: 583-591.
- Li YM, Tan AX, Vlassara H. Antibacterial activity of lysozyme and lactoferrin is inhibited by binding of advanced glycation-modified proteins to a conserved motif. *Nature medicine*. 1995; 1: 1057-1061.
- Mitsuashi T, Li YM, Fishbane S, Vlassara H. Depletion of reactive advanced glycation endproducts from diabetic uremic sera using a lysozyme-linked matrix. *J Clin Invest*. 1997; 100: 847-854.
- Robinson V. Finding alternatives: an overview of the 3Rs and the use of animals in research. *School Science Review*. 2005. 87: 111-114.

6. Bibliografia

- Garattini S. Sperimentazione animale: vantaggi e limiti di un “modello” dell’uomo. *The Lancet*. 2006. 2: 2.
- Brandon EFA, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JHM. An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotrasformation research: pros and cons. *Toxicology and applied pharmacology*. 2003. 189: 233-246.
- Wang R, Xu J, Juliette L, Castilleja A, Love J, Sung SY, Zhau HE, Goodwin TJ, Chung LWK. Three-dimensional co-culture models to study prostate cancer growth, progression, and metastasis to bone. *Seminars in cancer biology*. 2005. 15: 353-364.
- Arnaud CH. Mimicking biological system. Control of the chemistry and physics of cell-populated microenvironments reveals new biology. *Chemical and engineering news*. 2007. 85: 14-19.
- Hillman EM, Amoozegar CB, Wang T, McCaslin AF, Bouchard MB, Mansfield J, Levenson RM. *In vivo* optical imaging and dynamic contrast methods for biomedical research. *Philosophical Transaction*. 2011; 28: 4620-4643.
- Magri CJ, Fava S. The role of tubular injury in diabetic nephropathy. *Eur J Intern Med*. 2009; 20: 551-555.
- Crane MJ, Hokeness-Antonelli KL, Salazar-Mather TP. Regulation of inflammatory monocyte/macrophage recruitment from the bone marrow during murine cytomegalovirus infection: role for type 1 interferons in localized induction of CCR2 ligands. *Journal of Immunology*. 2009; 183: 2810-2817.
- Basta G, Lazzerini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Ku C, Kislinger T, Stern DM, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation*. 2002;105:812-822.
- Cipollone F, Iezzi A, Fazio M, Zucchelli M, Pini B, Cuccurullo C, De Cesare D, De Blasis G, Muraro R, Bei R, Chiarelli F, Schmidt AM, Cuccurullo F, Mezzetti A. *Circulation*. 2003;108:1070-1077.

6. Bibliografia

- Yang K, Wang XQ, He YS, Lu L, Chen QJ, Liu J, Shen WF. Advanced glycation endproducts induce chemokine/cytokine production via activation of p38 pathway and inhibit proliferation and migration of bone marrow mesenchymal stem cells. *Cardiovasc Diabetol.* 2010; 9: 66-75.

Siti internet consultati:

www.who.int

Indice

Indice

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Il diabete e le sue complicanze	2
1.2 La nefropatia diabetica	4
1.3 AGE e terapia anti-AGE	6
1.4 Il lisozima	9
1.4.1 Lisozima, AGE e nefropatia diabetica.....	11
1.5 Somministrazione orale e microincapsulazione	13
1.6 <i>In vivo</i> o <i>in vitro</i> questo è il problema	14
2. SCOPO DELLA RICERCA	17
3. MATERIALI E METODI	20
3.1 Materiali utilizzati	21
3.2 Linee cellulari.....	21
3.2.1 Cellule umane di endotelio del microcircolo dermico ADMEC.....	22
3.2.2 Linea cellulare di tubulo prossimale renale suino LLC- PK ₁	22
3.2.3 Linea cellulare di tubulo prossimale renale umano HK- 2.....	23
3.2.4 Linea cellulare di monociti umani U937	23
3.2.5 Condizioni di crescita	24
3.3 Composti utilizzati.....	24
3.3.1 Lisozima.....	24
3.2.5 Prodotti finali della glicosilazione avanzata (AGE)....	24
3.4 Test di vitalità: MTT	24
3.5 Test di vitalità: SRB	25
3.6 Quantificazione dei livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS)	26
3.7 Analisi dei livelli di mRNA di RAGE e IL-6: RT-PCR	28
3.7.1 Estrazione dell'mRNA totale e sintesi del cDNA.....	28
3.7.2 Amplificazione di cDNA mediante RT-PCR	30

Indice

3.8	Quantificazione di IL-6 mediante saggio ELISA	30
3.9	Saggio di migrazione	32
3.9.1	Fissaggio e colorazione delle cellule con cristal violetto	32
3.10	Microscopia confocale	33
3.10.1	Marcatura di lisozima con FITC e di AGE con Rho B	33
3.11	Produzione di microsistemi di alginato e HPMC rivestiti di chitosano contenenti lisozima.....	34
3.11.1	Preparazione della soluzione alimentante	34
3.11.2	Ciclo produttivo	35
3.12	Quantificazione del lisozima serico	36
3.12.1	Incannulazione dell'arteria caudale di ratti.....	36
3.12.2	Saggio turbidimetrico	38
3.13	Espressione della proteina p38	38
3.13.1	Estrazione proteica	38
3.13.2	Dosaggio proteico	39
3.13.3	SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis of protein.....	40
3.13.3.1	Preparazione della camera	40
3.13.3.2	Preparazione dei campioni.....	41
3.13.3.3	Corsa del gel	41
3.13.3.4	Ricette dei gel.....	41
3.13.3.5	Tamponi utilizzati.....	42
3.13.4	Western blot.....	42
3.13.4.1	Preparazione della camera	42
3.13.4.2	Trasferimento delle proteine.....	43
3.13.4.3	Tamponi utilizzati.....	43
3.13.5	Incubazione con gli anticorpi.....	44
3.13.6	Sviluppo con chemiluminescenza.....	44
3.14	Citometria a flusso.....	45
3.15	Studio dei lisosomi.....	46
3.16	Optical Imaging.....	46

Indice

3.17	Analisi statistica	47
4.	RISULTATI	48
4.1	Citotossicità degli AGE	49
4.1.1	Vitalità delle cellule ADMEC in seguito a trattamenti con AGE	49
4.1.2	Vitalità delle cellule LLC-PK ₁ in seguito a trattamenti con AGE	51
4.1.3	Vitalità delle cellule HK-2 in seguito a trattamenti con AGE	53
4.2	Quantificazione della produzione di ROS intracellulari.....	55
4.2.1	Livelli intracellulari di ROS nelle cellule ADMEC	55
4.2.2	Livelli intracellulari di ROS nelle cellule LLC-PK ₁	56
4.2.3	Livelli intracellulari di ROS nelle cellule HK-2	58
4.3	Quantificazione dei livelli di mRNA del recettore RAGE.....	59
4.4	Quantificazione dei livelli di mRNA di IL-6.....	60
4.5	Quantificazione del rilascio di IL-6 nei sovranatanti	61
4.6	Saggio di migrazione	61
4.7	Microscopia confocale	62
4.8	Analisi di citometria a flusso	64
4.9	Quantificazione del lisozima serico	65
4.10	Microscopia a fluorescenza	66
4.11	Espressione di p38 fosforilata	67
5.	DISCUSSIONE	69
6.	BIBLIOGRAFIA	76



Desidero ringraziare la **Fondazione C&D Callerio Onlus** (Istituto di Ricerche Biologiche) ed il **LINFA** (*Laboratorio per l'Identificazione di Nuovi Farmaci Antimetastatici*) per avermi ospitato nei suoi laboratori e per aver messo a mia disposizione le strutture e le attrezzature necessarie per lo svolgimento della parte sperimentale della ricerca e le apparecchiature informatiche per l'elaborazione dei dati ottenuti.

Ringraziamenti

Ci risiamo. Trascorsi 3 anni dall'ultima volta, ci si ritrova a scrivere i ringraziamenti.

Nel mio percorso ho incontrato e conosciuto molte persone che, chi più e chi meno, mi hanno influenzato in questo percorso. Innanzitutto desidero ringraziare il prof. Sava per avermi permesso di svolgere il mio dottorato in Fondazione Callerio e per avermi seguito in questi 3 anni. Un ringraziamento va al Dr. Moreno Cocchietto, supervisor e figura di riferimento fondamentale per la crescita scientifica e personale.

Un sentito ringraziamento alla Dr.ssa Bergamo, persona sempre disponibile a dare un consiglio e compagnia di numerosi pranzi.

Un ringraziamento speciale va a Vania e Chiara, persone e amiche speciali, vicine in ogni (dis)avventura. Avete contribuito, in maniera fondamentale, a non farmi perdere la fiducia nei momenti più difficili. Un pensiero speciale va a tutto lo staff della Fondazione Callerio: da Michele, per l'amicizia ma anche per l'azoto da trasportare, le autoclavi ed i concerti; Patrizia e la casetta in Canada; Selena, Giulia, Elisa, Nina e, perché no Shonum e Cal Vin tesisti più o meno vicini, ma sicuramente compagni in grado di farmi crescere sotto tanti aspetti. Ringrazio Giuliano, le sue pizze e le serate a base di politica e calcio di altri tempi.

Grazie a Mamma, Papà, Angelo e Valentino, la mia famiglia. Siete le persone che hanno pagato maggiormente il conto del mio carattere nei momenti difficili, ma sicuramente le persone che mi hanno sostenuto di più e mi hanno permesso di raggiungere i miei traguardi.

La persona che più desidero ringraziare è Nicole, compagna di una vita insieme. Sei sempre l'unica in grado di farmi combattere anche quando sembra tutto perso, l'unica capace di trasformare le debolezze in punti di forza. Grazie di essere sempre con me. Se tanti sforzi sono stati premiati, gran parte del merito è tuo e del tuo modo di essere, semplicemente fantastica.