



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : Scienze Veterinarie
INDIRIZZO: Scienze Cliniche Veterinarie
CICLO XXI

**EFFETTO DEGLI OPIOIDI SULLE CELLULE DI TUBULO RENALE
PROSSIMALE: STUDIO IN VITRO E POSSIBILI APPLICAZIONI**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Massimo Morgante
Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Maurizio Isola
Supervisore: Ch.mo Prof. Roberto Busetto

Dottorando: Luca Bellini

ABSTRACT

Opioid are the most commonly used analgesics drugs in medicine. Beside their effect on the nervous system additional peripheral properties are also being discovered. Recently, opioid pre-conditioning and anti-apoptotic functions are some of the most studied secondary effects of these drugs. Ischemia and reperfusion injury are unavoidable insults occurring to the graft as a consequence of transplantation. As opioid receptors are expressed in the kidney, the aim of this study is to assess the effect of this class of analgesics on viability, apoptosis and necrosis in a kidney proximal tubular cell line before and after undergoes an ischemic event.

OK cells (Opossum Kidney tubular cells) expressing κ opioid receptor were exposed to 4 different opioid analgesic solutions (morphine, fentanyl, butorphanol and buprenorphine) containing 10^{-10} , 10^{-8} and 10^{-5} M of each drug. Cells were tested in different conditions: 1) opioids were added to culture medium for 48 hours; 2) cells were pre-treated and recovered with an opioid or were exposed before or 2 hours after a simulated ischemia (SI) which was performed by ATP depletion with antimycin A and 2-deoxy-D-glucose. Colorimetric cell viability assay, luminescent ATP assay and caspase-3 and -7 activity were performed. Apoptosis and necrosis were also evaluated by annexine-V/propidium iodide staining and flow cytometric analysis.

At a high concentration fentanyl and buprenorphine decreased OK cells survival after 48 hours of exposure but the effect was limited and not significant. In ATP depletion studies, morphine and fentanyl exhibited a positive effects in preserving cellular ATP content and in decreasing caspases activities and apoptotic and necrotic ratios. Fentanyl preserved the ATP content also when administered before the SI. The present study showed no effect by butorphanol and buprenorphine on improving the ATP

content nor decreasing caspases activity or apoptosis.

Pure agonists of κ opioid receptors decrease the cellular damage due to ischemia/reperfusion injury mainly by maintaining intracellular ATP content but by also suppressing apoptosis. Therefore this class of drugs should be as preferred analgesics during kidney transplantation surgery.

Key words: Opioid, Apoptosis, Kidney proximal tubular cell, ischemia/reperfusion injury

Gli analgesici oppioidi sono ampiamente usati in medicina. Questa classe di farmaci, oltre ad una azione sul sistema nervoso, ha effetti anche a livello di tessuti periferici dove i recettori oppioidi vengono espressi. Negli ultimi anni diversi studi mostrano come il preconditionamento con oppioidi abbia effetti protettivi contro i danni dovuti a ischemia e riperfusione che si presentano inevitabilmente durante un trapianto d'organo. Lo scopo del lavoro è quello di valutare l'effetto su una linea cellulare derivante da tubulo renale prossimale che esprime i recettori κ degli oppioidi, sottoposta o meno ad un evento ischemico.

Le cellule OK (Opossum Kidney tubular cells) sono state esposte a 4 oppioidi (morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina) alle concentrazioni di 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-5} M. Le cellule erano: 1) esposte ai farmaci per 48 ore; 2) esposte agli analgesici prima e dopo un evento ischemico indotto con antimicina A e 2-Deossi-D-glucosio od ancora trattate con i farmaci solo prima o solamente dopo. Sono state eseguite prove colorimetriche e di luminescenza per valutare la vitalità cellulare, il contenuto di ATP e attivazione delle caspasi-3 e -7. Prove citofluorimetriche erano impiegate per valutare l'apoptosi e la necrosi.

Ad alte dosi fentanyl e buprenorfina diminuiscono la sopravvivenza delle cellule OK dopo 48 ore di esposizione ma l'effetto è limitato e non rilevante. La morfina e il fentanyl hanno un effetto positivo nel preservare il contenuto di ATP e nel diminuire l'attivazione delle caspasi e l'apoptosi. anche la necrosi diminuisce quando le cellule sono esposte a questi oppioidi prima e dopo l'evento ischemico. Il fentanyl mantiene elevato l'ATP anche quando somministrato prima dell'evento ischemico. Butorfanolo e buprenorfina non mostrano alcun effetto positivo sul contenuto di ATP o sull'apoptosi.

Gli agonisti puri dei recettori degli oppioidi κ prevengono la comparsa di apoptosi e necrosi preservando il contenuto cellulare di ATP dopo ischemia. Il loro impiego potrebbe dimostrare dei vantaggi nel prevenire i danni da ischemia e riperfusione durante interventi di trapianto renale

Parole chiave: Oppioidi, Apoptosi, Cellula renale tubulare prossimale, Danni da ischemia e riperfusione

CAPITOLO 1: APOPTOSI.....	1
DEFINIZIONE E TERMINOLOGIA	3
RUOLO E STUDIO DELL' APOPTOSI NEGLI INVERTEBRATI	4
IL PROCESSO DELL' APOPTOSI.....	6
CASPASI.....	8
ATTIVAZIONE DELLE CASPASI.....	11
VIA RECETTORIALE	11
VIA MITOCONDRIALE	12
VIA DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO.....	14
MOLECOLE TARGHET DELLE CASPASI.....	14
REGOLAZIONE DELL' ATTIVAZIONE DELLE CASPASI	16
APOPTOSI E TRAPIANTO DI RENE	17
PATOFISIOLOGIA DELLE LESIONI CELLULARI INDOTTE DA DANNI DA ISCHEMIA/RIPERFUSIONE	19
 CAPITOLO 2: RECETTORI DEGLI OPIOIDI.....	 23
STRUTTURA MOLECOLARE.....	28
PROTEINE G.....	33
EVENTI MOLECOLARI DOPO ATTIVAZIONE DEI RECETTORI OPIOIDI.....	38
CASCATE ENZIMATICHE	40
CANALI IONICI	42
REGOLAZIONE DELLA TRASCRIZIONE GENICA.....	44
REGOLAZIONE DELL' ATTIVITÀ DEL RECETTORE.....	45
EFFETTO DEGLI OPIOIDI SULLA FUNZIONALITÀ RENALE	46
 CAPITOLO 3: OBIETTIVI.....	 49
 CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI	 53
FARMACI.....	56
DEPLEZIONE DI ATP	56
STUDI DI VITALITÀ CELLULARE	57
CONTENUTO DI ATP INTRACELLULARE.....	57
STUDI DELL' ATTIVITÀ DELLE CASPASI -3 E -7	57
ANALISI CITOFUORIMETRICHE	58
VALUTAZIONE DELL' APOPTOSI E DELLA NECROSI CON L' UTILIZZO DI ANNESSINA V/PI .	58
STUDIO DEL CICLO CELLULARE CON L' UTILIZZO DI PROPIDIO IODURO	59
PROTOCOLLO SPERIMENTALE	59
PRESENTAZIONE DEI DATI ED ELABORAZIONE STATISTICA	60
 CAPITOLO 5: RISULTATI.....	 63
EFFETTO DEI FARMACI OPIOIDI SULLE OK	65
EFFETTO DEI FARMACI OPIOIDI SULLE OK SOTTOPOSTE A DEPLEZIONE DI ATP .	67
A) VALUTAZIONE DEL CONTENUTO DI ATP.....	67
B) VALUTAZIONE DELL' ATTIVITÀ CASPASICA	69
C) ANALISI DELL' APOPTOSI MEDIANTE COLORAZIONE CON ANNESSINA/PI	70
 CAPITOLO 6: DISCUSSIONI E CONCLUSIONI	 102

CAPITOLO 1: APOPTOSI

DEFINIZIONE E TERMINOLOGIA

La parola *apoptosi* deriva dal greco ed indica la caduta delle foglie e dei petali dei fiori in autunno. I primi ad impiegare il termine in ambito citopatologico furono Kerr *et al.* in una pubblicazione del 1972 per descrivere l'aspetto morfologico assunto da alcune linee cellulari che andavano incontro a morte. Il termine in seguito venne frequentemente usato come sinonimo di morte cellulare programmata, come la si osserva nei normali processi di sviluppo ed invecchiamento dei tessuti (Wyllie 1974).

Studi successivi hanno messo in evidenza come le modificazioni morfologiche che le cellule assumevano erano dovute all'attivazione di una particolare famiglia di cisteina-proteasi, le caspasi. Negli altri tipi di morte cellulare programmata queste proteasi non necessariamente venivano attivate e questo sollevò il problema della definizione di apoptosi e di morte programmata (Kromer *et al.* 2005).

Negli ultimi anni si è cercato di fare chiarezza e trovare una definizione univoca con cui si potesse chiaramente definire questo particolare fenomeno, che non necessariamente è associato al concetto di morte cellulare programmata. Infatti la definizione di apoptosi così come fu proposta dagli autori che per primi introdussero il termine è legata unicamente a un aspetto morfologico che la cellula assume e nulla ha a che vedere con l'eziologia o il meccanismo molecolare che la causa. Parte del problema della nomenclatura è legato al fatto che negli anni sono stati scoperti diversi tipi di morte cellulare e attualmente ne sono noti almeno 11 tra cui 10 avvengono per morte programmata (Melino *et al.* 2005). Per cercare di fare chiarezza tra le varie definizioni che sono state impiegate nella letteratura scientifica, il fenomeno di morte cellulare è stata suddiviso arbitrariamente in due categorie: morte apoptotica e non apoptotica (Blank & Shiloh 2007).

La prima categoria fa riferimento alla classica via osservata e descritta nel lavoro di Kerr del 1972 e viene talvolta anche denominata morte cellulare di tipo I; a questa classe appartiene anche la morte cellulare che si osserva quando la cellula perde adesione nei confronti della matrice in cui si trova o delle cellule circostanti, fenomeno questo definito *anoikis* (Gilmore 2005) che condivide con la prima diversi meccanismi molecolari ma che si differenzia nelle reazioni iniziali della cascata.

La morte programmata della cellula, che avviene attraverso un meccanismo differente dall'apoptosi, raggruppa diversi processi tra cui l'autofagia, la necrosi, la morte cellulare mitotica, conosciuta anche con il nome di “catastrofe mitotica”, e la morte cellulare indipendente dalle caspasi, in cui i fattori eziologici coinvolti sono simile a quelli che portano una cellula verso l'apoptosi ma che, a differenza di quest'ultima, manca dell'attivazione delle caspasi, enzimi proteolitici essenziali affinché le alterazioni morfologiche della cellula possano presentarsi (Bröker *et al.* 2005).

RUOLO E STUDIO DELL' APOPTOSI NEGLI INVERTEBRATI

Potenzialmente tutte le cellule che formano i tessuti dell'organismo possono andare incontro ad apoptosi quando vengono in contatto con uno stimolo appropriato. L'aspetto microscopico e le alterazioni morfologiche che assumono le cellule di mammifero che vanno in apoptosi sono simili a quelle che assumono le cellule in diversi organismi viventi appartenenti a diverse classi di vertebrati e invertebrati e questo fa pensare che il processo si sia conservato durante l'evoluzione degli esseri viventi come è provato dal fatto che la morfologia tipica della cellula apoptotica sia stata osservata e descritta anche in organismi meno evoluti (Ellis e Horvitz 1986, Cashio *et al.* 2005, Ishizuya-Oka *et al.* 2009).

I primi studi che chiarirono quale fosse la via molecolare responsabile della morte cellulare per apoptosi furono condotti su un nematode

microscopico, il *Caenorhabditis elegans* che presenta nella forma adulta un numero di cellule somatiche esattamente pari a 959 in tutti gli individui. Inoltre, dato il numero relativamente piccolo di cromosomi, in molti studi era stato sequenziato e mappato il DNA e si era osservato che questo animale presentava le caratteristiche per essere un ottimo modello per lo studio dei processi molecolari che si osservano durante lo sviluppo e l'invecchiamento degli organismi (Hengartner 1997). L'interesse che questo modello animale desta per quanto riguarda lo studio dell'apoptosi risiede nel fatto che durante lo sviluppo dalla forma larvale a quella adulta il nematode perde 131 cellule somatiche e questo processo è stato osservato avvenire per apoptosi (Ellis e Horvitz 1986). Da questi studi è stato evidenziato che nel *C. elegans* gli enzimi chiave che vengono attivati durante la morte cellulare appartengono ad



Figura 1 Forma adulta di *Caenorhabditis elegans*, nematode microscopico che presenta nella forma adulta ermafrodita 959 cellule somatiche e durante lo sviluppo dalla forma larvale perde per apoptosi 131 cellule. Questo a fatto si che diventasse un modello ideale per lo studio dei processi apoptotici e di sviluppo.

una particolare famiglia di proteasi. Questi enzimi presentano importanti analogie con un'altra famiglia di proteasi osservata nei mammiferi, sia per quanto riguarda la struttura, sia per quanto riguarda i meccanismi molecolari responsabili dell'attivazione. La famiglia di proteasi, definite CED (*C. elegans Death*), raggruppa una serie di enzimi che clivano in maniera aspecifica le proteine a livello di un residuo di aspartato. La loro espressione aumenta soprattutto durante la morte programmata delle cellule che normalmente accompagna il *turn over* tessutale nel processo di

sviluppo. Se infatti viene a mancare o è diminuita a causa di una mutazione l'attività dell'enzima CED-3, la morte delle 131 cellule somatiche, che generalmente si osserva, non avviene (Ellis e Horvitz 1986).

La distruzione cellulare selettiva in alcuni tessuti è un meccanismo chiave per lo sviluppo di molti organismi pluricellulari. Tra gli insetti, ad esempio, è un processo essenziale per il passaggio dalla vita larvale a quella di organismo adulto. Tra gli *invertebrata* gli studi riguardo la metamorfosi del moscerino della frutta, *Drosophila melanogaster*, sono serviti come base per intuire ed approfondire lo studio della morte cellulare programmata e questo in ragione di una similitudine tra quanto osservato in questa specie con quanto avviene nei mammiferi (Cashio *et al.* 2005). Infatti, i fenomeni di apoptosi in questo insetto sono fondamentali per lo sviluppo della forma adulta ed è stato dimostrato che la presenza dell'ormone steroideo ecdisone, molecola chiave per la metamorfosi larvale e la muta negli artropodi, induce una massiva trascrizione di una proteasi, il *Drice* che appartiene alla famiglia delle cisteina-proteasi attive sui residui di aspartato ed è in grado di promuovere l'apoptosi delle cellule nei tessuti larvali durante la metamorfosi (Kilpatrick *et al.* 2005).

IL PROCESSO DELL' APOPTOSI

L'apoptosi come molti processi che avvengono nella cellula, prevede la trascrizione di particolari pacchetti genici che portano alla sintesi di alcune proteine che a loro volta sono coinvolte in una serie di eventi molecolari intracitoplasmatici che fanno assumere alla cellula quelle caratteristiche morfologiche osservate nell'apoptosi.

Indipendentemente dalla stimolazione che la induce, l'apoptosi può essere convenzionalmente suddivisa in due distinte fasi consecutive dal punto di vista temporale. Nella prima la cellula, dopo adeguata stimolazione, va ad attivare quella serie di eventi intracellulari che portano alla seconda fase o fase di esecuzione in cui sono attivate un numero

relativamente limitato di proteine effettrici, tra cui le principali sono delle proteasi note con il nome di caspasi (Lieberthal & Levine 1996). L'esito finale è la comparsa di anomalie morfologiche osservabili a livello di citoplasma e di nucleo indipendenti dalla natura dello stimolo iniziale che le induce oltre che dalla via molecolare che le provoca.

Nei mammiferi un ampio numero di stimoli possono indurre apoptosi e tra questi alcuni sono rappresentati da molecole o specifici legandi che sono rilasciati dalle cellule circostanti e per i quali esistono, sulla membrana citoplasmatica, recettori pro-apoptotici specifici. Altri tipi di stimoli sono rappresentati da danni a strutture interne alla cellula. Tra questi si possono ricordare ad esempio i danni dovuti ad agenti tossici o chimici che interagiscono con il DNA alterandone struttura e la replicazione, la deplezione di fattori di crescita o ancora lo stress ossidativo che si osserva durante il blocco della respirazione cellulare; tutti questi sono in grado di portare a morte al cellula attraverso una via che vede coinvolti alcuni organelli intracellulari tra cui i mitocondri (Jin & El-Deiry 2005).

Fino ad ora sono stati identificati tre meccanismi principali attraverso cui le caspasi vengono attivate e, nonostante siano stati ampiamente studiati, i diversi eventi cellulari che li caratterizzano non sono stati ancora del tutto chiariti. La natura dello stimolo che funge da segnale di morte e la via di trasmissione del segnale all'interno della cellula sembrano determinare le maggiori differenze osservate in questi meccanismi. Effetto finale e comune di queste vie molecolari è l'alterazione dell'equilibrio esistente tra segnali pro-apoptotici e anti-apoptotici in favore dei primi portando in tal modo la cellula verso uno stadio di pre-morte che solamente negli stadi iniziali risulta reversibile.

L'aspetto morfologico che accompagna la morte delle cellule durante l'apoptosi è caratterizzato da anomalie e modificazioni che coinvolgono il nucleo e il citoplasma. La cellula infatti tende ad assumere una forma

sferica dovuta alla retrazione degli pseudopodi, il nucleo diventa picnotico con condensazione della cromatina e carioressi. Con l'impiego della microscopia ottica non si osservano rilevanti alterazioni a carico degli organelli citoplasmatici. La membrana cellulare, a differenza di quanto avviene durante la necrosi, mantiene la sua integrità fino agli ultimi stadi (Kroemer *et al.* 2005). Nel citoplasma si osservano delle strutture rotondeggianti definite corpi apoptotici che sono porzioni di citoplasma contenenti organelli cellulari integri o porzioni di nucleo circondati dal doppio strato lipidico della membrana (O'Brien & Kirby 2008). La genesi dei corpi apoptotici sembra dovuto a un processo di condensazione della cellula e il destino di queste strutture è quello di essere rilasciate per gemmazione nell'ambiente extracellulare e di essere fagocitate da cellule macrofagiche o da cellule residenti del tessuto come cellule epiteliali o fibroblasti (Lieberthal & Levine 1996).

CASPASI

Le caspasi rappresentano i principali enzimi responsabili dell'apoptosi. Esse hanno sia la funzione di induttori, in quanto iniziano e promuovono i processi di morte cellulare, sia quella di molecole esecutrici che, agendo su specifiche proteine target, causano la comparsa delle tipiche anomalie nella morfologia cellulare (Jin & El-Deiry 2005).

Le caspasi appartengono alla famiglia delle cisteina-proteasi ed hanno la caratteristica di clivare la sequenza amminoacidica delle proteina dopo un residuo di aspartato (Alnemri *et al.* 1996, Kumar 2007, Chowdhury *et al.* 2008). Il loro nome deriva da questa loro peculiarità, infatti dall'inglese caspases è l'acronimo per Cysteiny ASPartate proteinASES (Kumar 2007).

La prima proteasi pro-apoptotica venne clonata nel 1993 e fu la CED-3 ottenuta dal genoma del nematode *C elegans*. Fin da subito si osservò che presentava omologie strutturali con un'altra molecola che era stata descritta precedentemente nei mammiferi, l'*Interleukin-1 β Converting Enzyme*

(ICE), ora classificata come appartenente alla famiglia delle caspasi e nota come caspasi-1. La mancanza di questa proteina durante lo sviluppo intrauterino di topi *knockout* era associata ad anomalie letali nello sviluppo del sistema nervoso centrale, caratterizzate da iperplasia e da una anomala organizzazione e distribuzione delle cellule a livello cerebrale; questo avveniva come conseguenza di una eccessiva densità cellulare (Kuida 1996).

Attualmente tra i mammiferi sono note 14 proteasi appartenenti alla famiglia delle caspasi, 11 delle quali espresse anche nell'uomo (Earnshaw *et al.* 1999). In base alla funzione che svolgono durante l'apoptosi, ma non solo, sono state divise in tre sottogruppi. Le caspasi infiammatorie, che raggruppano la caspasi-1, -4, -5, -11, -12, -13 e -14 svolgono funzione di modulatori durante il processo infiammatorio oltre che di fattori che promuovono la maturazione delle citochine piuttosto che come mediatori del processo apoptotici (Launay *et al.* 2005). Le caspasi attivatrici o iniziatrici sono rappresentate dalle caspasi-2, -8, -9 e -10 ed hanno come funzione principale quella di modulare e di fungere da mediatori che trasmettono lo stimolo pro-apoptotico alle caspasi effettrici, le caspasi-3, -6 e -7 che hanno il ruolo di portare la cellula a morte per azione specifica su proteine strutturali e indispensabili per la sopravvivenza della cellula (Chowdhury *et al.* 2008).

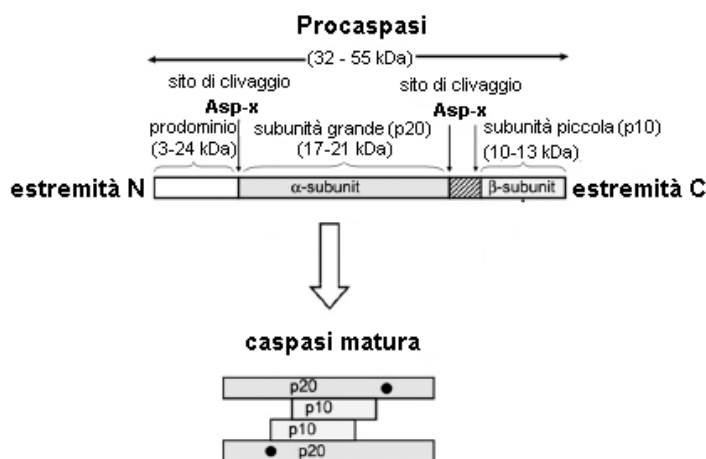


Figura 2 Schema della struttura delle caspasi nei mammiferi (modificato da Chowdhury et al. 2008)

al 2008)

La struttura primaria delle caspasi presenta delle analogie tra i vari membri della famiglia sia all'interno dei mammiferi che tra le proteasi caspasi simili clonate negli invertebrati (Kumar 2007). Una delle loro caratteristiche strutturali comuni è la presenza di un prodominio, di lunghezza variabile a cui fanno seguito due porzioni o subunità definite p20 (subunità grande) e p10 (subunità piccola) (Jin & El-Deiry 2005). Il prodominio posto a livello della porzione N-terminale presenta una dimensione variabile da 3 a 24 kDa e in base a questa peculiarità le caspasi sono divise in caspasi a prodominio lungo oppure a prodominio breve. Nei prodomini lunghi, presenti soprattutto nelle caspasi che hanno funzione di iniziare e modulare il segnale apoptotico, è presente una porzione variabile formata da 80-100 residui amminoacidici che è chiamato dominio di morte o *Death Domine* (DD) coinvolto nella trasduzione del segnale apoptotico (Nuñez *et al.* 1998). Sul DD possono essere espressi due possibili sottodomini, il *Death Effector Domain* (DED) o il *CAspase Recruitment Domain* (CARD), che interagiscono rispettivamente con il dominio di morte presente sui recettori sulla membrana citoplasmatica per l'apoptosi oppure formano un complesso con i segnali apoptotici che prendono origine dagli organelli citoplasmatici (Nuñez *et al.* 1998; Chowdhury *et al.* 2008). Le caspasi effettrici invece presentano prodomini piuttosto brevi formati da circa 20-30 residui amminoacidici e sono attivate dalle caspasi iniziatrici (Earnshaw *et al.* 1998).

La lunghezza del prodominio sembra anche influenzare la capacità di autocatalisi che si osserva nelle caspasi iniziatrici, rispetto alle caspasi effettrici che per essere attivate richiedono un clivaggio da parte di altre caspasi già enzimaticamente funzionanti (Fuentes-Prior & Salvesen 2004).

Data la loro attività le caspasi sono stoccate nella cellula sotto forma di zimogeni inattivi e nonostante sia stata descritta una minima attività catalitica sono mantenute quiescenti da diversi meccanismi (Kumar 2007).

Tra prodominio e subunità piccola e tra questa e la subunità grande sono presenti dei residui di Asp che vengono clivati per consentire l'attivazione degli enzimi (Chowdhury *et al.* 2008). Dopo la proteolisi delle subunità, che procede secondo una precisa sequenza che procede dalla porzione C terminale, le subunità si uniscono e si viene a formare un eterodimero che si lega ad un altro portando alla formazione di un complesso tetramerico formato da due caspasi e che rappresenta la forma biologicamente attiva (Earnshaw *et al.* 1998, Nuñez *et al.* 1998).

ATTIVAZIONE DELLE CASPASI

L'attivazione delle caspasi iniziatrici avviene attraverso diverse vie di segnale, alcune delle quali ben caratterizzate che vedono coinvolte diverse cascate enzimatiche in cui sono impegnate differenti molecole che fungono da secondi messaggeri. L'evento finale sfocia in una unica via comune che è l'attivazione delle caspasi dette effettrici, in particolare la caspasi-3 e -7 che iniziano quella serie di eventi che inducono le modificazioni caratteristiche di uno stato di apoptosi.

VIA RECETTORIALE

La via estrinseca di attivazione delle caspasi iniziatrici è così chiamata perché il segnale apoptotico attivatore è esterno alla cellula ed è rappresentato da una molecola che va a interagire con un particolare tipo di recettore transmembranario appartenente alla superfamiglia dei *Tumor Necrosis Factor Receptor*, detto *Death Receptor* (DR) che a sua volta si lega con la caspasi iniziatrice tramite un omologo dominio di morte posto sulla porzione citoplasmatica. Tra i due domini di morte si interpone una molecola adattatrice che modula indirettamente la risposta della caspasi e che a questa si lega dopo che il recettore e la caspasi si separano.

Nello specifico sono presenti tre principali DR, che sono il recettore per il *Tumor Necrosis Factor* TNFR1, il recettore CD95 detto Fas e il *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand receptor* o recettore per il TRAIL di

cui ne esistono due varianti il DR4 e il DR5 (Earnshaw *et al.* 1998). L'evento comune che caratterizza il legame tra il DR e lo specifico ligando è un cambiamento conformazionale che consente ad una molecola adattatrice il FADD (Fas-Associated Dead Domain) di legarsi al dominio di morte presente sulla porzione citoplasmatica del recettore e formare un complesso detto *Death-Inducing Signaling Complex* (DISC), che recluta le caspasi iniziatrici (Nuñez *et al.* 1998). Rispetto al Fas e al TRAIL-R, il TNFR1 presenta un evento intermedio tra legame e formazione del DISC, infatti il recettore lega una prima molecola adattatrice il *TNF Receptor-Associated Death Domain* (TRADD) che a sua volta, tramite un altro DD va ad unirsi al FADD e forma il DISC (Movassagh & Foo 2008, O'Brien & Kirby 2008). La caspasi iniziatrice coinvolta nella via recettoriale è la caspasi-8 che si lega, nella sua forma inattiva al DISC tramite il DED e questo evento ne provoca l'autocatalisi e l'attivazione (Earnshaw *et al.* 1998). La caspasi-10 sembra anch'essa in grado di interagire con il FADD grazie ad un prodominio affine per struttura alla caspasi-8 e sembra abbia un ruolo parallelo insieme alla caspasi-8 nella apoptosi mediata in particolare dal recettore Fas (Launay *et al.* 2005, Kumar 2007).

VIA MITOCONDRIALE

La via mitocondriale, detta anche intrinseca, viene attivata da stimoli che alterano l'assetto energetico e metabolico della cellula. Tra i vari stimoli che possono attivare le caspasi attraverso questa via ci sono fenomeni di ischemia o diminuzione della respirazione cellulare per assenza di fattori di crescita od ormoni oppure insulti che danneggiano direttamente o indirettamente il DNA come l'esposizione della cellula a radiazioni o il contatto con agenti chimici o tossici come alcuni chemioterapici o i glucocorticoidi (O'Brien & Kirby 2008). Qualunque sia la causa, l'evento che si osserva è la comparsa di uno stress ossidativo che altera le normali funzioni cellulari. L'organello cellulare maggiormente

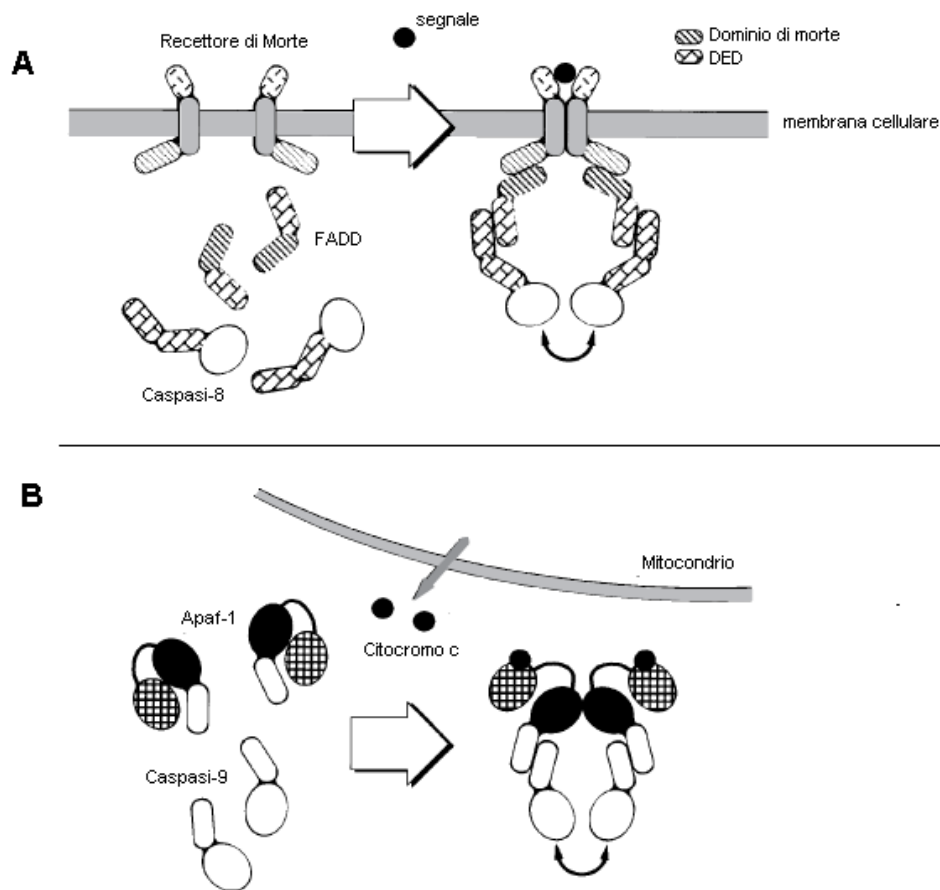


Figura 3 Rappresentazione schematica della via estrinseca (A) e della via intrinseca (B) di attivazione delle caspasi regolatrici (modificato da Nuñez et al 1998)

colpito da questi stimoli è il mitocondrio che se danneggiato rilascia nel citoplasma sostanze che danno inizio all'apoptosi.

Il mitocondrio è separato dal citoplasma dalla membrana mitocondriale esterna che funge da barriera al cui interno si rinviene un'altra membrana che ha sulla superficie una serie di proteine che servono per la fosforilazione ossidativa che porta alla formazione di ATP. Per funzionare correttamente questo processo ha bisogno che tra il comparto intermembranario del mitocondrio e il citoplasma sia presente un gradiente elettrico e ionico che viene mantenuto tramite una serie di pompe ioniche disposte sulla superficie della membrana mitocondriale esterna (Muravchick & Levy 2006).

Uno dei primi eventi che si osservano nelle fasi iniziali dell'attivazione della via intrinseca è l'aumento della permeabilità della

membrana mitocondriale esterna causata da alcune proteine pro-apoptotiche appartenenti alla famiglia Bcl-2 che porta alla perdita del gradiente tra mitocondrio e citoplasma e la fuoriuscita di composti che promuovono l'attivazione delle caspasi (Jin & El-Deiry 2005). Diverse teorie cercano di spiegare il meccanismo attraverso cui queste proteine inducono un aumento della permeabilità del mitocondrio. Una di queste ipotizza una loro azione diretta o indiretta nel formare dei canali sulla membrana mitocondriale esterna oppure una loro interazione con canali anionici responsabili di mantenere il gradiente ionico (O'Brien & Kirby 2008).

Le molecole che per prime passano dallo spazio intermembranario del mitocondrio al citoplasma sono i citocromi c (Cyt c), elementi coinvolti nei processi di ossido riduzione. Giunti nell'ambiente citoplasmatico i Cyt c si legano ad una molecola detta Apaf-1 (Apoptotic peptidase activating factor-1) che è omologa per funzione alla molecola adattatrice FADD che si lega al DR nella via estrinseca. L'unione di queste due molecole porta alla formazione di un complesso detto apoptosoma che recluta la pro-caspasi-9 attivandola (Kumar 2007).

VIA DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO

Oltre ai due meccanismi appena citati un'altra via è stata segnalata nell'attivazione delle caspasi effettrici e vede coinvolto il reticolo endoplasmatico. La caspasi che inizia il processo è la -12 e viene attivata dopo che la molecola TRAF2, legata alla procaspasi si dissocia da questa in seguito a un evento che porta a stress il reticolo endoplasmatico (O'Brien & Kirby 2008). Attivata la caspasi-12 questa è in grado di clivare la caspasi-9 in modo indipendentemente dalla presenza o meno di un danno al mitocondrio.

MOLECOLE TARGHET DELLE CASPASI

Le modificazioni cellulari che si osservano durante l'apoptosi sono in

larga parte dovute all'azione proteolitica delle caspasi effettrici che hanno come substrato sia proteine strutturali sia proteine normalmente coinvolte nei processi di omeostasi cellulare. Oltre a queste proteine *targets* le caspasi agiscono su protidi che hanno il compito di modulare e regolano l'apoptosi stessa e per lo più hanno azione inibente verso i fattori anti-apoptotici mentre promuovono l'attivazione di molecole pro-apoptiche.

Si possono riconoscere diverse categorie di proteine che vanno incontro a proteolisi durante apoptosi. Ricordiamo le proteine del citoscheletro come l'actina o quelle che vanno a costituire i microfilamenti, come la gelsolina e la fodrona che clivate causano nella cellula la perdita della sua struttura e la dissociazione tra il citoscheletro e la membrana facendo sì che la cellula assuma quel particolare aspetto che è definito in inglese di *blebbing* (Martin *et al.* 1995, Blank & Shiloh 2007). Oltre a queste anche gli elementi strutturali che formano i sistemi giunzionali intercellulari sono coinvolte nella proteolisi. Sono stati identificati come substrato delle caspasi molecole quali la β -catenina, la γ -catenina e la placoglobina (Jin & El-Deiry 2005). Queste proteine hanno la funzione di mantenere la cellula adesa alle vicine, e la loro distruzione induce una perdita di contatto tra le cellule apoptotiche e le contigue contribuendo ulteriormente a spostare l'equilibrio cellulare verso l'apoptosi poiché il contatto tra cellule è ritenuto uno stimolo pro-vitale.

A livello nucleare durante l'apoptosi, la condensazione della cromatina e la frammentazione del DNA sono eventi caratteristici dovuti all'azione delle caspasi verso proteine strutturali e enzimi che si rinvengono a livello di nucleo. La laminina A e B sono due molecole che sono coinvolte nel mantenimento della struttura e nell'organizzazione della cromatina a livello di nucleo (Saraste & Pulkki 2000). Altro target è rappresentato dalla proteina *Nuclear Mitotic Apparatus* (NuMA) che ha la funzione di ancorare la cromatina alla struttura che mantiene la forma del nucleo (Earnshaw *et al.* 1999). La frammentazione della cromatina avviene

per attivazione di DNAasi sia citoplasmatiche sia presenti nel nucleo. Il DFF45 (*DNA Fragmentation Factor*) viene scisso dalla caspasi a livello del citoplasma e da lì il DFF40, la forma attivata, migra a livello nucleare dove taglia il DNA in porzioni di 50 kb (Blank & Shiloh 2007).

Le caspasi sono in grado di clivare anche delle chinasi che hanno funzione anti-apoptotica le cui la Raf-1 e la MEKK-1 che sono importanti fattori pro vitali coinvolti nell'attivazione di geni che promuovono la replicazione cellulare (Earnshaw *et al.* 1999, Blank & Shiloh 2007)

REGOLAZIONE DELL'ATTIVAZIONE DELLE CASPASI

Essendo enzimi chiave nel processo dell'apoptosi ed essendo questo un processo che ha un esito letale per la cellula, le caspasi sono soggette a un delicato meccanismo di regolazione che ne previene l'attivazione in contesti che non si associano ad un reale danno per l'organismo. Dato l'innumerabile numero di stimoli pro-apoptotici con cui la cellula può venire in contatto, talvolta limitati nel tempo ma comunque in grado di attivare la cascata enzimatica delle caspasi, è presente un delicato meccanismo di inibizione che agisce su differenti livelli ed è atto a sopprimere il processo di morte cellulare.

Nei mammiferi la regolazione trascrizionale e post trascrizionale dei geni che codificano per la sintesi delle procaspasi sembra avvenga in maniera differente a seconda del tipo di cellula in cui si osserva (Chowdhury *et al.* 2008). Uno dei fattori che sembra coinvolto nel blocco della sintesi dell'mRNA che codifica per le procaspasi sembra essere l'interferone γ . È stato infatti osservato che l'assenza di due fattori che promuovono la sintesi di questo composto pare associata ad una ridotta concentrazione di mRNA codificante per la procaspasi -1, -2 e -3 (Earnshaw *et al.* 1999).

Accanto alla regolazione della sintesi delle caspasi esiste un'altra serie di meccanismi modulatori che agiscono andando a inibire non la sintesi ma

l'attivazione delle caspasi sia iniziatrici che effettrici. Tra i vari regolatori delle caspasi un ruolo principale viene riconosciuto all'IAP, al FLIP alla calpaina, alla NF-kB e al Bcl-2 e Bcl-X_L questi ultimi appartenenti alla famiglia delle proteine Bcl-2.

Le proteine raggruppate nella famiglia degli inibitori dell'apoptosi o IAP (Inhibitor of Apoptosis) hanno la funzione di inibire le caspasi effettrici e sono attivi sia nell'inibire la via intrinseca che quella estrinseca. Inoltre si è visto che prevengono il rilascio dei citocromi c e sono in grado di legarsi alla procaspasi-9 stabilizzandola e impedendone così l'attivazione (Jin & El-Deiry 2005). Il c-FLIP è invece un analogo strutturale delle caspasi che si lega con diversi DR impedendo il legame con la caspasi-8 che non viene in tal modo attivata. Questa proteina regolatrice non sembra modulare l'attivazione delle caspasi attraverso la via intrinseca, dato che la sua presenza non è in grado di inibire l'apoptosi dopo irradiazione (Earnshaw *et al.* 1999). Il NF-kB è un fattore di trascrizione, che promuove l'espressione di geni antiapoptotici, presente libero nel citoplasma e qui inattivo perché legato all'IkB (*Inhibitor of NFkB*). Dopo fosforilazione del IkB ad opera di chinasi il NF-kB viene attivato e trasla nel nucleo (O'Brien & Kirby 2008).

APOPTOSI E TRAPIANTO DI RENE

Per ischemia si intende una condizione caratterizzata da un inappropriato o assente apporto di sangue a un tessuto o ad un organo, che diminuisce l'apporto di nutrienti e ossigeno alle cellule alterandone il metabolismo e la produzione di ATP. Oltre a questo, l'insufficiente flusso ematico ha ripercussioni anche sull'eliminazione dei cataboliti prodotti dal normale metabolismo cellulare che tendono ad accumularsi inizialmente nell'interstizio extracellulare ed in seguito all'interno della cellula stessa. Inizialmente un evento ischemico induce una serie di cambiamenti adattativi che consentono alla cellula, seppur in modo limitato nel tempo, di

sopravvivere e circoscrivere le anomalie che si instaurano (Kosieradzki & Rowiński 2008).

L'ischemia costituisce il meccanismo patogenetico responsabile di diverse condizioni cliniche come ad esempio quelle associate a infarti, shock ed ipovolemia ed inoltre è un evento inevitabile durante le chirurgie di trapianto d'organo (Collard & Gelman 2001). Spesso le prime procedure che vengono attuate in queste condizioni sono volte a ristabilire il flusso sanguigno e limitare i danni agli organi colpiti piuttosto che trattare la patologia sottostante.

A livello cellulare la cessazione dell'apporto sanguigno provoca modificazioni che portano la cellula alla necrosi o all'apoptosi in base alla velocità e a quanto severa è la diminuzione della quantità di ATP (Eguchi *et al* 1997). Infatti la necrosi è un processo che compare quando la quantità di ATP è completamente assente e porta al completo collasso dell'omeostasi della cellula, mentre l'apoptosi è un processo che richiede ATP per generarsi e compare più frequentemente quando la deplezione di ATP è parziale (Lieberthal & Levine 1998). Oltre al danno diretto alla cellula, l'apoptosi è stata messa in relazione alla comparsa di fenomeni infiammatori che vanno ad aggravare il danno all'organo. In un modello murino di ischemia renale, Daemen *et al.* hanno dimostrato che la somministrazione di un inibitore delle caspasi previene la reazione infiammatoria dovuta al blocco dell'apporto ematico dei vasi renali per 45 minuti.

Durante il trapianto di rene la fase di espianto provoca una ischemia completa e globale di tutto l'organo portando così ad una ischemia severa ed è stato osservato come, anche brevi periodi di ipossia possono provocare danni gravi e ritardare la ripresa della funzionalità dell'organo sia a breve che a lungo termine. Non stupisce così come sempre più attenzione viene posta nei riguardi del metodo per prevenire questi fenomeni come l'impiego di diversi metodi di conservazione dell'organo durante la fase di

ischemia (Kosieradzki & Rowiński 2008). Inoltre è stato visto che la porzione di nefrone più sensibile ad un danno ischemico è rappresentata dalla componente tubulare che sembra più sensibile anche dopo brevi periodi di ischemia come dimostrato in ratti soggetti a 5, 30 o 45 minuti di completa ischemia renale, in cui la presenza di *marker* apoptotici era presente anche dopo solo 5 minuti di legatura dei vasi renali (Schumer *et al* 1992). La ragione di questa minor resistenza sembra legata a cause metaboliche ed anatomiche e più precisamente il tubulo renale prossimale dimostra una minore capacità di produrre ATP per glicolisi rendendolo così più dipendente dalla fosforilazione ossidativa mitocondriale. Anatomicamente la corticale del rene è vascolarizzata in modo solo marginale e il sangue raggiunge questa zona con un certo ritardo durante la fase di riperfusione (Lieberthal & Nigam 1998).

PATOFISIOLOGIA DELLE LESIONI CELLULARI INDOTTE DA DANNI DA ISCHEMIA/RIPERFUSIONE

Nel rene, come in tutti i tessuti, il blocco parziale e completo dell'apporto ematico provoca un evento ischemico che porta a una rapida inibizione dei processi di respirazione cellulare ed in definitiva della capacità di sintetizzare molecole con legami ad alta energia come l'ATP (Jassen *et al* 2002). L'immediata conseguenza di questa deplezione è la cessazione dell'attività delle pompe ioniche che mantengono in equilibrio il gradiente di ioni tra l'esterno e l'interno della cellula. Si ha così un movimento secondo il proprio gradiente di sodio e calcio dall'interstizio al citoplasma e insieme questi ioni trascinano grandi quantità di acqua libera presente nell'ambiente extracellulare portando alla formazione di edema cellulare. Inoltre il blocco della respirazione porta ad un accumulo di prodotti intermedi della glicolisi e della fosforilazione ossidativa che aumentano l'omolarità cellulare, aggravando così l'edema (Kosieradzki & Rowiński 2008). Il risultato finale è un aumento di volume del citoplasma e

questo tende a gonfiare la cellula ed a provocare l'apertura di particolari canali attivati dallo stiramento della membrana nel tentativo di promuovere la fuoriuscita dei composti osmoticamente attivi così da diminuire l'edema. Allo stesso tempo questo meccanismo aggrava la perdita del gradiente ionico cellulare non più mantenuto dalla pompa Na^+/K^+ per assenza di ATP (Kosieradzki & Rowiński 2008).

Parallelamente alla distruzione della membrana citoplasmatica anche altre strutture cellulari come il reticolo endoplasmatico, l'apparato del Golgi, i mitocondri o il citoscheletro, vengono danneggiate e distrutte. Il mitocondrio in particolare durante ischemia tende a perdere il gradiente ionico tra matrice e spazio intermembranario e questo evento è di primaria importanza nell'alterare la catena respiratoria. Infatti, uno dei primi segni della morte cellulare è la perdita del potenziale transmembranario mitocondriale e questo provoca una disorganizzazione del metabolismo dell'organello e l'apertura di pori sulla stessa membrana mitocondriale interna chiamati pori di transizione della permeabilità che causano una immediata perdita del potenziale membranario per passaggio di acqua e ioni nella matrice, provocando così un rigonfiamento dell'organello oltre che la fuoriuscita di composti antiossidanti come l'enzima glutatione perossidasi (Honda *et al* 2005). Si è stimato che quando il volume del mitocondrio è tale da far scomparire le creste della membrana interna il danno risulta irreversibile (Kosieradzki & Rowiński 2008). Inoltre, la formazione di pori sulla membrana mitocondriale esterna rilascia nel citoplasma composti normalmente presenti nella matrice mitocondriale come i Cyt c oppure prodotti intermedi del ciclo della respirazione (Muravchick & Levy 2006). I Cyt c in particolare sono dei fattori importanti per l'attivazione delle caspasi attraverso la via intrinseca.

Se il fenomeno ischemico è limitato nel tempo oppure solo parziale e il normale apporto sanguigno viene ristabilito, la cellula, a seconda del danno subito, può sopravvivere o andare in contro a morte. La causa è

legata al fatto che durante l'evento ischemico si ha un accumulo di ipoxantine, che derivano dalla degradazione dell'ATP che in condizioni normali vengono ossidate a xantine dalla xantina deidrogenasi ma questo enzima durante ischemia si converte a ossidasi che in assenza di ossigeno non riesce a catalizzare nessuna reazione; la conseguenza di ciò è un accumulo di ipoxantine (Jassen *et al* 2002).

Una volta introdotto nuovamente l'ossigeno nella cellula si ha la formazione di prodotti altamente ossidanti ad opera della xantina ossidasi che reagisce con l'ossigeno e l'ipoxantina accumulatasi. Un'altra reazione che avviene durante la riperfusione è quella tra l'ossigeno e gli elettroni accumulati dopo cessazione della catena respiratoria. Il prodotto finale porta alla formazione di composti altamente reattivi come lo ione superossido (O_2^-), lo ione idrossilico (OH^-) e il perossido di idrogeno (H_2O_2) (Jassen *et al* 2002). Questi composti tendono a promuovere l'ossidazione dei lipidi di membrana cellulare aggravandone il danno e quando vengono rilasciati nell'interstizio attraverso i pori formati sulla membrana citoplasmatica fungono da fattori chemotattici che richiamano i leucociti (Collard & Gelman 2001).

CAPITOLO 2: RECETTORI DEGLI OPPIOIDI

Nel 1806 il chimico tedesco Friedrich Sertüner isolò uno dei principi attivi presenti nell'oppio, il prodotto ricavato per essiccazione all'aria della resina ottenuta per incisione delle capsule immature del *Papaver somniferum*. Questa nuova molecola quando assunta nell'organismo, induceva uno stato soporifero e così, rifacendosi al nome del dio greco del sonno, Morpheus, Sertüner chiamò questa nuova molecola morfina (Dhrawan *et al.* 1996). Negli anni successivi da questo precursore furono sintetizzati una serie di nuovi composti dotati di proprietà simili e definiti genericamente oppioidi.

Bisognerà però attendere il 1942 per la sintesi del primo composto in grado di antagonizzare gli effetti farmacologici indotti da questa classe di molecole. Il nuovo farmaco fu la nalorfina, e da questa successivamente verrà sintetizzato un altro composto il naloxone. A differenza di quest'ultimo la nalorfina si dimostrò efficace nell'antagonizzare la depressione respiratoria indotta dalla morfina, continuando però a fornire un certo grado di analgesia (Brownstein 1993). Le conclusioni che se ne trassero portarono a postulare il concetto di farmaco oppioide agonista puro, antagonista e agonista antagonista.

Bisognerà attendere circa una ventina d'anni perché si iniziò a prendere in considerazione seriamente l'idea che gli effetti osservati dopo somministrazione di questi differenti farmaci fossero spiegabili attraverso il legame tra oppioidi e differenti tipi di recettori verso cui ogni particolare composto presentava una specifica affinità. Partirono così i primi studi che impiegarono diversi agonisti marcati con isotopi radioattivi per riuscire a caratterizzare i recettori verso cui queste molecole mostravano una maggiore o minore selettività. I risultati di queste prove però non si dimostrarono concludenti e la causa principale fu da attribuirsi alla scarsa selettività recettoriale dei composti presi in esame (Dhrawan *et al.* 1996).

Per ottenere degli studi che portassero a delle evidenze concrete sull'esistenza di differenti sottotipi di recettori oppioidi bisognerà attendere

un lavoro pubblicato nel 1976 da Martin *et al.* Egli condusse nel cane un'analisi dettagliate delle proprietà neurofisiologiche e comportamentali che diversi composti oppiacei inducevano dopo somministrazione endovenosa. Insieme a prove che valutavano la soppressione o l'acuirsi della sintomatologia indotta da astinenza da morfina dopo somministrazione di differenti oppioidi giunse alla conclusione che i tre quadri sintomatologici osservati potevano essere legati alla stimolazione di altrettanti sottotipi di recettori. In base all'agonista che era in grado di dare il quadro sintomatologico specifico Martin *et al.* chiamarono questi recettori con lettere greche. In particolare nominarono recettori μ quelli che secondo loro avevano come agonista la morfina, recettori κ quelli che dimostravano maggiore affinità per la ketociclazolina e infine recettori σ quelli verso cui era selettivo un altro composto il SKF 10,047 anche chiamato N-allylnormetazocina.

In anni più recenti il sottotipo σ venne riconosciuto come non appartenente alla famiglia dei recettori oppioidi e che le proprietà cliniche osservate dopo l'attivazione di questo sottotipo di OR potessero essere meglio spiegate se associate a una loro interazione con composti appartenenti alla famiglia delle fenciclidine (Thurmon JC *et al.* 1996).

Sempre nella metà degli anni settanta Huges *et al.* identificarono, isolarono e sequenziarono dall'encefalo tramite spettrofotometria di massa due pentapeptidi a cui diedero il nome di encefaline e che oggi sappiamo essere dei neuropeptidi che rappresentano i legandi endogeni dei recettori oppiacei. Queste molecole che differivano per un unico amminoacido terminale, la metionina (Met-encefalina) o la leucina (Leu-encefalina) si erano dimostrate altamente selettive verso i modelli che in quel periodo erano usati per saggiare l'attività biologica dei composti oppioidi. Tra questi modelli sperimentali si era visto che in vitro gli oppioidi inducevano la contrazione della muscolatura liscia nei vasi deferenti di topo. Su questo modello vennero testati diverse molecole oppiacee e gli studi portarono alla

conclusione che un altro sottotipo di recettori doveva essere presente e verso questo erano maggiormente attive le endorfine (Lord *et al.* 1977). A questi nuovi recettori fu data come sigla la lettera δ che indicava la loro prima identificazione nei *vas Deferens* di topo. Attualmente le tre varianti dei recettori oppioidi sono denominate con diverse diciture MOR, KOR e DOR o OR3, OR2 e OR1 rispettivamente per i sottotipi μ , κ e δ .

I recettori oppioidi sono delle proteine transmembrinarie non direttamente associate a un canale ionico che condividono delle caratteristiche ultrastrutturali comuni con le altre proteine recettore che appartengono alla stessa famiglia ossia quella dei recettori associati a una proteina G. Tra queste ricordiamo il recettore per la rodopsina, che sarà il primo recettore sequenziato e fungerà da modello per lo studio della struttura tridimensionale degli OR, i recettori adrenergici, i recettori muscarinici, i recettori per la dopamina e la serotonina (Lomize *et al.* 1999), i recettori per l'angiotensina, le somatostatine e l'interleuchina 8 (Evans *et al.* 1992). In particolare in tutte queste proteine è presente un dominio trans membrana (TM) formato da sette eliche connesse da anse aminoacidiche poste sia sul versante intracellulare, indicate con iI, iII, iIII, sia localizzate sulla porzione extracellulare, queste ultime identificate come eI, eII ed eIII (Satoh & Minami 1995). L'appartenenza di questi recettori ad un'unica grande famiglia è anche dimostrata dal ripetersi di alcuni residui amminoacidi che occupano, nella struttura tridimensionale della molecola, la stessa posizione (Strahs & Weinstein 1997).

Le differenze maggiori tra le varie proteine recettore a sette eliche si osservano a livello della regione centrale detta *core*, deputata ad accogliere il legando specifico del recettore, dove sono presenti diversi amminoacidi che formano legami idrogeno specifici a seconda della conformazione della molecola legando (Lomize *et al.* 1999).

Tutti questi recettori transmembranari a sette eliche fanno parte della

superfamiglia dei recettori associati a una proteina G che funge da modulatore e secondo messaggero da cui parte una cascata enzimatica che porta all'instaurarsi di vari processi cellulari. L'importanza di queste proteine è sottolineata dal fatto che circa il 60% dei farmaci oggi utilizzati per la terapia di diverse patologie interagisce con questi recettori (Roush 1996).

STRUTTURA MOLECOLARE

I primi studi che fecero luce sulla struttura chimica dei recettori oppioidi furono condotti agli inizi degli anni novanta quando le tecniche di clonazione del cDNA permisero a diversi gruppi di ricerca di poter identificare la sequenza aminoacidica a partire dalle basi nucleotidiche che codificano per questi recettori.

Nel 1992 Evans *et al* e Kieffer *et al* clonarono il cDNA che codificava per il recettore δ a partire da culture cellulari di neuroglioma di topo. Prendendo a modello la struttura di questo tipo di OR, successivi lavori si affiancarono ai primi e portarono alla clonazione degli altri due tipi di recettori (Satoh & Minami 1995). Questi lavori giunsero al sequenziamento dei tre sottotipi di recettori nel topo e nel ratto ed in seguito si giunse ad ottenere la clonazione del cDNA che codificava per la variante umana dei MOR (Wang *et al.* 1994), KOR (Mansson *et al.* 1994) e DOR (Knapp *et al.* 1994).

Il risultato di questi studi fu la caratterizzazione dei recettori che si dimostrarono avere innumerevoli analogie nella loro rispettiva sequenza aminoacidica, pur essendo codificati da tre geni separati (Dhrawan *et al.* 1996). Infatti nel topo l'omologia dei tre OR è pari a circa il 60% e la maggior percentuale di affinità si ha a livello delle sette catene transmembranarie dove la percentuale di amminoacidi in comune raggiunge il 73-76% (Satoh & Minami 1995). Le regioni con il maggior numero di differenze coincidono con le anse extracellulari in cui la

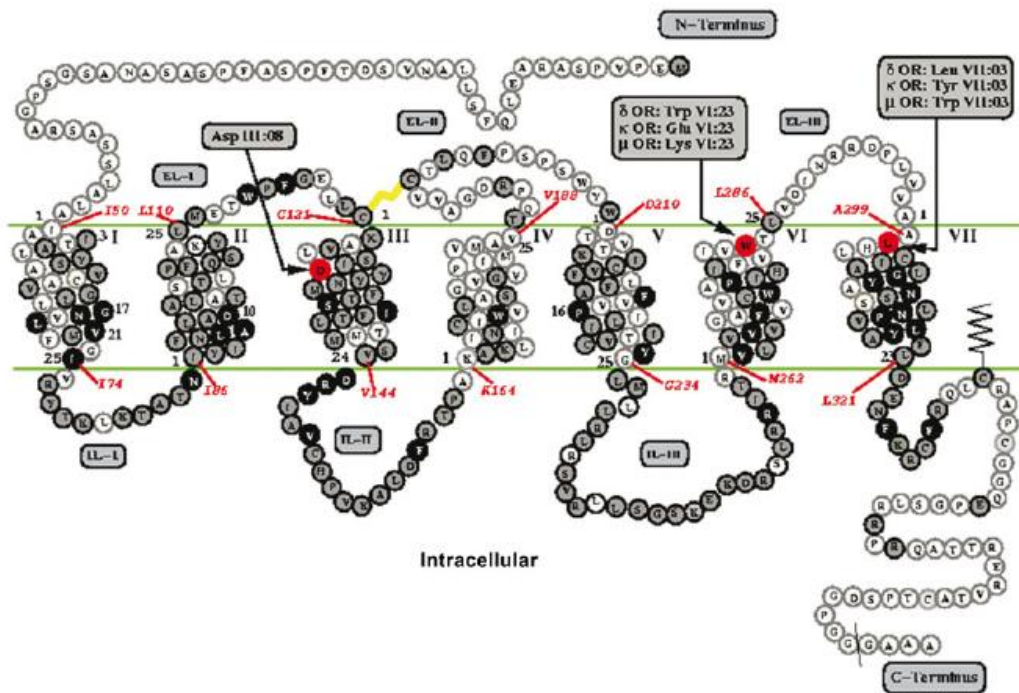


Figura 4 Struttura molecolare del recettore δ . I cerchi contengono la dicitura in lettere degli amminoacidi. Le linee verdi indicano l'inizio e la fine dei domini transmembranari. I cerchi grigi indicano gli amminoacidi conservati nei tre tipi di recettori OR, quelli neri gli amminoacidi in comune con il recettore della rodopsina associata a una proteina G (da Kane *et al.* 2006)

percentuale di amminoacidi in comune si attesta intorno al 34-40% a seconda del recettore. Questa diversità del dominio extracellulare fu successivamente confermata, tramite studi di chimerizzazione, in cui è stato anche osservato il coinvolgimento di queste aree nella selettività di legame tra i tre recettori e i loro specifici legandi (Kane *et al.* 2006).

Le analogie nella sequenza degli amminoacidi dei tre tipi di OR risulta ampiamente conservata anche per le diverse varianti presenti nei mammiferi e, a seconda della specie presa in considerazione, può talvolta superare il 93% (Strahs & Weinstein 1997). Questi recettori nelle diverse specie animali si sono ampiamente conservati attraverso la scala evolutiva e studi di sequenziamento del DNA di diversi vertebrati ne ha dimostrato la presenza sin a partire dai pesci (Dreborg *et al.* 2008).

Il numero di basi amminoacidiche che compongono la proteina recettore per gli oppioidi varia, tra uomo e roditori, da 392 e 400 per i recettori MOR. Interessante notare invece che il numero di amminoacidi che compongono i KOR e DOR sono sovrapponibili tra le specie e sono

rispettivamente 372 e 380 tra uomo e topo (Satoh & Minami 1995).

Rispetto alla membrana cellulare l'estremità C terminale della proteina si trova sul versante intracellulare e presenta un elevato grado di omologia tra i sottotipi. Nello specifico la sequenza di amminoacidi è ampiamente conservata nella prima porzione ed è sempre presente un residuo di cisteina che si ritiene ancori la coda C terminale al versante citoplasmatico della membrana cellulare contribuisca a formare una quarta ansa (Satoh & Minami 1995). L'estremità opposta N terminale è posta sul versante extracellulare della membrana e tra la prima e la seconda ansa sono altamente conservati due residui di cisteina che sembrano coinvolti nella formazione di un legame disulfido, che si pensa vincoli il numero di possibili cambiamenti conformazionali che le sette eliche possono assumere dopo che il legando ha raggiunto il *core* (Bockaert & Pin 1999).

Anche la struttura tridimensionale dei recettori è stata ampiamente studiata, partendo dal modello ben caratterizzato del recettore della rodopsina. In particolare diversi lavori si sono concentrati nella determinazione della conformazione dei sette domini transmembranari che si confermarono possedere una conformazione ad α elica. Le osservazioni condotte hanno anche permesso di stabilire che non tutte le eliche contribuiscono a formare il sito di legame e che tra loro quelle maggiormente coinvolte sono la TMIII, la TMV, la TMVI e la TMVII che nella conformazione tridimensionale creano una tasca idrofobica in cui si va a posizionare il legando (Strahs & Weinstein 1997, Kane *et al.* 2006). In prossimità di questa zona idrofobica, identificata in tutti i tre OR, sono localizzati due residui amminoacidici rappresentati da Asp in posizione TMIII:08 e His in posizione TMVI:17. Questi due residui tendono a formare dei legami rispettivamente con la porzione anionica e fenolica della molecola oppioide (figura 5). A questi due residui posti nelle porzioni prossimali delle α eliche troviamo altri residui, in particolare Trp TMV:10, Phe TMV:13 e Trp TMVI:13, i cui residui aromatici sono rivolti verso la tasca e

contribuiscono a conferirle proprietà idrofobiche (Kane *et al.* 2006).

La selettività di legame tra molecola e recettore viene conferita anche da altre regioni e le candidate più probabili sono la porzione prossimale della sesta e settima elica dove si sono trovati degli amminoacidi in posizione TMVI:23 e TMVI:03 (Befort *et al.* 1996). A seconda del tipo di recettore queste due posizioni sono occupate da Lys e Trp nei MOR, Glu e Tyr nei KOR e Trp e Leu nei DOR. Questi particolari residui sembrano conferire al recettore selettività di legame sia tramite formazione di legami molecolari con una regione specifica della molecola oppioide, sia contribuendo a produrre una sorta di esclusione sterica in cui la porzione amminoacidica che protrude verso la tasca non permette un adeguato posizionamento del legando impedendo che occupi delle aree della proteina strutturalmente complementari (Kane *et al.* 2006).

Sulla porzione extracellulare le eliche sono connesse da tre anse che presentano dei residui amminoacidici che tendono a differire in maniera marcata tra i differenti tipi di recettori. Le differenze sembrano essere importanti per conferire maggiore selettività tra il recettore e la molecola anche se le anse non sono direttamente coinvolte nella formazione della tasca in cui si colloca il legando ma sembra fungano da barriera alla sua penetrazione all'interno del *core* idrofobico (Metzger & Ferguson 1995).

La funzione delle anse extracellulari è stata studiata tramite sintesi di recettori detti “chimere”, in cui porzioni selettive di un tipo di recettore venivano sostituite in un altro, andando a valutare poi differenze nell'affinità di legame del nuovo recettore verso differenti molecole agoniste. Delle tre anse quella che maggiormente conferisce selettività di legame nei MOR sembra essere la eIII. A riprova, in uno studio di chimerizzazione μ/κ in cui le porzioni dell'eIII e delle TMVI e TMVII dei MOR era sostituita al recettore KOR, la K_i della chimera KOR verso il DAMGO, un agonista specifico dei recettori μ , era notevolmente aumentata

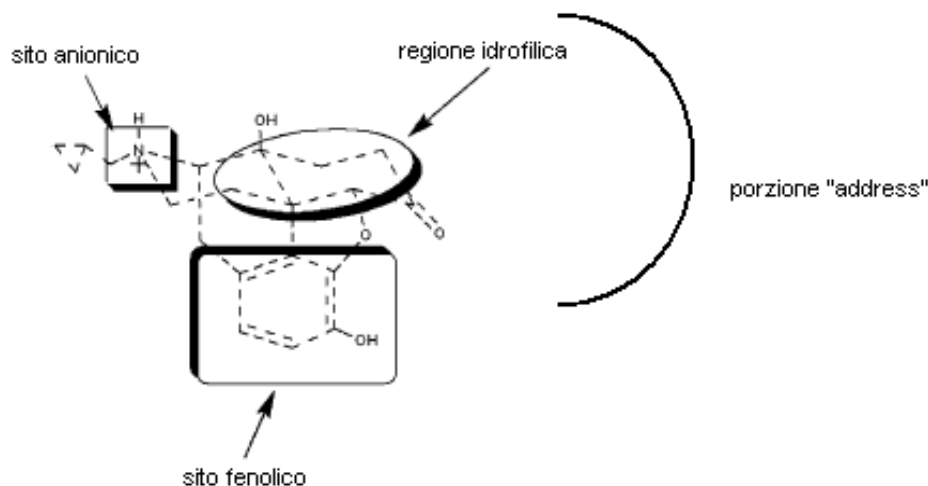


Figura 5 schema della molecola oppioide in cui sono mostrati i siti che interagiscono con il recettore (modificato da Kane et al 2006)

passando da valori maggiori di 1000 nM nel recettore originale a 11.8 nM dopo chimerizzazione (Minami *et al.* 1995). Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti anche da Zhu *et al.* in un lavoro in cui gli autori valutavano l'affinità verso il sufentanyl e il lofantanyl, dei potenti agonisti puri μ , dopo sostituzione della TMVI e TMVII ed eIII nei KOR. L'ansa coinvolta per la selettività verso un composto sembra variare a seconda del recettore che si prende in considerazione. Infatti, se si considerano i recettori κ l'ansa primariamente coinvolta sembra essere la eII, dato confermato da uno studio di chimerizzazione κ/μ in cui l'eII veniva sostituita nei MOR conferendogli maggiore affinità per la dinorfina (Wang *et al.* 1994).

Sebbene le anse extracellulari contribuiscano a conferire selettività al recettore verso differenti molecole, altri fattori entrano in gioco in questo meccanismo dell'affinità. Alcune chimere non riescono a legare l'agonista anche se la porzione extracellulare viene conservata.

Inoltre, la maggiore o minore selettività è legata anche alle dimensioni della molecola, poiché molecole di dimensioni minori tendono a legarsi in maniera meno selettiva verso i tre tipi di recettori, soprattutto se comparati a molecole dove la porzione "address", quell'area della molecola che promuove specificità al legame tra molecola e recettore, apporta ad un maggiore ingombro sterico (Kane *et al.* 2006).

Per quanto riguarda il versante intracellulare, è stato ricordato in precedenza che i domini transmembranari sono connessi attraverso tre anse denominate iI, iII e iIII. In base a studi sulla omologia di sequenza degli amminoacidi che compongono queste anse si è ipotizzato che dato l'elevato numero di residui conservati nei vari tipi di recettori, le anse iII e iIII possano essere dei possibili siti di legame tra il recettore e la proteina G a lui associata (Dohlman *et al.* 1991). Le regioni menzionate infatti presentano un elevato grado di similitudine non solo tra i tre recettori oppioidi ma anche con altri membri della superfamiglia dei recettori a cui gli OR fanno parte (Bockaert & Pin 1999). A riprova di questo a riguardo del meccanismo attraverso cui recettore attivato comunica con la proteina G, si è visto che l'ansa intracellulare iII collega l'estremità della porzione transmembrana TMIII e TMIV, mentre l'ansa iIII collega le alfa elica TMV e TMVI. Si è ipotizzato che, instauratosi il legame con l'oppioide, l'elica transmembrana TMVI cambiando la sua inclinazione attraverso un movimento traslatorio e di rotazione tenda ad allontanarsi dalla TMIII. Questo porterebbe ad un cambiamento conformazionale del sito attivo della proteina G associata promuovendone così l'attivazione (Bourne 1997). Nella coda C terminale sono presenti inoltre dei residui di serina e treonina che sembra, data la loro presenza in diverse GPCRs, fungano da siti di fosforilazione per l'inattivazione del recettore consentendo il legame di questa porzione con una molecola detta arrestina che impedisce alla proteina G di legarsi riportando il recettore in uno stato che permette l'attivazione (Reisine 1996).

PROTEINE G

Questa classe di proteine ha la funzione di far comunicare il recettore membranario attivato dopo legame e il sistema effettore responsabile della risposta cellulare all'agonista.

La superfamiglia dei recettori associati a una proteina G (GPCR)

comprende tre principali famiglie classificate in base ad omologie nella sequenza amminoacidica (Bockaert & Pin 1999). Come detto in precedenza il motivo strutturale che accomuna questi recettori è la presenza di sette domini transmembranari collegati da anse sia sul versante intra che extracellulare con la porzione C terminale posta sulla superficie citoplasmatica della membrana. Oltre alla struttura secondaria, i GPCRs si differenziano anche per la collocazione del sito in cui i legandi vanno a posizionarsi. In base a questo criterio la prima famiglia è a sua volta distinta in tre sottofamiglie; più precisamente nella famiglia A1 la molecola viene ad allocarsi all'interno delle sette eliche transmembrana e i recettori che appartengono a questo gruppo radunano, tra gli altri, i recettori per gli oppioidi o quelli per le catecolamine oltre a quelli per l'adenosina (Jensen & Spalding 2004). Alla famiglia A2 appartengono recettori che legano peptidi che si collocano tra la porzione prossimale delle TM, le anse extracellulari e l'estremità N terminale (Jensen & Spalding 2004). I legandi che agiscono sui recettori della terza sottofamiglia (A3) sono rappresentati da ormoni glicoproteici che interagiscono tra le anse poste sul versante esterno e il dominio extracellulare che risulta particolarmente lungo (Jensen & Spalding 2004). La seconda famiglia condivide delle analogie funzionali con quella A3, in particolare la posizione del sito di legame anche se risulta eterogenea per la composizione di amminoacidi. Le molecole che vanno ad agire su questi recettori sono per lo più ormoni di grandi dimensioni come il glucagone o la calcitonina (Gether 2000, Bridges & Lindsley 2008). All'ultima famiglia appartengono recettori come quelli metabotropi per il glutammato che presentano la caratteristica di possedere un lungo dominio N terminale che si dispone a formare due porzioni globulari che formano il sito di legame per la molecola (Moroni 2004).

Le proteine G sono strutturalmente degli eterotrimeri formati da tre subunità dette α , β e γ che hanno un peso molecolare variabile, rispettivamente di 39-46 kDa, 35-39 kDa e 8 kDa a seconda delle varianti.

Nel genoma umano sono codificate più varianti per ogni subunità e più nello specifico la subunità α presenta 20 varianti, la β 6 mentre la subunità γ circa una decina (Milligan *et al.* 1990). Le tre subunità si legano andando a formare un trimero, ma a tutt'oggi non si sa con esattezza quale sia il meccanismo che porta le rispettive varianti a legarsi in modo specifico le une con le altre (Vallar *et al.* 2004).

La funzione delle proteine G è quella di far comunicare il recettore attivato e il sistema effettore tramite la mediazione di un secondo messaggero. Il meccanismo tramite cui questo avviene vede coinvolte le subunità α e β/γ in cui la proteina dopo attivazione si scinde (Riccobene *et al.* 1999). Il legame dell'agonista al recettore infatti provocherebbe un cambiamento conformazionale a livello delle sette eliche transmembrinarie che si ripercuoterebbe a livello della proteina G associata. La subunità α , che nella forma inattiva ha legata una molecola di GDP, quando attivata tende ad avere una minore affinità per il GDP che viene allontanato, facendo sì che una molecola di GTP venga a collocarsi nel sito precedentemente occupato dal GDP. Questo evento a sua volta provoca una perturbazione nella struttura terziaria della molecola che si scinde in un dimero formato dalla subunità α e da un'unità formata dalle subunità β e γ che rimangono unite (Pierce *et al.* 2002).

Le subunità β e γ rimangono strettamente associate e formano un'unica entità funzionale che interagisce in maniera simile con i sistemi target indipendentemente dalle combinazioni delle diverse varianti. I sistemi effettori su cui agisce la subunità α variano a seconda delle varianti presa in esame e in base a queste le proteine G vengono definite e classificate. La prima classificazione che venne proposta si basava sulla capacità che diversi GPCRs, attraverso l'attivazione della subunità α , avevano di promuovere o inibire la sintesi di cAMP. In base a queste osservazioni si definirono le subunità α rispettivamente G_s , se la risposta era un aumento del cAMP o G_i se invece si osservava una diminuzione (Milligan *et al.*

1990). Negli anni successivi vennero scoperte numerose varianti identificate e catalogate sia in base ad omologie di sequenza sia per affinità funzionale ed a tutt'oggi vengono riconosciuti 4 gruppi. Il primo gruppo comprende le subunità G_s , mentre il secondo raggruppamento le varianti G_{i1} , G_{i2} , G_{i3} , G_z e G_0 , che sono associate a una diminuzione della quantità di cAMP e sono per lo più associate a recettori su cui agiscono neurotrasmettitori o peptidi come gli agenti oppioidi o le somatostatine (Harrison *et al.* 1998). Il terzo gruppo comprende le G_q e altre varianti che stimolano l'attività della fosfolipasi $C\beta$ che a sua volta porta all'attivazione del inositolo 3-fosfato (IP_3) che funge da secondo messaggero (Bridges & Lindsley 2008). Ai tre gruppi sopra citati se ne aggiunge un ultimo che raggruppa tra le varianti la G_{i2} e la G_{i3} , ma di cui non è ancora completamente noto il sistema effettore su cui vanno ad agire (Vallar *et al.* 2004). Oltre a questa classificazione legata ad omologie di sequenza le subunità α vengono anche classificate in base alla suscettibilità che presentano verso l'attività ADP ribosilasica che le tossine della pertosse provocano a livello di cisteine collocate a livello della porzione C terminale. Una volta che questi residui sono stati legati infatti viene impedito il legame tra trimero riformato e recettore, portando così ad una sua inattivazione nonostante la presenza del legando (Milligan *et al.* 1990).

Per quanto concerne l'attivazione del recettore associato a una proteina G sono state proposte diverse teorie. Una di queste presentata nel 1980 da De Lean *et al.* detta *modello del complesso ternario*, vede l'attivazione della proteina G attraverso il semplice legame tra agonista e recettore. Questa teoria venne successivamente ampliata dopo che nuove informazioni sulla struttura e sulla funzione delle proteine G vennero ad aggiungersi. Samama *et al.* nel 1993 proposero il *modello del complesso ternario esteso*. Secondo questa teoria la proteina G esisterebbe in una forma attiva (R^*) e una forma inattiva (R). A queste due forme corrisponderebbero due distinte conformazioni del recettore. In questo

modello di GPCR si ha una fluttuazione tra la conformazione attiva e inattiva (Jensen & Spalding 2004). In base allo stato in cui il recettore si trova, il legando viene definito agonista puro se presenta una elevata affinità per la forma R*, agonista parziale se si lega meno avidamente alla forma attiva, antagonista neutro quando si lega ad ambo le forme e agonista inverso che si lega solo alla R (Riccobene *et al.* 1999).

Dopo l'attivazione della proteina G, il segnale viene rapidamente bloccato attraverso l'idrolisi spontanea del GTP a GDP che avviene a livello di subunità α . A questo evento segue l'unione delle tre subunità in un nuovo eterotrimerico inattivo che va così nuovamente a legarsi al recettore (Pierce *et al.* 2002). Il meccanismo viene regolato sia tramite attività GTPasica intrinseca alla subunità α , sia attraverso l'interazione di molecole come le “*GTPase activating proteine*” o GAP che vengono attivate dall'aumento dell'attività dei secondi messaggeri promossa dalle stesse subunità creando così un meccanismo di *feedback* inibitorio che permette di modulare in definitiva l'attività del recettore (Vallar *et al.* 2004). Oltre a questo meccanismo sono state studiate altre molecole che hanno il compito di sopprimere l'azione delle subunità α attivate e sono rappresentate dalle proteine appartenenti alla famiglia chiamata “*Regulators of G proteine signaling*” o RGS, che hanno la funzione di accelerare l'idrolisi dell'GTP riducendo così la durata del segnale (Pierce *et al.* 2002; Xie & Palmer 2005).

Un'altra caratteristica dei recettori associati a una proteina G è la proprietà di diminuire la loro espressione o sopprimere l'attivazione della proteina G a loro associata quando sovrastimolati tramite esposizione cronica con un agonista (Pierce *et al.* 2002). Il meccanismo noto come “desensibilizzazione” vede coinvolto contemporaneamente il recettore transmembranario e la proteina G. Per alcuni composti, come ad esempio per i recettori oppiacei, questo meccanismo assume una rilevanza clinica importante.

Uno dei meccanismi comuni a tutti i GPCRs è legato alla fosforilazione di specifici residui di serina collocati nella porzione C terminale che una volta legato il fosforo acquistano una maggiore affinità per una molecola detta arrestina che va a legarsi e così ad occupare il sito che verrebbe occupato normalmente dalla subunità $G\alpha$ della proteina G (Reisine *et al.* 1996, Riccobene *et al.* 1999). Gli enzimi che tendono a fosforilare il recettore rappresentano il prodotto dell'attivazione del secondo messaggero e sono rappresentati da proteine chinasi (PK) come la proteina chinasi A e C o le GRK, quest'ultima reclutata dal dimero β/γ (Riccobene *et al.* 1999). Questo meccanismo di desensibilizzazione avviene in tempi molto brevi. Un altro meccanismo che invece serve a regolare l'espressione del recettore a lungo termine coinvolge una cascata di eventi che porta a una degradazione del recettore e ad una sua *down regulation* a livello di espressione nucleare (Pierce *et al.* 2002). Il primo evento che porta alla degradazione del recettore prevede una migrazione e un addensamento dei recettori attivati dal legando in porzioni discrete della membrana che poi vengono internalizzate per endocitosi. Uno degli elementi chiave di questo meccanismo è il legame tra recettore che ha ancora legato l'agonista e la arrestina che tramite un complesso con la clatrina porta a una internalizzazione del recettore. Dopo endocitosi e conseguente formazione di un endosoma il destino dei recettori è quello di essere degradati oppure ritornare dopo defosforilazione dei residui di serina sulla superficie della cellula (Pierce *et al.* 2002).

EVENTI MOLECOLARI DOPO ATTIVAZIONE DEI RECETTORI OPIOIDI

L'effetto che gli oppioidi inducono nella cellula dopo interazione con il recettore è dovuto all'attivazione di proteine G specifiche per questi recettori. Le subunità α che i recettori degli oppioidi sono in gradi di attivare appartengono primariamente alle famiglie 2 e 3. I domini citoplasmatici che comprendono le anse intracellulari e la porzione C

terminale del GPCR e la porzione C terminale della $G\alpha$ sono ritenute le aree principe attraverso cui si ha l'interazione tra questi due e attraverso cui si instaura il legame (Bourne 1997, Law *et al.* 1999). Per gli OR, la iIII è considerata la zona in cui con maggior probabilità viene a legarsi la subunità α , anche se nei tre sottotipi recettoriali questa porzione si è dimostrata possedere una sequenza amminoacidica minimamente conservata (Bourne 1997). Nonostante queste differenze i recettori oppioidi dimostrano una capacità di legare in modo più o meno affine e selettivo una stessa variante $G\alpha$. Infatti in uno studio condotto da Joshi *et al.* pubblicato nel 1999, sono state create delle subunità α chimerizzate, sostituendo alla G_q , potente induttore della PLC, gli ultimi 5 residui amminoacidici che compongono la sua porzione C terminale delle varianti G_{i1} , G_{i2} , G_0 e G_z . In base alla quantità di IP_3 prodotta tramite attivazione della PLC stimolata dalla G_q , dopo attivazione di ogni OR con lo specifico agonista si è osservato che la capacità di legare una particolare variante $G\alpha$ dipendeva dal sottotipo di recettore studiato. Nello specifico i KOR si sono dimostrati molto più affini per le G_i e G_z rispetto ai MOR e DOR che comunque presentavano nei loro confronti una buona affinità. Inoltre è stato osservato che tutti i sottotipi di OR tendono a presentare meno affinità per la G_0 . Poiché dopo attivazione dei recettori degli oppioidi, non si assiste a un aumento dell'attività dell'adenilato ciclastasi che anzi tende a diminuire e questo associato ad una parallela diminuzione della quantità di cAMP, ha fatto supporre che gli OR non si accoppiassero alla variante G_s , dati questi confermati da studi molecolari (Connor & Christie 1999).

Sebbene non sia stato chiarito del tutto il meccanismo che porta a legare il recettore alla specifica $G\alpha$, sembra che l'espressione e il legame a una particolare subunità α sia legata a diversi fattori. Tra questi si è visto che il tipo di tessuto o di cellula che si va a studiare è un elemento importante nella determinazione di quale variante si lega al recettore. Si è visto inoltre che il tipo di agonista a cui i recettori sono esposti è in grado

di influenzare il tipo di proteina G che si lega. Xu *et al.* infatti in un recente articolo hanno constatato che l'espressione delle proteine G veniva influenzata non solo dal sottotipo di recettore preso in esame ma anche dal tipo di agonista messo in contatto con l'OR. Questo gruppo di lavoro, dopo aver fatto esprimere in modo stabile uno delle tre varianti dei recettori oppioidi ha osservato che dopo esposizione cronica di cellule che esprimevano i MOR al HERO o al DAMGO alcune varianti di G α erano diminuite, con forte probabilità a causa di una desensibilizzazione del recettore ma che altre erano invece abbondantemente espresse.

Oltre a una attività legata a stimolazione del recettore attraverso l'agonista gli OR tendono a mostrare una attività basale spontanea a cui è associata un'attivazione indipendente dall'agonista della proteina G anche se l'esposizione all'agonista può promuoverla. Questa attività basale, che si rinviene in altri recettori associati a una proteina G, sembra abbia la funzione di mantenere un numero di recettori anche quando non vi è stimolazione (Wang *et al.* 2007).

I sistemi effettori su cui agiscono le proteine G associate ai recettori degli oppioidi sono differenti e comprendono: enzimi, canali ionici, più raramente proteine regolatrici e molecole che modulano la proliferazione cellulare .

CASCATE ENZIMATICHE

Come detto in precedenza una delle prime proprietà che sono state osservate dopo attivazione dei recettori oppiacei è stata la loro capacità di indurre una diminuzione della quantità del cAMP intracellulare (Attali *et al.* 1989; Ueda *et al.* 1991; Satoh & Minami 1995). Il meccanismo è legato ad una inibizione dell'enzima adenilato ciclasi (AC) proteina transmembranaria ubiquitaria nelle cellule di tutto l'organismo, che ha come substrato l'ATP. Il prodotto della reazione che l'AC catalizza è la produzione di cAMP che rappresenta uno dei vari secondi messaggeri che

mediano l'azione di diversi GPCRs (Riccobene *et al.* 1999, Pierce *et al.* 2002). Questa proprietà comune a tutti i recettori oppiacei, che si osserva in tutte le cellule che li esprimono è diventata un parametro ampiamente sfruttato per diversi studi che misurano l'effetto degli agonisti dei recettori per gli oppioidi.

È stato osservato che l'effetto sull'cAMP indotto dagli oppioidi veniva inibito dall'aggiunta della tossina della pertosse che interferisce con il legame tra la G_α e la porzione citoplasmatica del GPCR impedendone l'unione. È stato così ipotizzato e poi dimostrato che l'inibizione dell'adenilato ciclasi doveva avvenire tramite un'interazione con una subunità G_α che verosimilmente deve appartenere al gruppo $G_{i/o}$ (Reisine *et al.* 1996; Jordan & Devi 1998).

Dopo esposizione cronica di diversi sistemi cellulari agli oppioidi, la cellula tende paradossalmente ad indurre un aumento dell'attività dell'AC e questo evento sembra essere alla base o per lo meno contribuire a chiarire la sintomatologia da astinenza a cui si assiste in pazienti che hanno fatto abuso di questa classe di analgesici (Varga *et al.* 2003). Questo fenomeno sembra rappresentare un processo adattativo a una diminuzione della produzione di cAMP ed è mediato dall'azione delle $G_{i/o}$ piuttosto che delle G_z in quanto viene ridotto o inibito dalla presenza della tossina della pertosse (Tso & Wong 2000).

Un altro sistema enzimatico che viene attivato dai recettori associati a proteine G è quello della fosfolipasi C (PLC) presente nell'organismo in diverse isoforme (Connor & Christie 1999). Questo enzima tende a idrolizzare una particolare classe di fosolipidi di membrana, i fosfoinositoli che vengono scissi in due composti che hanno a loro volta la funzione di secondi messaggeri. Il principale substrato della PLC presente a livello encefalico e renale è il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP_2) viene scisso in Diacilglicerolo (DAG) ed inositolo 3-fosfato (IP_3). Il primo rimane a livello di membrana e attiva una proteina chinasi C (PKC) mentre l' IP_3

viene rilasciato nel citoplasma e promuove il rilascio di calcio dai depositi citoplasmatici rappresentati principalmente dal reticolo endoplasmatico (Mosaddeghi *et al.* 1995, Samways & Henderson 2006).

L'attivazione della PLC da parte degli agonisti oppioidi sembra sia mediata dalla subunità $\beta\gamma$ *in primis* ma a questa si aggiungono isoforme delle subunità α (Milligan *et al.* 1990, Satoh & Minami 1995). Quale isoforma della PLC venga attivata sembra essere tessuto specifico e dipendere dal tipo di cellula che viene stimolata oltre che dalla concomitante presenza di diverse subunità α che formano il trimero della proteina G. È stato infatti osservato che la PLC β , che induce un movimento di calcio dal reticolo endoplasmatico verso il citoplasma presenta due siti di legame distinti per la subunità $\beta\gamma$ e la G_z che devono essere presenti entrambi perché l'azione modulatrice nei confronti dello ione calcio possa avvenire (Samways & Henderson 2006).

Un'altra determinante che influenza l'attività degli oppioidi nei confronti della PLC è il tipo di recettore che viene stimolato, infatti non tutti gli OR si sono dimostrati possedere azione modulatori verso questo enzima (Dhawan *et al.* 1996). I composti agonisti dei MOR stimolano la fosfolipasi C la cui espressione viene aumentata ma se stimolati i KOR tendono a indurre una *down regulation* sia a livello del sistema nervoso centrale che in diversi tessuti periferici tra cui le cellule renali (Ueda *et al.* 1991, Mosaddeghi *et al.* 1995, Satoh & Minami 1995).

CANALI IONICI

I tre sottotipi di recettori per gli oppioidi sono in grado di inibire a livello di sistema nervoso centrale la trasmissione neuronale e questo sembra dovuto a una inibizione sui canali ionici per il calcio (Ca^{2+}) (Pan *et al.* 2008). Questi canali, denominati *N-type* Ca^{2+} , sono posti sul versante presinaptico e hanno la funzione di aumentare la concentrazione del calcio nella porzione terminale dell'assone e favorire così il rilascio di

neurotrasmettitore (Altier & Zamponi 2008). L'effetto degli oppioidi su questi canali è inibito dal concomitante trattamento con la tossina della pertosse è ciò fa pensare che la proteina G coinvolta sia una subunità $G\alpha_{i/o}$ (Dhawan *et al.* 1996).

Oltre a quanto descritto a livello neuronale l'attivazione dei recettori per gli oppioidi è anche in grado di aumentare la concentrazione di calcio a livello intracellulare in diverse linee cellulari. Il meccanismo sembra sia legato a un rilascio dello ione dai depositi citoplasmatici, soprattutto il retico endoplasmatico, o il passaggio dello ione attraverso la membrana cellulare (Samway & Henderson 2006). Queste due vie sembra siano attivate da vari meccanismi, più precisamente la via del reticolo endoplasmatico è sensibile alla tossina della pertosse facendo supporre un coinvolgimento delle $G_{i/o}$. Nella mobilitazione dello ione sembra sia coinvolta anche la fosfolipasi C, anch'essa stimolata dall'attivazione dei recettori oppioidi che avvia la cascata dell'inositolo 3-fosfato che mobilita a livello di reticolo endoplasmatico il Ca^{2+} (Mosaddeghi *et al.* 1995). Diversamente il passaggio di ioni attraverso la membrana vede coinvolti il sottotipo di canale *L-type* Ca^{2+} , presente oltre che a livello neuronale anche a livello cardiaco dove sembra contribuisca a mediare l'incalzamento della concentrazione di Ca^{2+} necessaria per la contrazione (Altier & Zamponi 2008).

Oltre che sui canali per lo ione calcio, i recettori per gli oppioidi hanno un'azione anche su quelli del potassio, attività questa che è condivisa con altri recettori appartenenti alla famiglia delle GPCRs (Pan *et al.* 2008). L'attivazione che i farmaci analgesici oppioidi inducono su questi canali produce una corrente di potassio che secondo il gradiente elettrico e di concentrazione induce una rapida fuoriuscita di questo ione dal comparto intracellulare verso l'interstizio (Ocaña *et al.* 2004). In un tessuto eccitabile questo spostamento di cariche produce una stabilizzazione della membrana che risulta meno responsiva verso fenomeni di depolarizzazione e questo

meccanismo sembra sia alla base dell'azione antinocicettiva di diversi farmaci analgesici (Connor & Christie 1999, Pan *et al.* 2008).

Tutti i sottotipi di recettori per gli oppioidi sono in grado di modulare la migrazione del potassio (Reisine *et al.* 1996) e quest'azione si ha tramite l'interazione diretta o indiretta delle proteine G ad essi associati. Delle quattro famiglie di canali per il potassio che sono state sino ad ora identificate, una in particolare risulta quella principalmente indotta dall'attivazione degli OR la famiglia denominata *inward rectifier K⁺ channels* (K_{ir}). Nello specifico due sono i tipi di K_{ir} maggiormente coinvolti nei processi di nocicezione e precisamente: gli *inward rectifier K⁺ channel* proteina G regolati (GIRK) e i canali del K⁺ sensibili all'ATP (K_{ATP}) (Ocaña *et al.* 2004). La particolarità dei canali del secondo tipo è quella di essere stati identificati anche in sede citoplasmatica e più precisamente a livello mitocondriale dove sembra siano coinvolti nel mantenimento dell'integrità funzionale della cellula dopo un evento di ischemia e riperfusione (Shim & Kersten 2008).

La tossina della pertosse è in grado di inibire l'aumento della conduttanza del potassio attraverso la membrana neuronale dopo legame di agonisti oppiacei con il recettore (Minami & Satoh 1995), risultato questo confermato dall'analisi strutturale dei canali GIRK, che espongono sul versante citoplasmatico una porzione che consente alle subunità β e γ di legarsi (Ocaña *et al.* 2004).

REGOLAZIONE DELLA TRASCRIZIONE GENICA

Il legame di tutti i tipi di recettori per gli oppioidi è in grado di attivare delle proteine chinasi che fosforilano diverse molecole tra cui fattori di trascrizione come il CREB o l'mRNA polimerasi II (Chen *et al.* 2008). Il segnale trasmesso dall'attivazione del recettore viene mediato dall'*Epidermal Growth Factor* (EGF) una molecola che legata al suo specifico recettore (*EGF Receptor*) ne induce la fosforilazione. Questo

evento avvia una serie di cascate di fosforilazione, mediate da differenti chinasi, che convergono nell'attivazione delle MAPK o Mitogen-Activated Protein Kinases che migra a livello nucleare (Schulz *et al.* 2004). Un'altra via attraverso cui le proteine MAPK vengono attivate vede coinvolta la PKC e l'inositolo 3-fosfato chinasi (IP3K) entrambi attivati dopo legame dei recettori degli oppioidi con i rispettivi agonisti.

La famiglia delle MAPK comprende tre gruppi: le *Extracellular signal-Regulated Kinase* (ERK), le c-Jun N-terminal Kinase (JNK) e le p38 MAPK ognuna attivata dopo un fenomeno di perturbazione dell'omeostasi cellulare (Toledo-Pereyra *et al.* 2004). Il loro effetto una volta attivate traslocate a livello nucleare è quello di attivare l'espressione di diversi geni che hanno funzioni differenti tra cui quelle di indurre la sintesi di nuovi recettori o di crescita cellulare (Ma *et al.* 2001, Chen *et al.* 2008)

REGOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ DEL RECETTORE

Dopo legame degli oppioidi con il recettore ed avvenuta la cascata di segnale intracellulare, si osserva una quasi immediata cessazione del segnale che avviene per inattivazione del recettore così da renderlo non più espansivo ad una seguente stimolazione con il legando. Il meccanismo attraverso cui avviene questa desensibilizzazione è controllato dalla fosforilazione della porzione C terminale del recettore sul versante intracellulare, che procede grazie a delle chinasi attivate sia dallo stesso secondo messaggero stimolato dal recettoriale oppure da una distinta famiglia di chinasi, le GRK (*G-proteine-coupled Receptor Kinases*) che inattiva specificamente i recettori associati a una proteina G (Pierce *et al.* 2002).

I recettori degli oppioidi attivano la fosfolipasi C che a sua volta promuove l'attivazione della PKC che rappresenta un classico meccanismo di feedback negativo in cui il prodotto inibisce il segnale che lo ha generato. Le GRK invece rappresentano un meccanismo generale di

inattivazione specifica della proteina G e il recettore viene prima fosforilato e questo promuove il legame con un'altra proteina, la β arrestina che occupa il sito di legame per le subunità della proteina G impedendone l'interazione (Riccobene *et al.* 1999).

Altri meccanismi contribuiscono alla desensibilizzazione del recettore e successiva cessazione del segnale. Una famiglia di enzimi, le RGS (*Regulators of G protein Signaling*) interagiscono con la subunità α e ne accelerano l'idrolisi del GTP a GDP così da accelerare la desensibilizzazione del recettore particolarmente in presenza di una stimolazione cronica (Xie *et al.* 2005).

EFFETTO DEGLI OPIOIDI SULLA FUNZIONALITÀ RENALE

Inizialmente si considerava che l'effetto farmacologico degli oppioidi fosse unicamente dovuto all'azione che avevano verso gli OR presenti a livello del sistema nervoso centrale. Oggi diverse evidenze sperimentali indicano che la distribuzione dei recettori degli oppioidi non è relegata unicamente al sistema nervoso ma che altri tessuti periferici sono in grado di esprimere questi recettori. Wittert *et al.* grazie a tecniche di clonazione e sequenzializzazione degli acidi nucleici hanno dimostrato che i tre sottotipi di recettori per gli oppioidi nel ratto sono espressi in svariati tessuti non neuronali, anche se in quantità inferiore. Gli stessi autori hanno postulato l'ipotesi che gli effetti fisiologici indotti dopo somministrazione di agenti esogeni od endogeni possano essere spiegati in parte da una azione diretta su questo *pool* di recettori periferici verso cui i legandi avrebbero una funzione endocrina e paracrina. A confermare questa ipotesi vi è anche la scoperta che diverse encefaline e i loro precursori sono ampiamente espressi a livello di tessuto non neuronale come miocardio, rene, intestino, polmone e sistema immunitario anche se esistono delle differenze legate alla specie presa in esame (Denning *et al.* 2008).

Diversi studi hanno indagato la possibile funzione degli oppioidi a

livello periferico. Il maggior numero di lavori valutano l'effetto degli oppioidi nel modulare la risposta infiammatoria tramite azione diretta sulle cellule della serie bianca dove sono stati isolati i MOR (Muir 2002). A livello miocardico, l'interesse per gli effetti locali dovuti alla somministrazione esogena di oppioidi è legata alla loro proprietà protettiva verso i danni dovuti a periodi di ischemia (Shim & Kersten 2008). Diversi studi mettono in evidenza come a livello cardiaco i recettori δ abbiano un ruolo predominante rispetto a quello dei κ , la cui funzione però non poteva essere esclusa a priori in ragione di risultati contraddittori presenti nella letteratura scientifica (Gross 2003).

Nel sistema renale gli oppioidi dimostrano di possedere svariati effetti che influenzano l'equilibrio idrico e la composizione elettrolitica delle urine e indirettamente la loro osmolarità. Il sistema oppioidergico endogeno dimostra di possedere un ruolo nel mantenimento dello stato idrico ed elettrolitico e a riprova di ciò la somministrazione di naltroxene, un antagonista oppioide, è in grado di annullare i fenomeni adattativi, in termini di effetto antinatriuretico, in seguito a una dieta iposodica, (DiBona & Jones 1994). Inoltre, la somministrazione di oppioidi esogeni ha effetti opposti sulla diuresi a seconda del farmaco; la somministrazione di morfina o più in generale di un agonista dei recettori μ tende infatti a indurre uno stato di oliguria, mentre gli agonisti dei recettori κ hanno un effetto diuretico (Mercadante & Arcuri 2004).

Il meccanismo fisiologici che controllano questi effetti sembra siano multifattoriali e legati ad una interazione di singoli processi che avvengono a differenti livelli e coinvolgano strutture encefaliche, strutture periferiche come le ghiandole surrenali e i barocettori vasali ed infine lo stesso il rene (Kapusta 1995).

L'effetto che alcuni agonisti puri dei recettori μ come morfina e petidina provocano a livello vascolare è quello di indurre indirettamente uno stato ipotensivo dovuto alla liberazione di istamina che provocherebbe

una vasodilatazione periferica (Muir 2002). Questo fenomeno condurrebbe ad una alterazione della perfusione renale e diminuirebbe la filtrazione glomerulare e così la produzione di urine. L'evenienza che si osservi un tale evento nella pratica clinica è tuttavia piuttosto infrequente e non spiega appieno quanto osservato nello studio di Guedes *et al.* in cui anche alte dosi di morfina, somministrate in infusione continua nel cane non producevano un apprezzabile aumento dei livelli plasmatici di istamina o modificazioni della pressione arteriosa sistolica. Si deve giungere che l'effetto antidiuretico degli agonisti puri μ è stato osservato anche dopo somministrazione di agenti che non sono associati a rilascio di istamina (Blackburn *et al.* 1986) e dunque possa rappresentare un reale problema solo in soggetti debilitati con un sistema cardiovascolare compromesso.

Un altro meccanismo che spiega l'effetto degli oppioidi sulla diuresi vede una loro interazione diretta o indiretta con la ghiandola surrenale. Numerosi studi hanno infatti osservato come l'effetto diuretico degli agonisti κ sia diminuito o soppresso dopo rimozione chirurgica della midollare della surrene (Blackburn *et al.* 1986, Ashton *et al.* 1989). Mancano al momento studi sovrapponibili che considerino gli agonisti μ . Il legame tra surrenale e diuresi sembra risiedere nel rilascio di adrenalina che a livello renale attiva i recettori α adrenergici inducendo così un aumento della diuresi per aumento della filtrazione glomerulare e diminuendo il riassorbimento di acqua e ioni a livello di interstizio (Kapusta 1995). La presenza di recettori oppioidi a livello della corticale renale è stata dimostrata da studi di binding con radiolegandi e tramite la valutazione dell'espressione genica di peptidi e recettori (DiBona & Jones 1994, Kapusta 1995, Denning *et al.* 2008). Un ulteriore meccanismo spiegherebbe l'azione degli agonisti dei recettori κ sull'escrezione di acqua e più precisamente questi composti sono in grado di aumentare la permeabilità cellulare contrastando gli effetti dell'ADH (Slizgi *et al.* 1984).

CAPITOLO 3: OBIETTIVI

Gli analgesici oppioidi sono una classe di farmaci ampiamente usata in medicina per la terapia del dolore e nonostante il loro effetto sul sistema nervoso sia stato ampiamente studiato, negli ultimi anni sempre più interesse ha destato la loro possibile azione su siti periferici non neuronali. I recettori oppioidi sono stati infatti isolati in differenti tessuti come cuore, rene o intestino e qui sembra controllino funzioni cellulari non legate ad una azione analgesica. Pare invece che gli oppioidi endogeni siano importanti fattori che mantengono l'omeostasi dei tessuti e abbiano un'azione modulatrice sull'attività degli organi in cui sono stati isolati (Kapusta 1996, Townsend & Brown 2003, Denning *et al.* 2008). A livello cardiaco sembra che questi farmaci siano coinvolti nel mantenere l'equilibrio elettrolitico nel comparto intercellulare e promuovano un rilascio di calcio per la contrazione (Samways & Henderson 2006). Un'altra importante funzione mediata, a livello cardiaco dai recettori per gli oppiacei è quel particolare fenomeno detto di preconditionamento che previene o limita i danni da ischemia e riperfusione dopo infarto (Gross 2003, Peart *et al.* 2005).

L'obiettivo dello studio è quello di valutare in vitro in assenza o durante un evento ischemico, l'effetto di differenti tipi di oppioidi su una linea cellulare di tubulo renale prossimale (*Opossum proximal tubular Kidney cells*), che mantiene anche in coltura diverse caratteristiche tipiche delle cellule native ed esprime sulla membrana diversi recettori normalmente presenti a livello tubulare nei mammiferi, tra cui i recettori κ1 per gli oppioidi (Hatzoglou *et al.* 1996).

Gli agenti oppioidi che sono stati scelti per lo studio hanno diversa affinità di legame con il recettore e diverso profilo farmacodinamico. I farmaci presi in considerazione sono sia molecole agoniste che antagoniste. La scelta dei farmaci è stata fatta per valutare se gli effetti osservati siano legati ad una azione mediata dal legame degli analgesici con il recettore oppure se avvenga in modo indipendente. Inoltre le cellule sono state

esposte a differenti concentrazioni per ognuno dei farmaci allo scopo di valutare se gli eventuali effetti osservati sono influenzati dalla dose. Infine Un ultimo obiettivo è quello di studiare quale sia il meccanismo se presente alla base dell'azione dei farmaci nei confronti della necrosi e dell'apoptosi che si instaura nelle fasi seguenti l'evento ischemico.

CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI

COLTURA DELLE CELLULE

La linea cellulare OK (*Opossum proximal tubular Kidney cells*) è stata acquistata presso l'American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA) che l'ha fornita al passaggio 40°. Le cellule sono state scongelate e seminate in una fiasca da 75 cm² in terreno completo composto da Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ad alto tenore di glucosio addizionato di Siero Fetale Bovino ad una concentrazione del 10% (v/v), 100 UI/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina e 2 mM di L-Glutamina. Le cellule sono state lasciate crescere in adesione fino al raggiungimento della confluenza. Per mantenere la linea cellulare in coltura, sono stati effettuati passaggi settimanali di cellule confluenti procedendo nel seguente modo:

1. è stato eliminato il terreno di coltura ed effettuato un lavaggio con Dubecco's PBS (EuroClone) per eliminare il terreno residuo
2. le cellule sono state staccate utilizzando una soluzione di tripsina ed EDTA (EuroClone) a 37 °C per 2-3 minuti
3. l'azione della tripsina è stata bloccata mediante aggiunta di terreno completo La sospensione cellulare è stata centrifugata per 5 minuti a 1500 RPM ad una temperatura di 4°C in modo da sedimentare le cellule
4. Una volta aspirato il surnatante sono stati aggiunti 5 ml di terreno completo e il pellet di cellule risospeso. Le cellule sono state contate mediante test di esclusione al Trypan Blue
5. Una nuova fiasca con superficie di 75 cm² è stata preparata aggiungendo 20 ml di terreno completo e in queste sono state seminate 10⁶ cellule
6. La fiasca è stata incubata a 37°C in atmosfera controllata contenente 95% di umidità e 5% di CO₂, fino al raggiungimento della confluenza

Le cellule per le prove sono state usate tra il 4 e 11 passaggio (p43-p50).

FARMACI

Le cellule OK sono state trattate con tre diverse concentrazioni (10^{-10} , 10^{-8} e 10^{-5} M) di farmaci oppioidi. Gli agenti analgesici scelti comprendono morfina e fentanyl, due agonisti puri dei recettori μ , butorfanolo, un agonista κ antagonista μ , e la buprenorfina, un agonista parziale μ .

Le soluzioni contenenti i farmaci sono stati lasciate in contatto con le cellule e sostituite ogni 24 ore con terreno fresco contenente i farmaci.

DEPLEZIONE DI ATP

Le cellule sono state sottoposte a un periodo di privazione di ATP mediante inibizione della fosforilazione ossidativa e della glicolisi, in modo da bloccare la sintesi di ATP sia nel mitocondrio che nel citoplasma.

Il protocollo prevedeva l'utilizzo di una soluzione ischemizzante (SI) composta da antimicina A (Sigma) 10 μ M e il 2-Deossi-D-glucosio (Sigma) 2 mM. L'antimicina A è un miscela di tossine (Antimicina A1, A2, A3 ed A4) prodotta da miceti appartenenti alla famiglia degli *streptomyces sp.* che inibisce la respirazione mitocondriale andando a bloccare il trasferimento di elettroni al complesso III posto sulla membrana mitocondriale interna. Il 2-Deossi-D-glucosio (Sigma) è una molecola di glucosio in cui il gruppo idrossilico in posizione 2 è stato sostituito con un atomo di idrogeno che impedisce a questa forma di glucosio di legarsi con l'enzima esokinasi per essere fosforilata, bloccando così la glicolisi.

La deplezione di ATP è stata indotta su cellule seminate in piastre multipozzetto lasciate crescere in terreno completo fino a confluenza. Raggiunta confluenza il terreno è stato sostituito con un egual volume di SI e posto in incubazione alle stesse condizioni di crescita per un periodo di 2 ore. Alla fine dell'incubazione la SI è stata rimossa ed è stato aggiunto nuovamente terreno completo.

STUDI DI VITALITÀ CELLULARE

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti così da ottenere una densità iniziale di $7 \cdot 10^3$ cellule per pozzetto. La proliferazione cellulare è stata studiata con la metodica colorimetrica MTS (CellTiter 96[®] AQueous One Solition Cell Proliferation Assay, Promega) che si basa sulla riduzione, tramite NADH, di un sale di tetrazolio in un composto cromoforo detto formazano, solubile nel medium di coltura. Brevemente, ad ogni pozzetto venivano aggiunti 10 μ l di reagente e la piastra veniva poi incubata per 2 ore a 37 °C. Successivamente l'assorbanza dei singoli pozzetti della piastra era letta allo spettrofotometro impostato perché emettesse una lunghezza d'onda di 490 nm.

CONTENUTO DI ATP INTRACELLULARE

Una concentrazione iniziale di $7 \cdot 10^3$ cellule in 0.1 ml di terreno è stata seminata in piastre da 96 pozzetti oscurati per prove di luminescenza. Il contenuto di ATP è stato misurato tramite metodica a luminescenza (CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay, Promega) che si basa sulla captazione della luminescenza emessa in maniera proporzionale alla reazione di ossidazione della luciferina in presenza di ione magnesio, ossigeno e ATP, ad opera dell'enzima luciferasi. Secondo le linee guida fornite dal produttore, dopo aver mantenuto le cellule a temperatura ambiente per 30 minuti, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 0.1 ml di una soluzione citolitica contenente la luciferasi. La piastra era messa in agitazione a temperatura ambiente per 10 minuti così da stabilizzare il segnale di luminescenza la cui emissione veniva letta al luminometro settato per eseguire la lettura nell'arco di un secondo di esposizione .

STUDI DELL'ATTIVITÀ DELLE CASPASI -3 E -7

In piastre da 96 pozzetti una quantità pari a $7 \cdot 10^3$ cellule sono state

seminate e 0.1 ml di terreno è stato aggiunto ad ogni pozzetto. La presenza di caspasi effettrici -3 e -7 era stata valuta tramite un metodo fluorimetrico (Apo-ONE[®] Homogeneous Caspase-3/7 Assay, Promega). Questa metodica si basa sulla fluorescenza prodotta dal clivaggio del Z-DEVD-R110, un composto non fluorescente che funge da substrato per le caspasi-3 e -7, che viene convertito in rodamina 110 fluorescente. Prima di procedere con questo test sulla stessa piastra è state misurato il numero di cellule presenti sempre con metodica fluorimetrica (CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay, Promega) utilizzando come marker un colorante vitale, la resazurina, che penetra nella cellula dove subisce una reazione di riduzione e viene convertita a resorufina che emette fluorescenza a 590 nm. La procedura prevedeva l'aggiunta di 0.02 ml di colorante vitale ad ogni pozzetto, successivamente la piastra veniva incubata a 37°C per 1 ora infine lettura al fluorimetro (590 nm). Terminate le letture per la vitalità cellulare lo studio dell'attività delle caspasi-3 e -7 era valutata aggiungendo alla piastra 50 µl di una soluzione ottenuta mettendo in contatto con il buffer una soluzione citolitica contenente Z-DEVD-R110 come descritto dal produttore. Dopo incubazione per 2 ore a 37°C la fluorescenza prodotta dalla reazione con le caspasi era letta a fluorimetro (485 nm).

ANALISI CITOFUORIMETRICHE

VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI E DELLA NECROSI CON L'UTILIZZO DI ANNESSINA V/PI

In piastre da 24 pozzetti sono state seminate $25 \cdot 10^3$ cellule per pozzetto in 0,5 ml di terreno. Raggiunta confluenza le cellule sono state trattate cambiando giornalmente il terreno contenente farmaci. La prova è stata condotta con il kit Annexin-V-Flous (Roche) secondo le linee guida fornite dal produttore. In breve, dopo aver prelevato e raccolto accuratamente il terreno di ogni pozzetto in tubi per FACS, le cellule sono state lavate con PBS (0,5 ml/pozzetto). Successivamente le cellule adese

sono state trattate con 0,2 ml di tripsina per 2 minuti fino ad ottenerne il distacco dal fondo del pozzetto. Dopo inattivazione della tripsina con 0,2 ml di terreno completo le cellule sono state raccolte nei rispettivi tubi FACS e centrifugate a 1500 RPM per 5 minuti. Al pellet di cellule sono stati aggiunti 100 µl di una soluzione contenente 10 µl di annessina per 1 ml di buffer (10 mM Hepes/NaOH, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ PH 7.4). Le cellule sono state incubate con la soluzione di annessina per 15 minuti, sono stati aggiunti 400 µl di buffer e 10 µl di PI (1mg/ml) ed è stata eseguita la lettura al citofluorimetro a flusso e successiva analisi. Le varie sottopopolazioni cellulari venivano distinte in necrotiche (Annexin+/PI+), apoptotiche (Annexin+/PI-) e vitali (Annexin-/PI-). Le prove sono state condotte in duplicato.

STUDIO DEL CICLO CELLULARE CON L'UTILIZZO DI PROPIDIO IODURO

In piastre da 24 pozzetti sono state seminate 25 10³ cellule e dopo averle incubate per una notte sono state trattate con i farmaci. Per lo studio del ciclo cellulare e della popolazione sub G1 sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 0,5 ml di una soluzione costituita da propidio ioduro 625 µl (concentrazione della soluzione madre di partenza 1 mg/ml), 33 µl di RNAasi (concentrazione della soluzione madre di partenza 10 mg/ml) 100 µl di Igepal e il tutto è stato portato ad un volume finale di 25 ml con acqua distillata sterile. Le piastre sono state incubate al riparo dalla luce per 12 ore a 4°C. Alla fine dell'incubazione le letture sono state fatte mediante citofluorimetria e successiva analisi mediante il software WinMDI 2.9 per ottenere la percentuale di cellule in ciascuna fase del ciclo cellulare (subG1, G1, S e G2/M).

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Per valutare se i quattro analgesici oppioidi possano influenzare la proliferazione e l'apoptosi delle cellule, le OK sono state trattate con

ognuno dei 4 farmaci alle tre concentrazioni in precedenza riportate. Le cellule sono state messe a diretto contatto con il terreno contenente i farmaci per un periodo di 6 (T6), 24 (T24) e 48 (T48) ore per gli studi di vitalità. La presenza di apoptosi o necrosi e analisi del ciclo cellulare è stata valutata con metodica citofluorimetrica dopo 24 e 48 ore di trattamento.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE IN CELLULE SOTTOPOSTE A DEPLEZIONE DI ATP

Prima di procedere con lo studio sulla valutazione dell'effetto che gli agenti farmacologici avevano sulle cellule dopo deplezione di ATP, sono state eseguite delle prove preliminari per valutare quale potesse essere il miglior protocollo applicabile per la deplezione di ATP. L'obbiettivo era quello di trovare un'adeguata combinazione di antimicina A e di 2-Deossi-D-glucosio in grado di determinare una completa ma reversibile diminuzione del contenuto intracellulare di ATP. Una volta scelta la soluzione ischemizzante (SI) da impiegare nello studio, sono state eseguite le prove di ischemia in presenza dei farmaci oppioidi.

Sono stati utilizzati tre diversi protocolli sperimentali:

1. P1: le cellule OK sono state pre-trattate con i farmaci per due ore, prima della deplezione dell'ischemia. Alla fine della deplezione di ATP le cellule sono state trattate con gli oppioidi per 12 e 24 ore
2. P2: le cellule sono state esposte ai farmaci solo nella fase post deplezione (12 e 24 ore)
3. P3: le cellule sono state esposte ai farmaci solo per 2 ore prima la deplezione di ATP. In questo protocollo terminata l'ischemia le cellule sono lasciate per 12 e 24 ore in normale terreno di coltura.

PRESENTAZIONE DEI DATI ED ELABORAZIONE STATISTICA

I dati sono stati testati per la distribuzione normale con un test di Kolmogorov-Smirnov. Se i dati seguivano una distribuzione normale le medie erano comparate con un test ANOVA a due vie e qualora il risultato del test indicasse una differenza statisticamente significativa un post hoc test di Dunnett veniva eseguito per trovare differenze tra la media del gruppo di controllo e le diverse concentrazioni dei farmaci. Qualora l'ipotesi della normalità o dell'omogeneità della varianza veniva respinta le medie venivano comparate con un test non parametrico di Kruskal-Wallis e un test di Dunn veniva usato come post hoc.

I dati di proliferazione, il contenuto di ATP intracellulare e l'attività delle caspasi sono stati normalizzati per il numero di cellule presenti nei pozzetti di controllo e sono espresse come media \pm deviazione standard delle percentuali dei singoli valori. La percentuale di cellule vitali, apoptotiche e necrotiche e la percentuale delle sottopopolazioni sub G1, S e G2/M sono presentate come media \pm deviazione standard dei valori ottenuti da ogni singola prova

CAPITOLO 5: RISULTATI

EFFETTO DEI FARMACI OPIOIDI SULLE CELLULE DI TUBULO RENALE PROSSIMALE

Dalle prove di vitalità misurata con metodica MTS dopo esposizione ai differenti farmaci si osserva che le cellule trattate con morfina dopo 6 ore dimostrano, a tutte le concentrazioni, un aumento della vitalità rispetto al controllo con una percentuale superiore per dosi di 10^{-8} M ($p < 0.01$).

A 48 ore non vi sono differenze nella vitalità tra cellule trattate e non trattate (Grafico 1). Il fentanyl dimostra invece un comportamento differente che sembra influenzato dalla concentrazione usata (Grafico 2).

Infatti le cellule messe in contatto con concentrazioni pari a 10^{-10} M presentano dopo 6 e 24 ore un aumento della vitalità circa del 5% e 8% ($100.0\% \pm 1.9$ vs 105.1 ± 1.7 $p < 0.05$ per T6 e 100.0 ± 2.6 108.3 ± 2.2 $p < 0.01$ per T24). Alla dose di 10^{-5} M, il fentanyl sembra invece promuovere una diminuzione della vitalità cellulare di circa il 7% ($100.0\% \pm 1.9$ vs 93.4 ± 2.1 $p < 0.01$), limitata nel tempo e riscontrabile solo a 6 ore di esposizione ma non più a 24 o 48. Un effetto dose dipendente si osserva anche per la buprenorfina dove la vitalità diminuisce di oltre il 4%, anche se solo dopo 48 ore di esposizione a 10^{-5} M (Grafico 4).

Lo studio dell'apoptosi e della necrosi con l'impiego dell'annexina V e del PI non mostrano un effetto significativo degli oppioidi sulle cellule rispetto al controllo non trattato. La percentuale di cellule vitali tende ad essere massima quando vengono trattate con morfina e fentanyl per 24 ore ad ogni concentrazione, soprattutto se comparata con le cellule esposte al butorfanolo e la buprenorfina per lo stesso tempo. Nelle cellule trattate con questi farmaci si osserva una percentuale di cellule vitali diminuita anche se queste differenze non risultano statisticamente significative (Grafico 5). La minor percentuale di cellule vitali (81.12 ± 7.28 %) è presente nelle piastre trattate con la concentrazione più alta, 10^{-5} M, di buprenorfina. Alla medesima concentrazione dello stesso farmaco si ha una significatività

statistica relativa al numero di cellule apoptotiche rispetto al controllo non trattato (3.38 ± 0.38 vs 4.92 ± 0.48 % $p < 0.05$). Una significatività statistica per le cellule in apoptosi si ha nel gruppo trattato con fentanyl alla dose di 10^{-5} M (Tabella 2, Grafico 6). Nella percentuale di cellule necrotiche non è presente una significatività statistica, ma anche in questa popolazione cellulare la buprenorfina e il butorfanolo presentano le percentuali più elevate ed anche in questo caso la buprenorfina alle dosi più alte dimostra possedere un effetto superiore rispetto al controllo, rispettivamente di 11.72 ± 4.75 vs 6.33 ± 5.47 % (Grafico 7). Dopo 48 ore di esposizione l'effetto osservato è sovrapponibile in parte a quanto descritto in precedenza, infatti il butorfanolo e la buprenorfina tendono ad avere percentuali di cellule vitali esposte a concentrazioni elevate minori rispetto al controllo, rispettivamente 84.18 ± 0.54 e 85.42 ± 1.59 vs 88.74 ± 6.79 (Grafico 8). Alle stesse dosi la percentuale di cellule necrotiche è statisticamente significativa tra cellule esposte al butorfanolo od alla buprenorfina rispettivamente 8.97 ± 1.07 % ($p < 0.05$) e 8.55 ± 1.58 % ($p < 0.01$) contro una percentuale del controllo di 5.20 ± 5.37 % (Grafico 10). La popolazione di cellule apoptotiche risulta simile tra i vari trattamenti e il controllo e non presenta alcuna significatività (Grafico 9).

Lo studio del ciclo cellulare con colorazione dei nuclei con propidio ioduro non mostra rilevanti differenze tra i vari farmaci sia dopo 24 che dopo 48 ore. La percentuale di cellule che rientra nella sottopopolazione sub G1 non dimostra significative deviazioni dal controllo di cellule non trattate per ogni tempo e per tutte le concentrazioni dei 4 farmaci (Grafico 12-14). Vi è una differenza statisticamente significativa tra le cellule trattate con fentanyl alla più alta dose 10^{-5} M ed il controllo, nella percentuale della popolazione in fase S rispetto al controllo ($p < 0.05$) dopo 48 ore di esposizione (Grafico 15). Un'altra differenza statisticamente significativa è presente a 24 ore per le cellule esposte a 10^{-5} M di

buprenorfina nella fase G2 (Grafico 13) in cui la percentuale della sottopopolazione è del $39,84 \pm 0,99$ % rispetto al $33,12 \pm 3,05$ % del controllo ($p < 0.05$).

EFFETTO DEI FARMACI OPIOIDI SULLE OK SOTTOPOSTE A DEPLEZIONE DI ATP

A) Valutazione del contenuto di ATP

L'antimicina A e il 2-Deossi-D-glucosio hanno effetti differenti sul contenuto di ATP intracellulare in base al tempo di esposizione e all'impiego di entrambi i composti o solo dell'antimicina A (Grafico 17). Nelle cellule che non sono state trattate con la soluzione ischemizzante la quantità di ATP aumenta in modo progressivo nel tempo e dopo 48 ore si ha un aumento che del 60 % rispetto alla quantità dosata all'inizio delle prove. Nelle cellule trattate con le soluzioni ischemizzanti, immediatamente dopo aver allontanato i reagenti (T0) il contenuto di ATP è diminuito in modo marcato e pressoché completo, in modo sovrapponibile per tutti i protocolli usati e si attesta intorno al 1-2 % di quanto ci si attende se si considera il gruppo di controllo. Nelle ore seguenti il fenomeno ischemico le cellule trattate solamente 2 ore dimostrano una certa ripresa della percentuale di ATP, mentre in quelle esposte per 4 ore alla SI si osserva una lieve ripresa a 12 ore solo nelle cellule trattate con antimicina A.

Le cellule trattate con antimicina A o con antimicina e 2-Deossi-D-glucosio per 2 ore presentano una parziale ripresa. L'aumento più marcato del contenuto di ATP intracellulare si ha quando le cellule sono esposte alla sola antimicina A con una risalita del contenuto di ATP che raggiunge i valori delle cellule di controllo non ischemizzate 24 ore dopo la deplezione di ATP. Nelle successive 24 ore nello stesso protocollo si osserva una diminuzione del contenuto di ATP che scende al 99.8%. Un andamento simile si osserva anche nelle cellule trattate per 2 ore con una soluzione

contenente sia l'antimicina A che il 2-Deossi-D-glucosio, in cui dopo una iniziale ripresa nelle prime 24 ore, che ristabilisce il contenuto di ATP a valori del 80%, segue una diminuzione che porta la concentrazione del composto a 48 ore a circa il 50% rispetto al periodo immediatamente seguente l'ischemia. Alla luce di quanto osservato, per i successivi esperimenti con i farmaci oppiacei si è scelto di trattare le cellule OK ad antimicina A e 2-deossi D-glucosio per 2 ore, protocollo in grado di indurre una deplezione reversibile del contenuto di ATP.

Il contenuto di ATP intracellulare normalizzato per il numero di cellule presenti nel campione dimostra un differente andamento a seconda del tipo di farmaco oppioide e del tipo di protocollo perso in esame (tabella 7) Nel protocollo P1 al tempo 0, la percentuale di ATP in tutti i trattamenti è sovrapponibile al valore del controllo positivo di cellule che hanno subito solo il trattamento con l'antimicina e il 2-Deossi-D-glucosio. I valori misurati in questo istante per la morfina e il fentanyl sono più elevati rispetto a quelli per il butorfanolo o la buprenorfina anche se rispetto alle cellule trattate con la sola soluzione ischemizzante non si ha una differenza statisticamente significativa e i valori percentuali si attestano tra un minimo di $5.6 \pm 0.4\%$ e un massimo di $21.5 \pm 2.9\%$ (Tabella 7, 8, 9, 10).

A 12 ore dall'evento ischemico nel protocollo P1 le cellule trattate con terreno contenente morfina alla dose di $10^{-10}M$ e $10^{-5} M$ hanno un contenuto di ATP maggiore rispetto al controllo positivo. Allo stesso tempo di analisi, le cellule esposte a tutte le concentrazioni di fentanyl hanno una concentrazione di ATP maggiore di quello contenuto nelle cellule esposte alla sola soluzione ischemizzante. Questo effetto scompare a 24 ore post ischemia per entrambi i farmaci. Le cellule trattate con butorfanolo e buprenorfina invece si comportano come il controllo positivo in ogni intervallo di tempo considerato.

Nel protocollo P2 le cellule sono messe in contatto con il terreno

contenete gli oppioidi solo nella fase che segue l'ischemia. In questo protocollo l'esposizione alla morfina sembra avere un effetto dose dipendente. Dopo 12 ore di incubazione, a basse dosi la morfina aumenta il contenuto di ATP rispetto al controllo positivo, ma l'effetto è limitato e scompare a 24 ore. Alle medie e alte dosi il contatto con la morfina diminuisce il contenuto di ATP intracellulare dopo 24 ore di esposizione. Il fentanyl aggiunto dopo l'evento ischemico aumenta il contenuto di ATP a 12 ore per tutte le dosi ma non a 24 ore. Il butorfanolo diversamente dai primi due farmaci non ha alcun effetto sul contenuto di ATP a 12 ore ma produce un suo aumento a 24 ore in tutte le concentrazioni testate. L'esposizione alla buprenorfina non ha effetto sul contenuto di ATP.

Il pretrattamento delle cellule con gli oppioidi (Protocollo P3) sembra avere minimi effetti per tutti i farmaci tranne il fentanyl, che produce un aumento del contenuto di ATP intracellulare che permane per 12 ore dopo il trattamento e successivamente non è più osservabile.

B) Valutazione dell'attività caspatica

Gli esperimenti sull'attivazione delle caspasi -3 e -7 in cellule sottoposte a deplezione di ATP e trattamento con farmaci oppiacei hanno mostrato come l'effetto degli oppioidi sia variabile a seconda del farmaco utilizzato. Immediatamente dopo l'insulto ischemico l'attività delle caspasi nelle cellule tende ad aumentare del $265.0 \pm 16.2\%$ rispetto al valore misurato nelle cellule che non hanno subito ischemia ($p < 0.001$). nelle successive 24 ore, è stata registrata una progressiva diminuzione della percentuale di cellule in cui sono attive le caspasi che si attesta intorno al $137.2 \pm 9.1\%$ e $115.7 \pm 10.6\%$ rispettivamente a 12 e 24 ore dopo incubazione con nuovo terreno di coltura con una significatività statistica rispetto al controllo non ischemizzato solo nelle 12 ore.

Immediatamente dopo l'evento ischemico, nelle cellule trattate con morfina e fentanyl (Tabella 11, 12) la percentuale di attivazione delle

caspasi risulta minore rispetto al controllo positivo per tutte le concentrazioni studiate. L'effetto osservato a T0 è presente anche nelle 12 ore che seguono l'ischemia nelle cellule sottoposte al protocollo P1 e P3. Il fentanyl dimostra attività superiore rispetto alla morfina con percentuali di attivazione delle caspasi minori. Nessuna differenza rispetto al controllo ischemico è stato osservato nelle cellule trattate con il fentanyl a 24 ore nei due protocolli. Le cellule che non hanno subito il pretrattamento con gli oppioidi ma che sono state trattate con terreno contenente i farmaci dopo l'evento ischemico (protocollo P2, Tabella 11, 12) dimostrano, sia con morfina che con fentanyl in tutti i dosaggi utilizzati, una percentuale di caspasi attivate a 12 ore minore rispetto al controllo ischemia ed anche in questo caso il fentanyl si dimostra più efficace come inibitore delle caspasi rispetto alla morfina. A 24 ore in questo protocollo le cellule trattate con 10^{-10} M di morfina e 10^{-8} M e 10^{-5} M hanno percentuali di attivazione delle caspasi maggiori rispetto al controllo negativo.

Il butorfanolo e la buprenorfina dimostrano di possedere scarsa attività nell'inibire l'attivazione delle caspasi e non si osservano differenze statisticamente significative ad ogni intervallo di tempo studiato per tutti i protocolli rispetto alle cellule sottoposte al trattamento con la sola soluzione ischemizzante (Tabelle 13 e 14,).

C) Analisi dell'apoptosi mediante colorazione con annessina/PI

Lo studio dell'apoptosi e della necrosi in cellule che sono state esposte per 2 ore alle tre concentrazioni di ogni oppioide, prima e dopo l'evento ischemico (protocollo P1) mostra variazioni statisticamente significative rispetto alle cellule non trattate legate al tempo di esposizione dopo l'ischemia e al farmaco con cui sono state messe in contatto. A T0, immediatamente dopo l'evento ischemico, la percentuale di cellule vitali (Annessina-/PI-) è diminuita rispetto alle cellule non sottoposte a ischemia (controllo negativo) in tutti i gruppi studiati. Nessuna variazione

significativa è risultata rispetto a quanto avviene per il controllo di cellule che sono state trattate solo con la SI ad eccezione della dose più alta di morfina; dopo trattamento con morfina 10^{-5} M la percentuale di cellule vitali è diminuita rispetto al controllo positivo, con valori misurati rispettivamente di $43.64 \pm 1.18\%$ e $55.99 \pm 7.92\%$ (Grafico 42). Simili risultati si osservano per la percentuale di necrosi dove non si osserva alcun effetto dei 4 oppioidi rispetto al controllo sottoposto a sola ischemia (Grafico 44). Per quanto riguarda la percentuale di cellule apoptotiche, questa è risultata minore, anche se non statisticamente significativa rispetto al controllo ischemia, per tutte le 3 concentrazioni di morfina e fentanyl. Una maggiore percentuale di cellule apoptotiche è stata misurata nel trattamento con butorfanolo e buprenorfina. La buprenorfina alle dose di 10^{-5} M ha causato un aumento della percentuale di apoptosi statisticamente maggiore se comparata al controllo sottoposto alla deplezione di ATP ($4.25 \pm 3.35\%$ vs $6.85 \pm 2.64\%$, $p < 0.05$, Grafico 43)

A 12 ore dall'evento ischemico il numero delle cellule vitali è risultato ancora inferiore al controllo negativo per tutte le cellule esposte all'ischemia senza differenze significative tra i gruppi (Grafico 45). La percentuale di cellule apoptotiche (Grafico 46) mostra un comportamento simile a quanto osservato a T0 ma le differenze sono più marcate e la percentuale di cellule trattate con fentanyl per tutte le concentrazioni è statisticamente significativo. Nessuna differenza rispetto al controllo positivo ischemico è presente nella percentuale di necrosi dei campioni trattati con i farmaci (Grafico 47).

A 24 ore dopo ischemia (Grafico 49) la percentuale di cellule vitali, seppur minore rispetto al controllo di cellule non sottoposte a ischemia, è maggiore per ogni dosaggio di morfina e fentanyl rispetto al controllo SI ($p < 0.01$) e questo aumento è controbilanciato da una diminuzione della percentuale di cellule necrotiche rispetto alle cellule trattate con SI (Grafico 48 e 50) e questo effetto non è stato osservato per le cellule esposte al

butorfanolo e alla buprenorfina. La percentuale di cellule apoptotiche è sovrapponibile a quanto osservato nel controllo ischemico, senza differenze tra i vari farmaci.

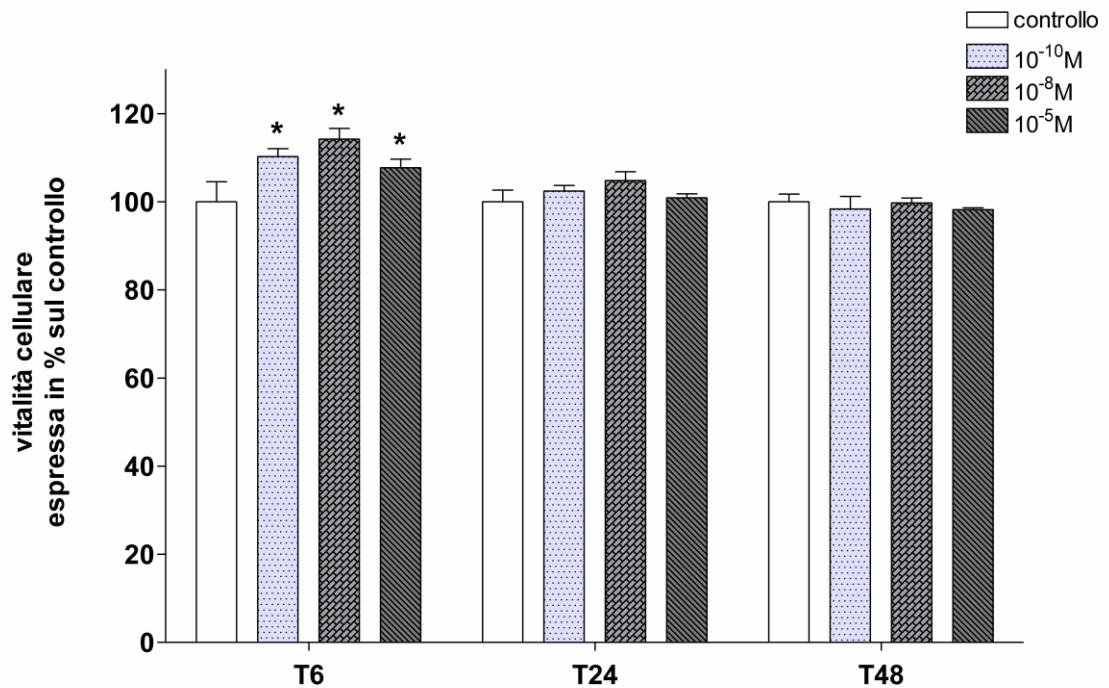


Grafico 1 Vitalità cellulare espressa come percentuale sul controllo misurata con la metodica colorimetrica MTS dopo 6 (T6), 24 (T24) e 48 (T48) ore di esposizione delle cellule a tre concentrazioni di morfina rispettivamente 10^{-10} M, 10^{-8} M e 10^{-5} M. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard, * indica significatività statistica rispetto al controllo ($p < 0.05$).

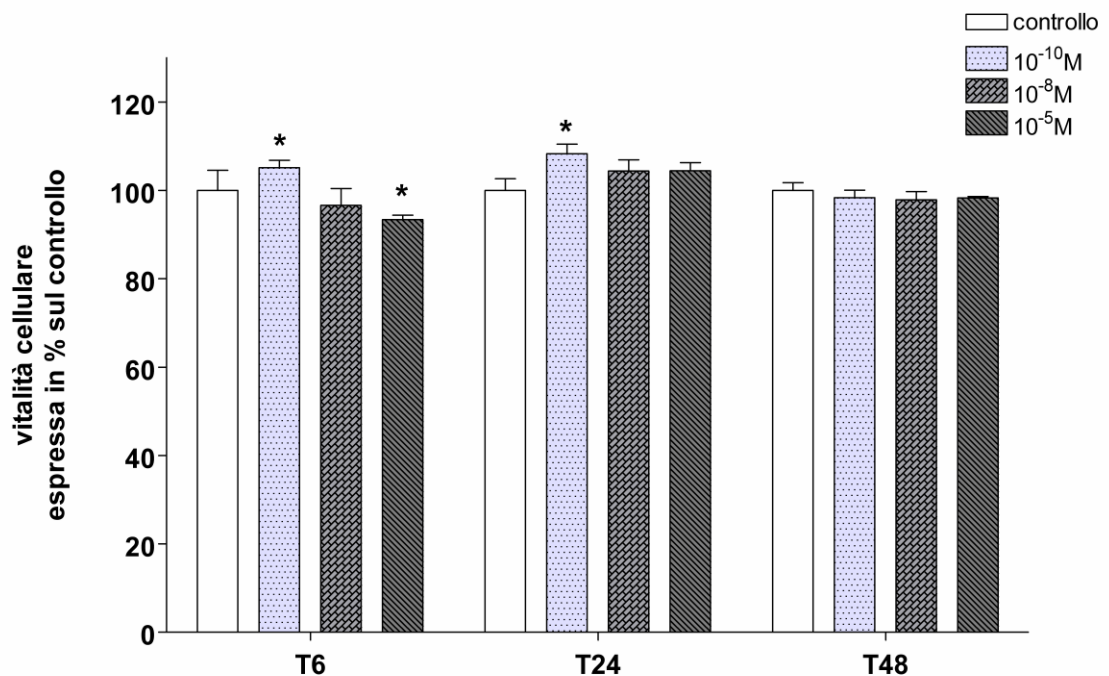


Grafico 2 Vitalità cellulare espressa come percentuale sul controllo misurata con la metodica colorimetrica MTS dopo 6 (T6), 24 (T24) e 48 (T48) ore di esposizione delle cellule a tre concentrazioni di fentanyl rispettivamente 10^{-10} M, 10^{-8} M e 10^{-5} M. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard, * indica significatività statistica rispetto al controllo ($p < 0.05$).

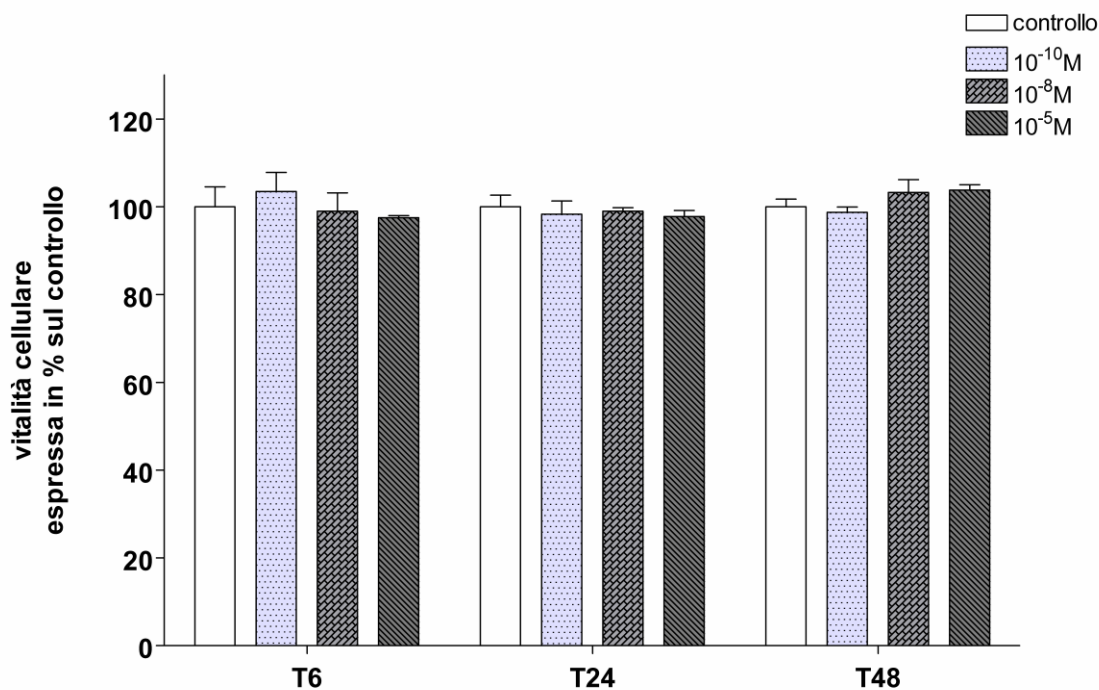


Grafico 3 Vitalità cellulare espressa come percentuale sul controllo misurata con la metodica colorimetrica MTS dopo 6 (T6), 24 (T24) e 48 (T48) ore di esposizione delle cellule a tre concentrazioni di butorfanolo rispettivamente 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M. I dati sono espressi come media ± deviazione standard

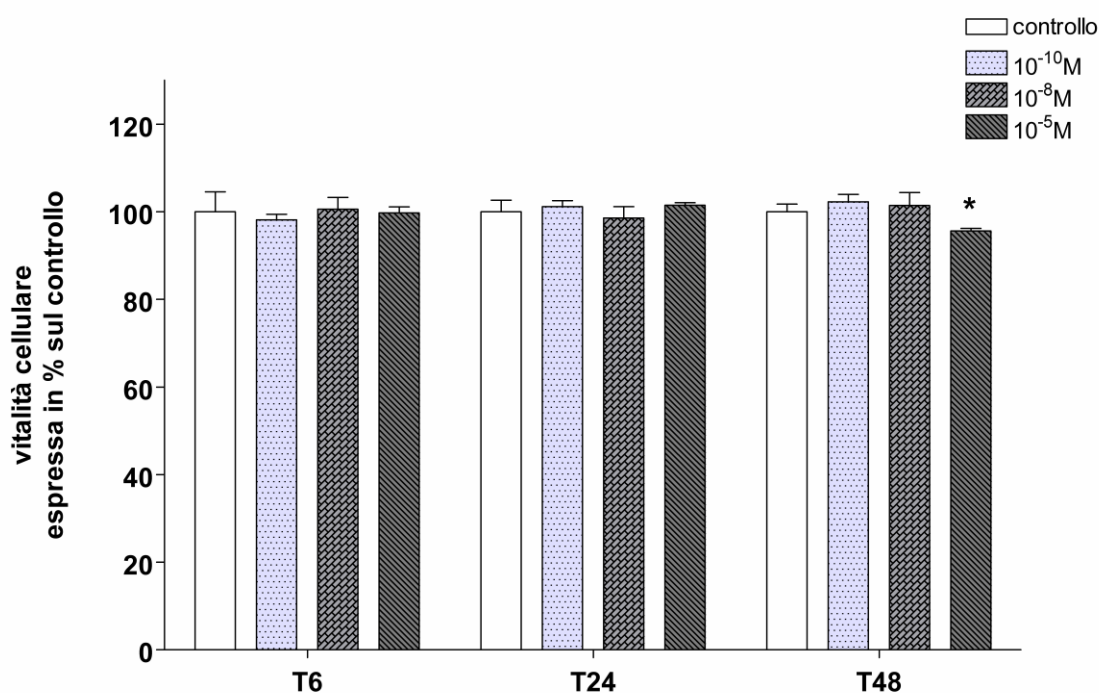


Grafico 4 Vitalità cellulare espressa come percentuale sul controllo misurata con la metodica colorimetrica MTS dopo 6 (T6), 24 (T24) e 48 (T48) ore di esposizione delle cellule a tre concentrazioni di buprenorfina rispettivamente 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M. I dati sono espressi come media ± deviazione standard, * significatività statistica (p<0.05) rispetto al controllo.

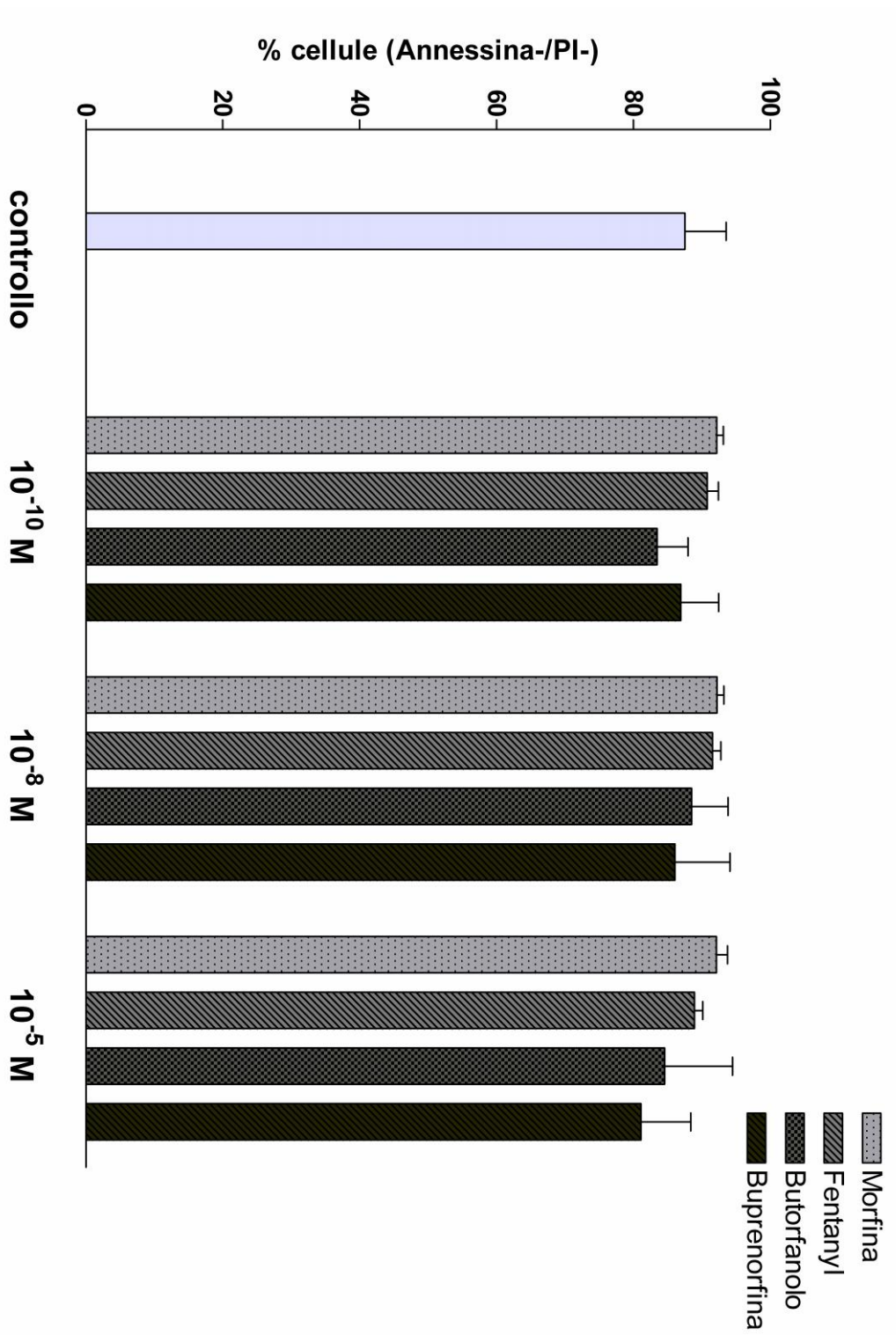


Grafico 5 % di cellule vitali (Annessina-/PI-) valutate mediante l'utilizzo di Annessina V/PI e con metodica citofluorimetrica, dopo 24 ore di esposizione a tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina. I dati sono espressi come media ± deviazione standard.

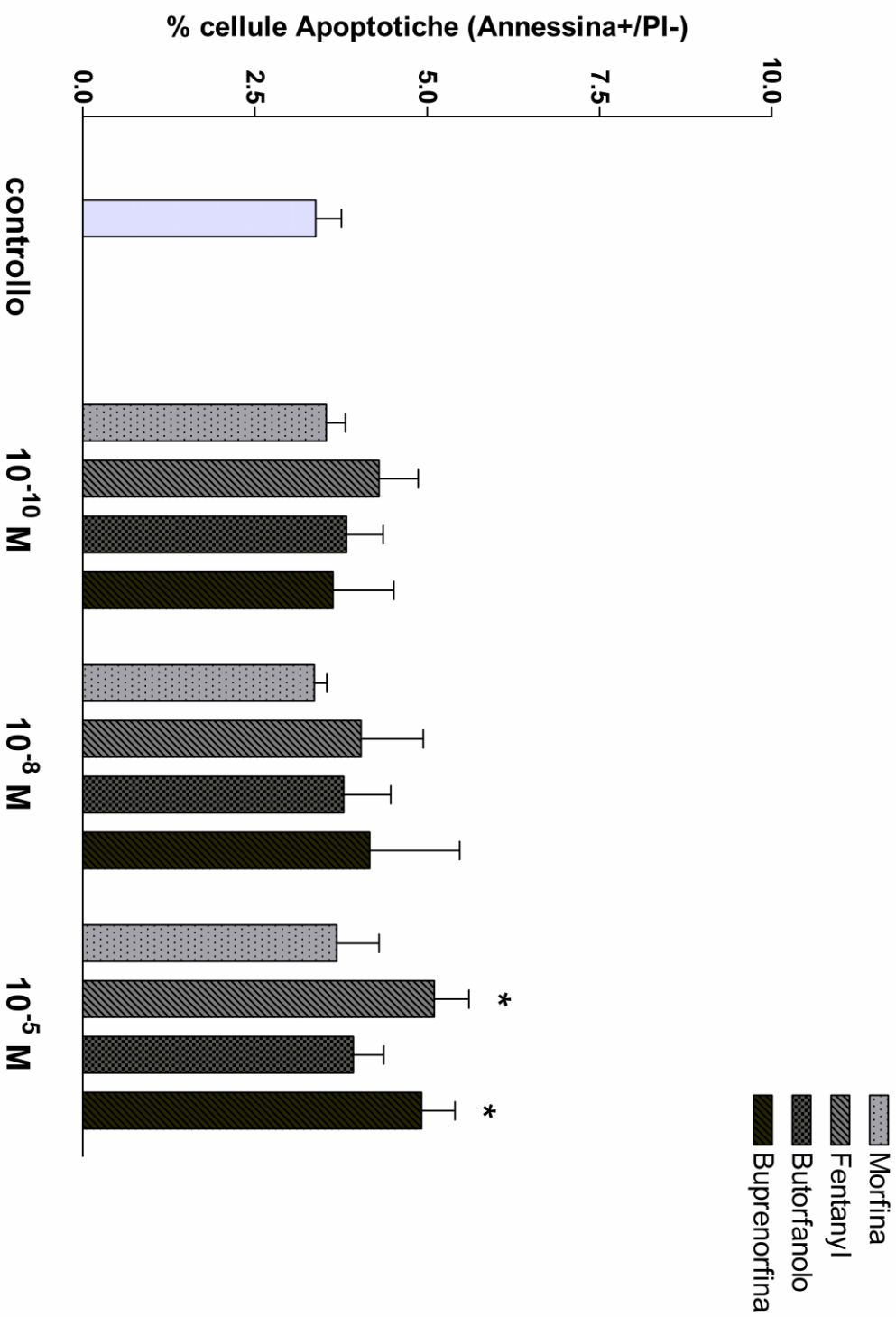


Grafico 6 % di cellule apoptotiche (Annessina+/PI-) valutate mediante l'utilizzo di Annessina V/PI e con metodica citofluorimetrica, dopo 24 ore di esposizione a tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina. I dati sono espressi come media ± deviazione standard, * significatività statistica (p<0.05) rispetto al controllo.

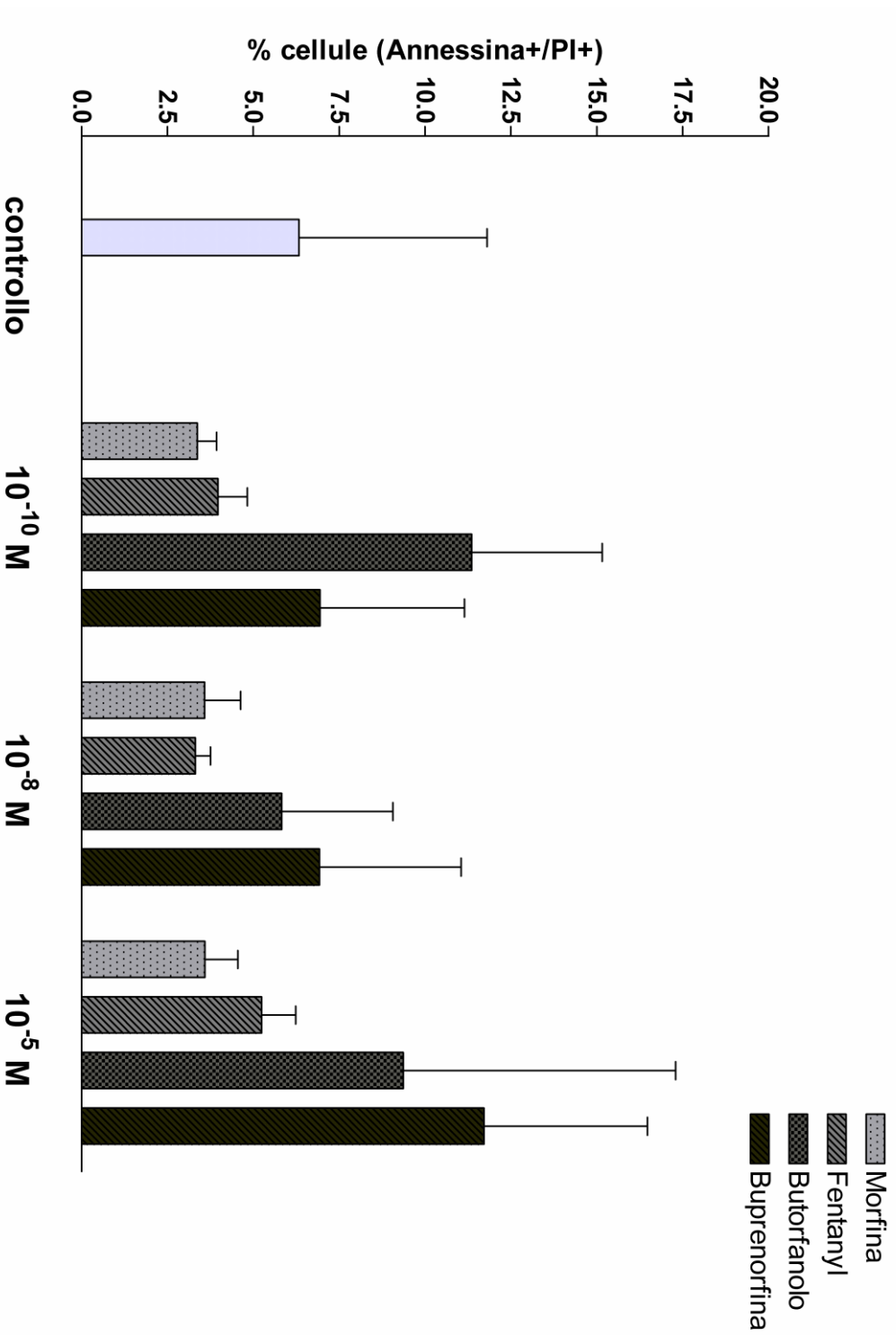


Grafico 7 % di cellule necrotiche (Annessina+/PI+) valutate mediante l'utilizzo di Annessina V/PI e con metodica citofluorimetrica, dopo 24 ore di esposizione a tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina. I dati sono espressi come media ± deviazione standard.

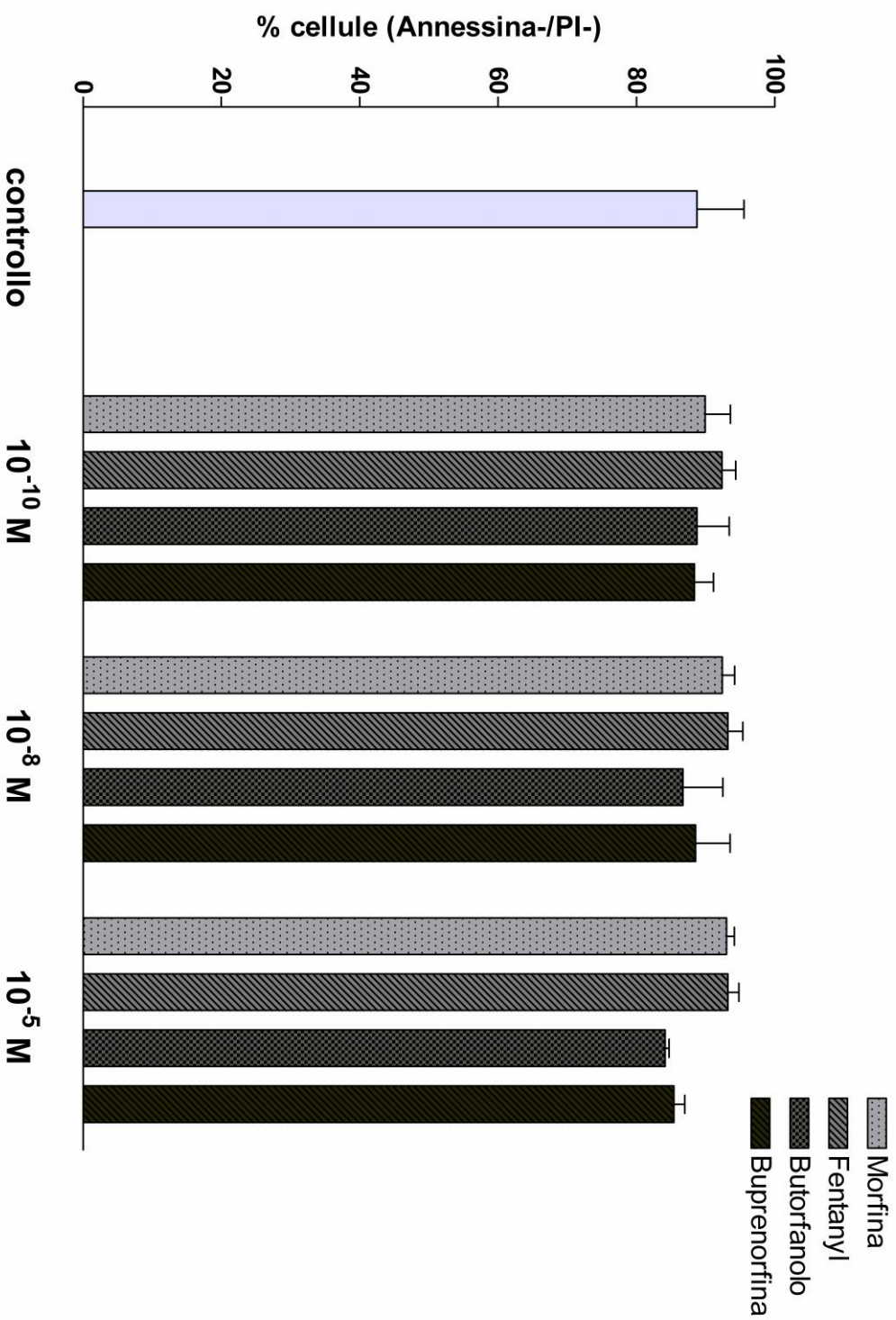


Grafico 8 % di cellule vitali (Annessina-/PI-) valutate mediante l'utilizzo di Annessina V/PI e con metodica citofluorimetrica, dopo 48 ore di esposizione a tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard.

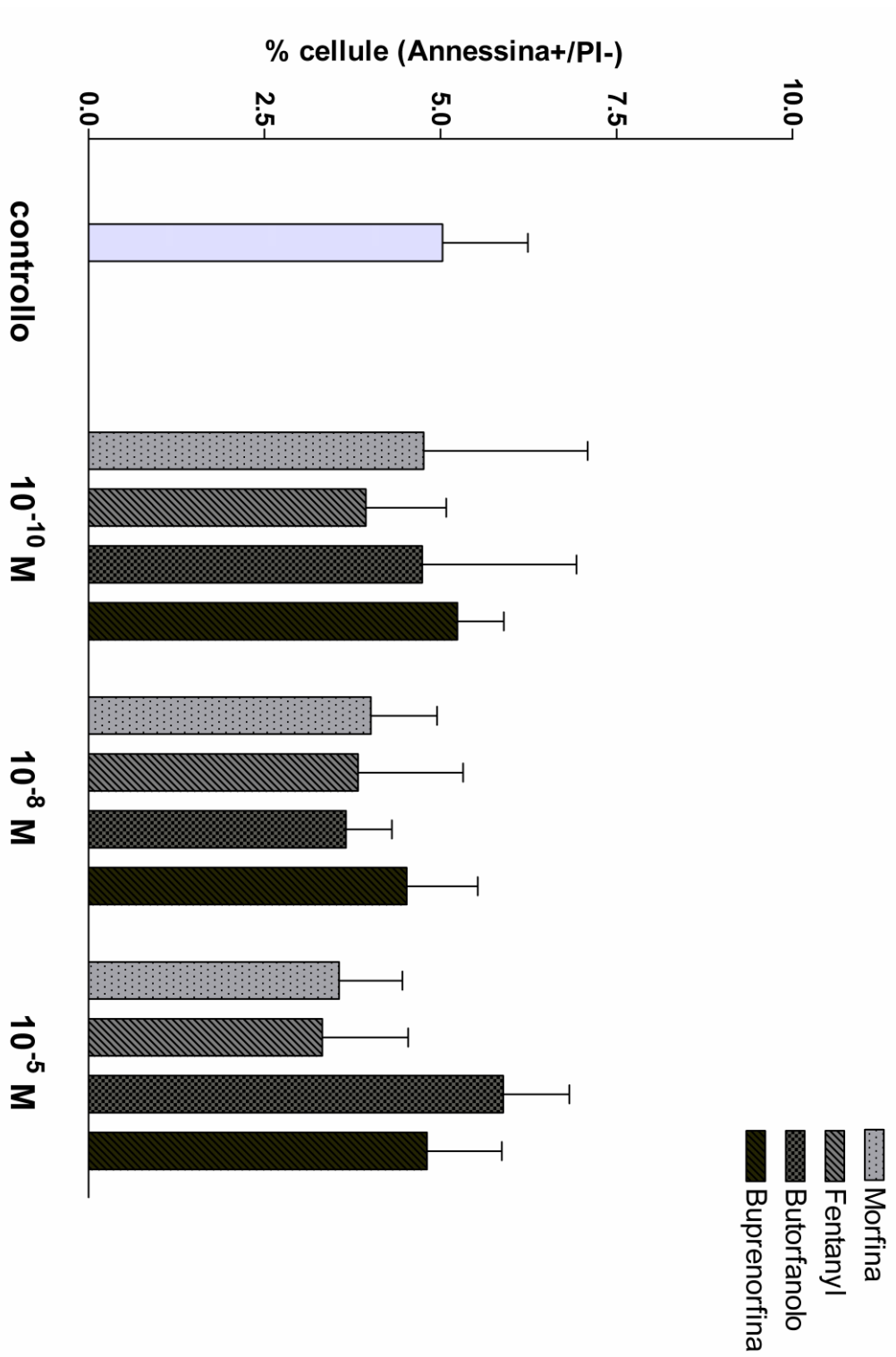


Grafico 9 % di cellule apoptotiche (Annessina+/PI-) valutate mediante l'utilizzo di Annessina V/PI e con metodica citofluorimetrica, dopo 48 ore di esposizione a tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina. I dati sono espressi come media ± deviazione standard.

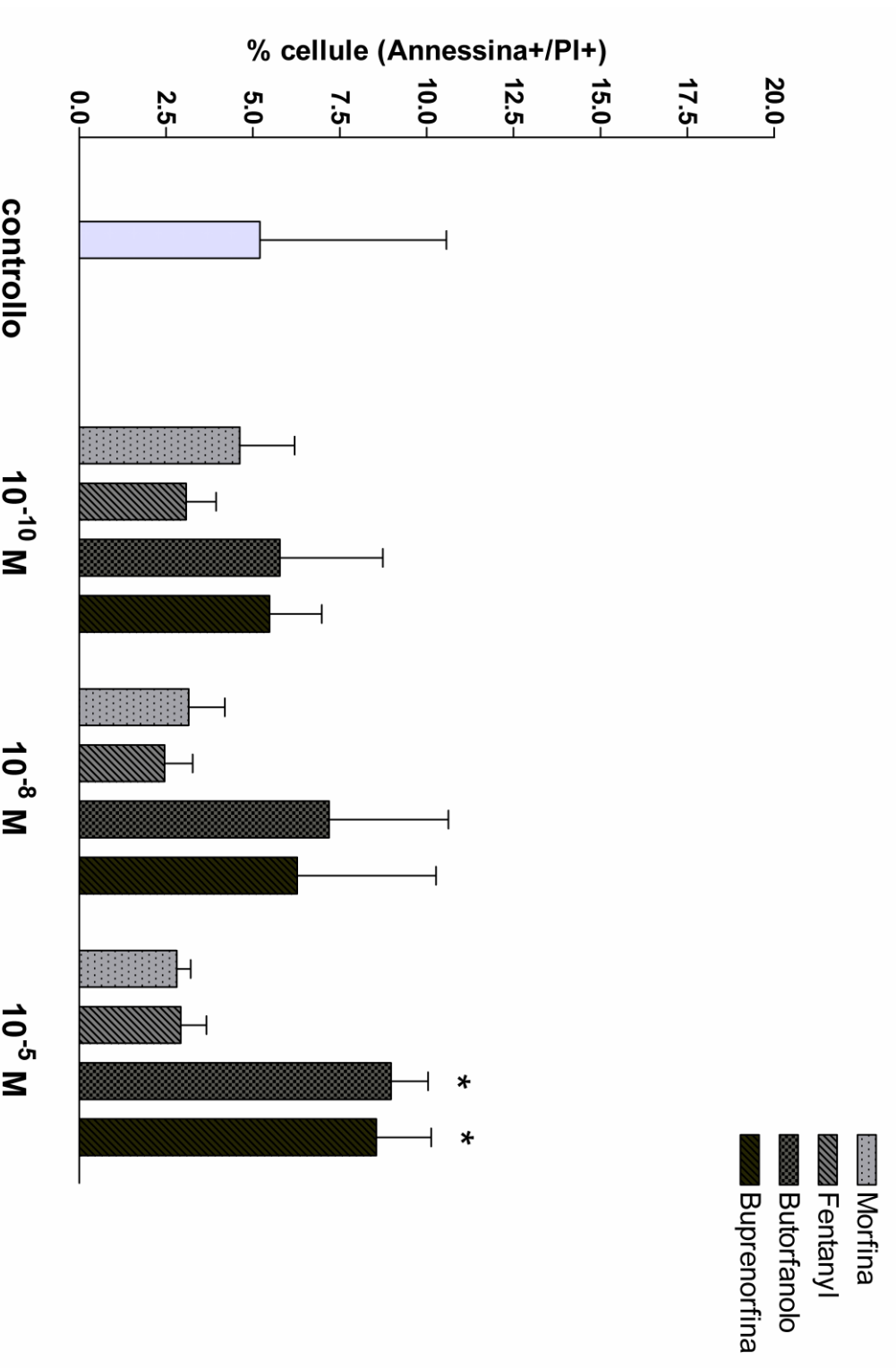


Grafico 10 % di cellule necrotiche (Annessina+/PI+) valutate mediante l'utilizzo di Annessina V/PI e con metodica citofluorimetrica, dopo 48 ore di esposizione a tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina. I dati sono espressi come media ± deviazione standard. * significatività statistica (p<0.05) rispetto al controllo

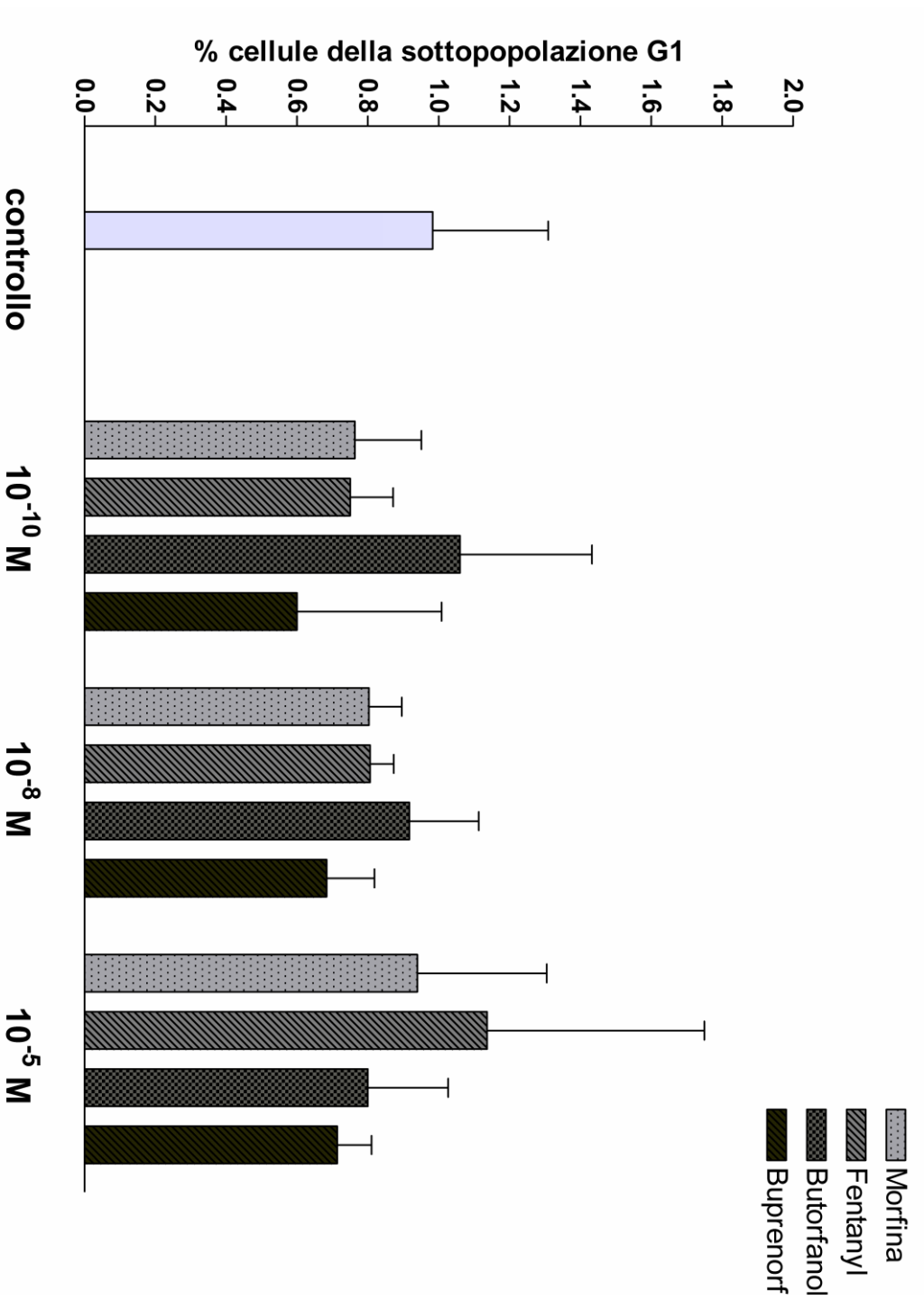


Grafico 11 % di cellule della sottopopolazione G1 studiata con metodica citofluorimetrica dopo colorazione con propidio ioduro, le cellule sono state incubate per 24 ore con tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard.

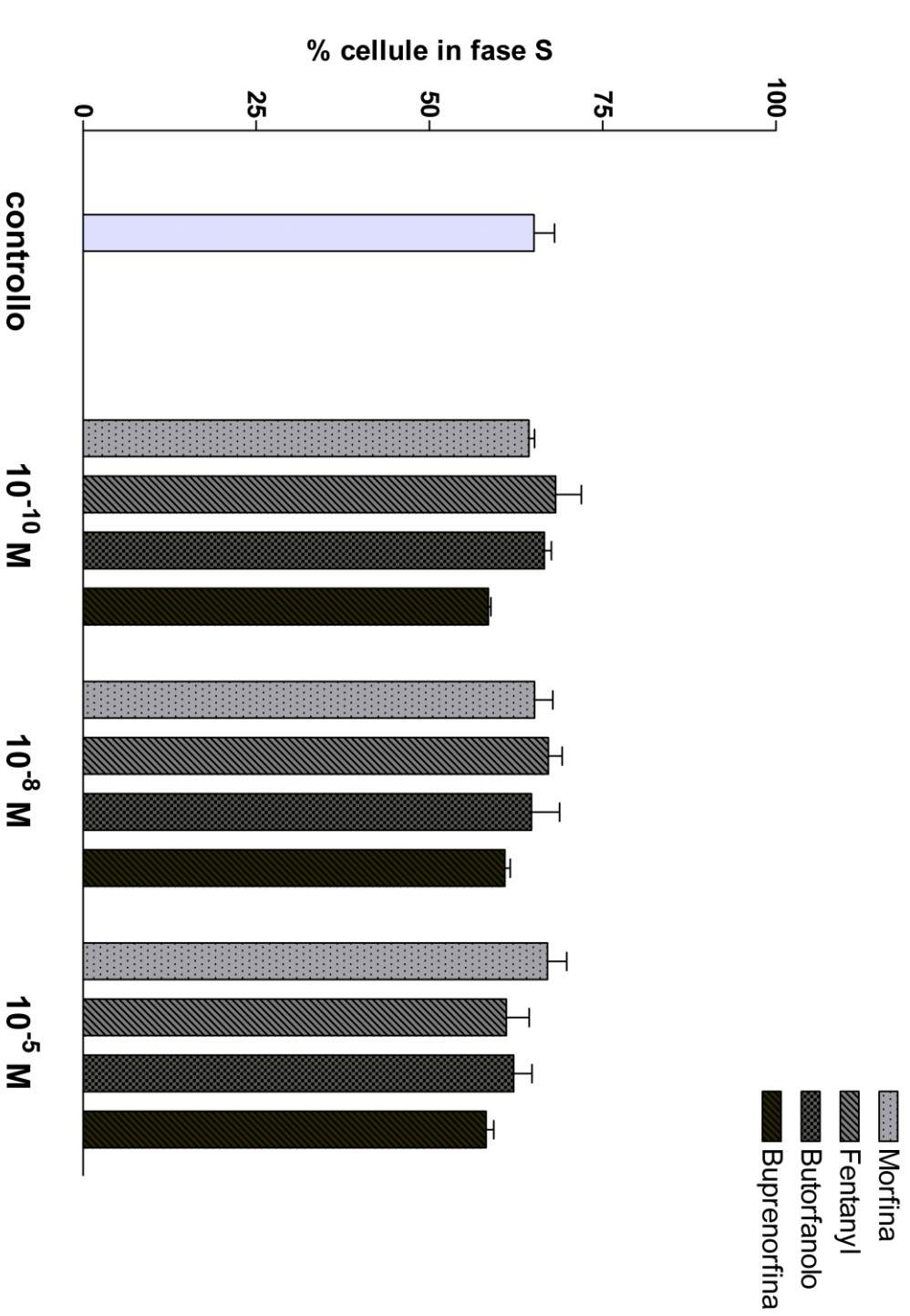


Grafico 12 % di cellule in fase S studiata con metodica citofluorimetrica dopo colorazione con propidio ioduro, le cellule sono state incubate per 24 ore con tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina. I dati sono espressi come media ± deviazione standard.

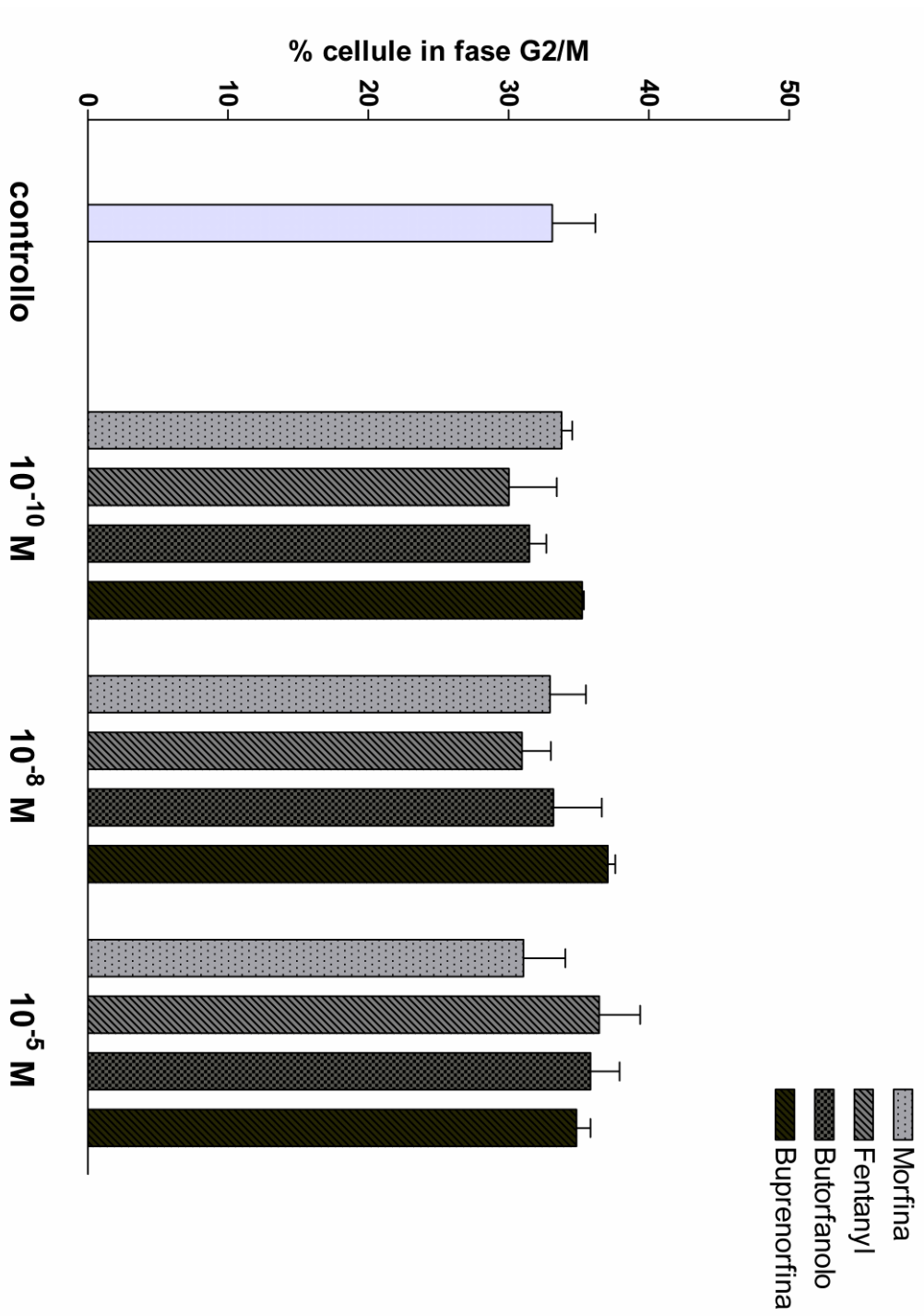


Grafico 13 % di cellule in fase G2/M studiata con metodica citofluorimetrica dopo colorazione con propidio ioduro, le cellule sono state incubate per 24 ore con tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina. I dati sono espressi come media ± deviazione standard. * significatività statistica (p<0.05) rispetto al controllo.

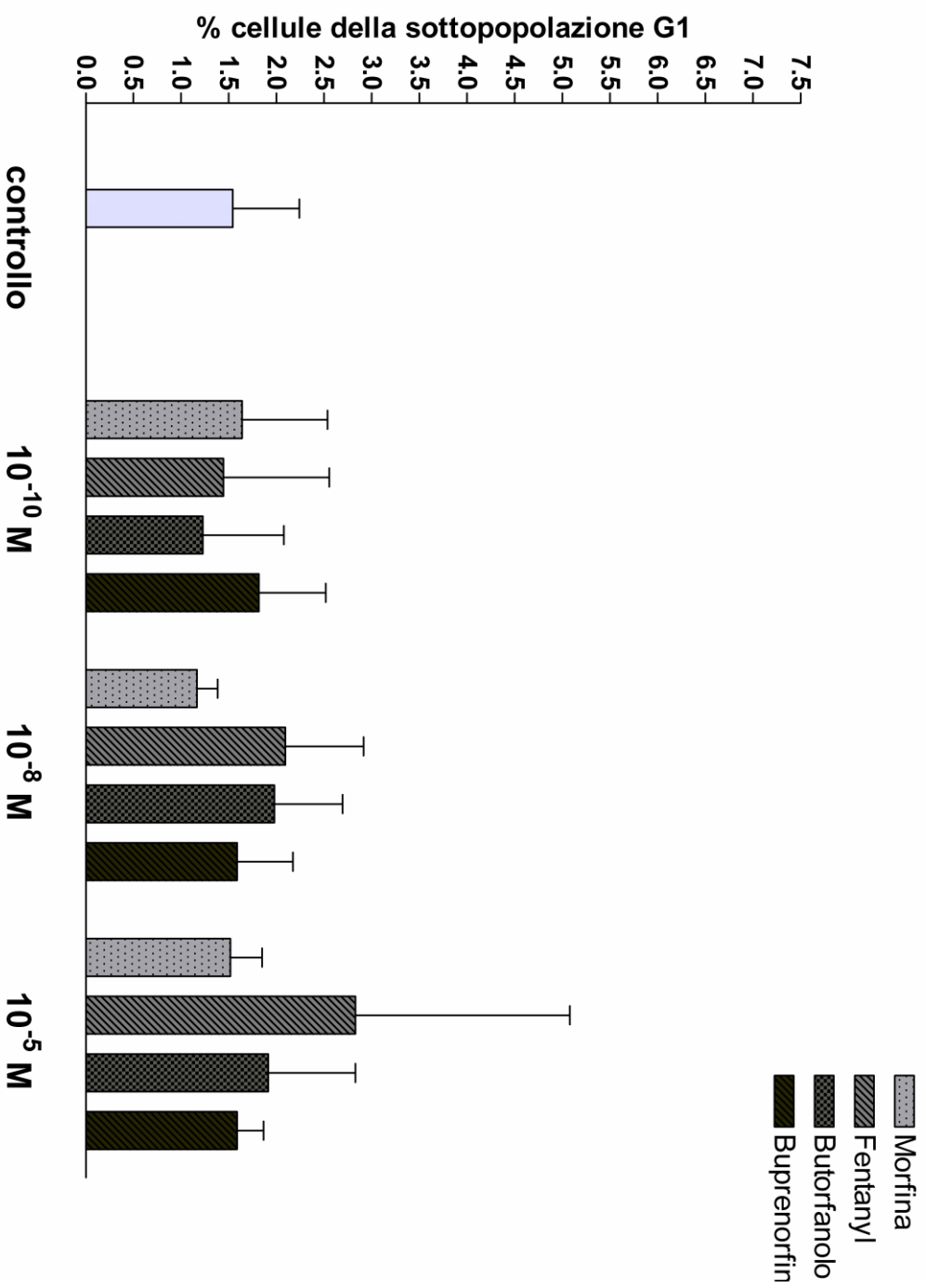


Grafico 14 % di cellule della sottopopolazione G1 studiata con metodica citofluorimetrica dopo colorazione con propidio ioduro, le cellule sono state incubate per 48 ore con tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard.

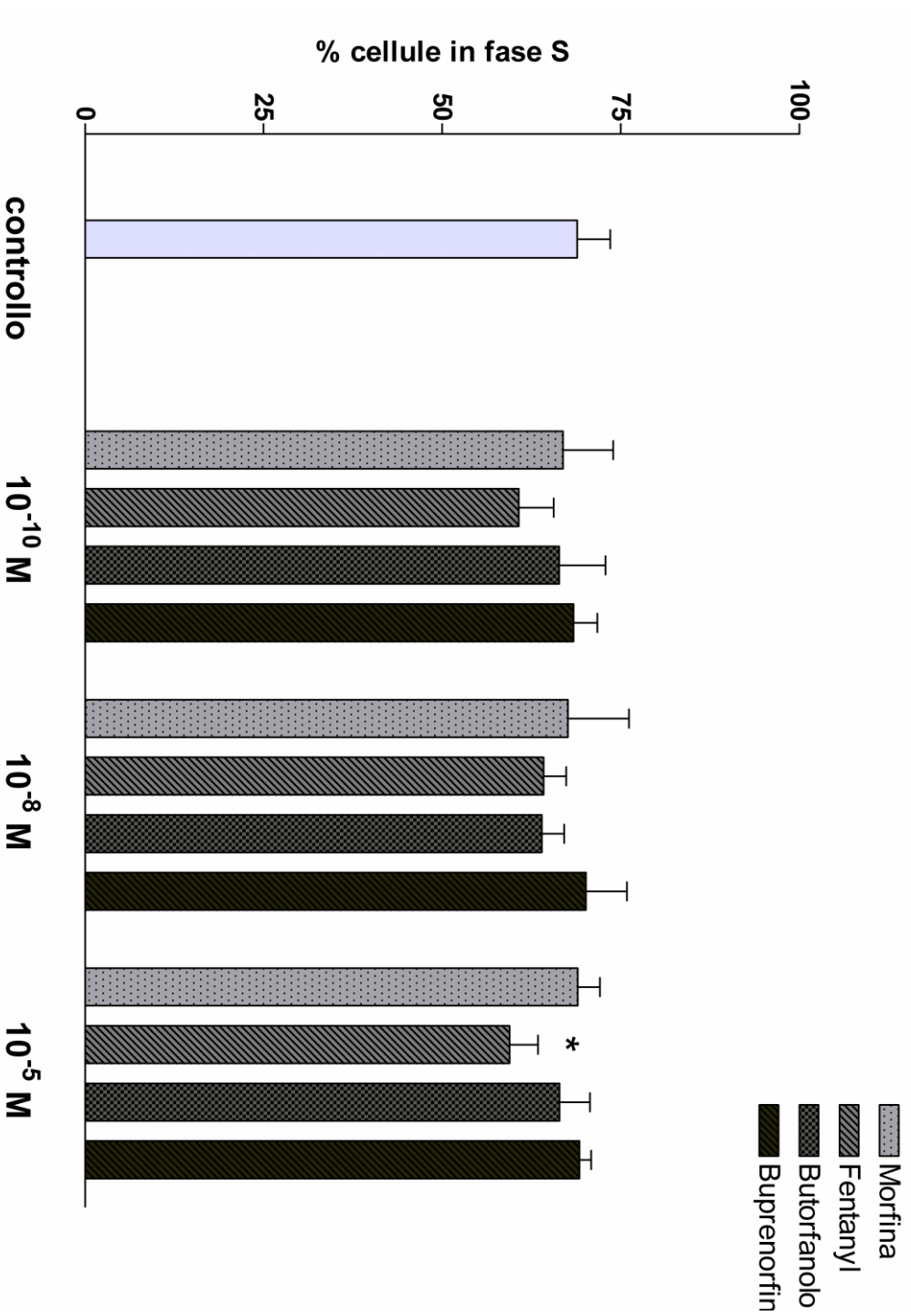


Grafico 15 % di cellule in fase S studiata con metodica citofluorimetrica dopo colorazione con propidio ioduro, le cellule sono state incubate per 48 ore con tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina. I dati sono espressi come media ± deviazione standard.

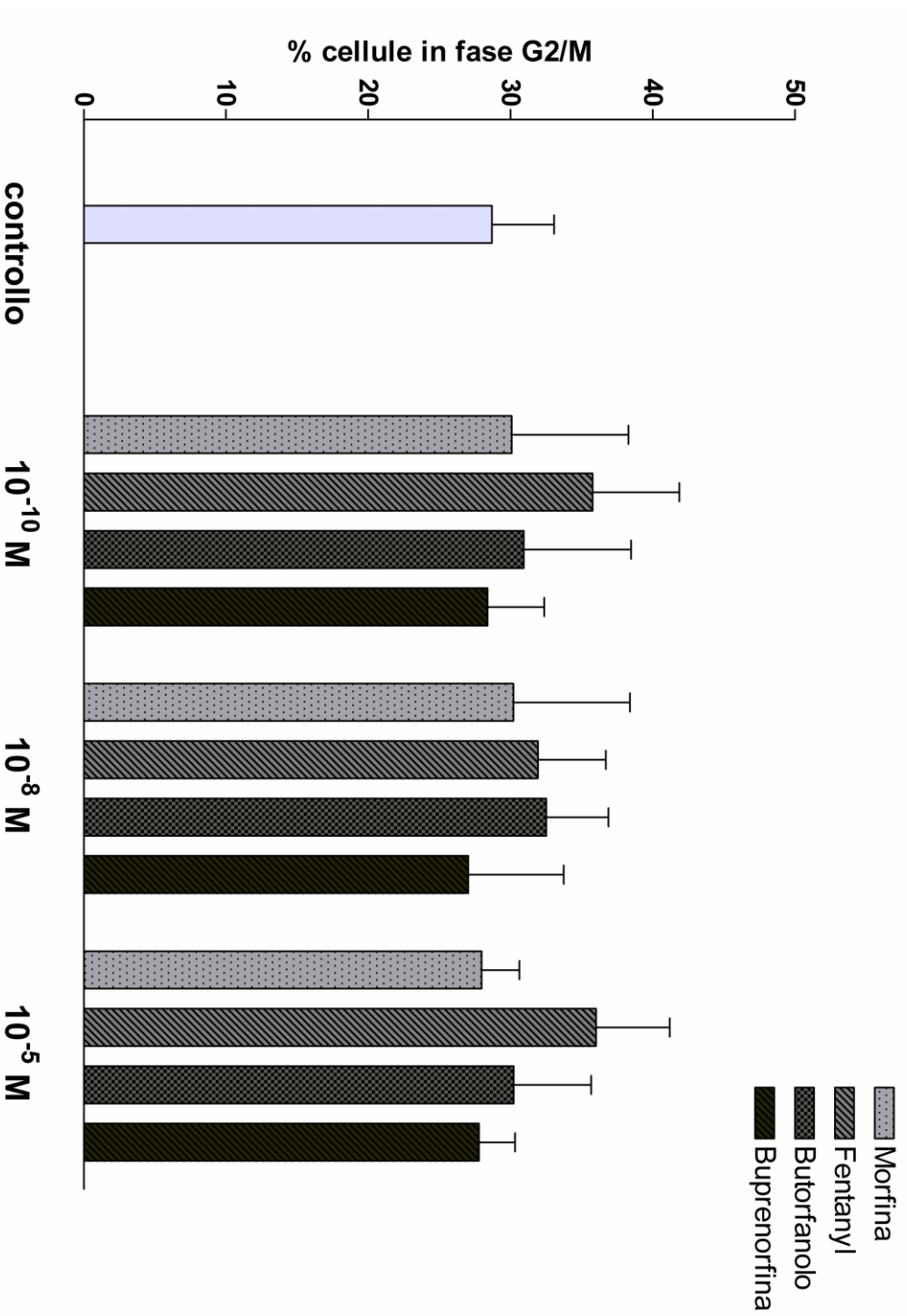


Grafico 16 % di cellule in fase G2/M studiata con metodica citofluorimetrica dopo colorazione con propidio ioduro, le cellule sono state incubate per 48 ore con tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina. I dati sono espressi come media ± deviazione standard.

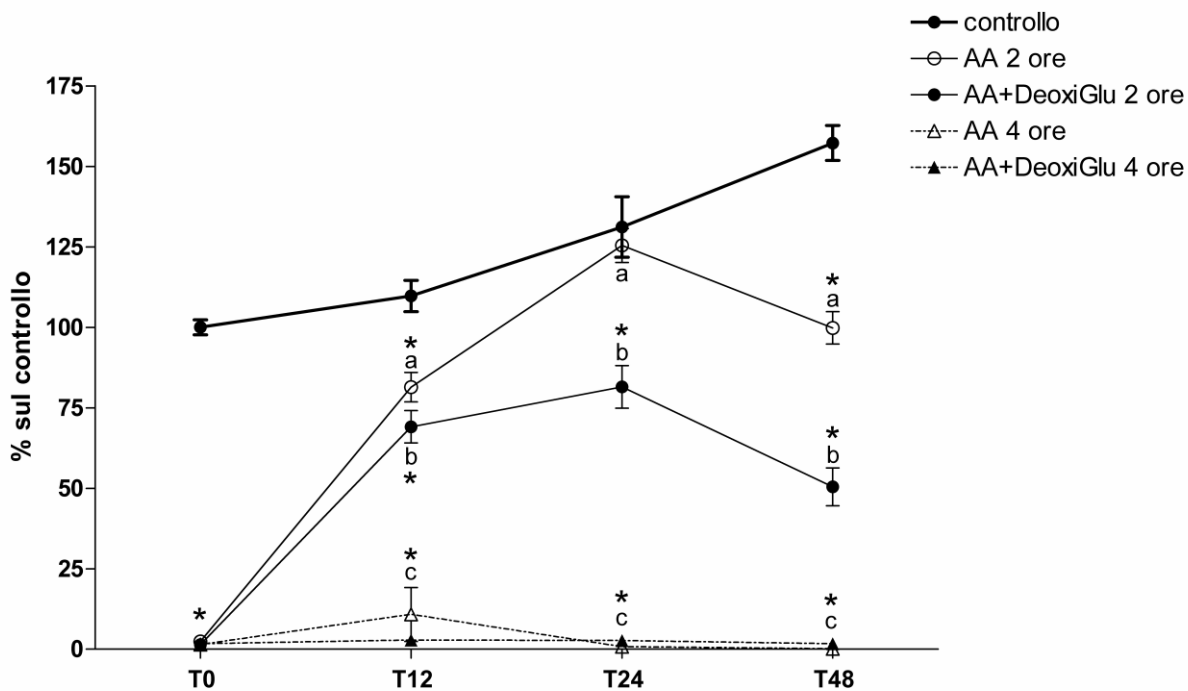


Grafico 17 Contenuto di ATP studiato con metodica a luminescenza dopo esposizione per 2 o 4 ore di differenti protocolli per diminuire il contenuto di ATP. Le cellule sono state trattate con 10 μM di antimicina A (AA) o con una soluzione di antimicina A e 2 nM di 2-Deossi-D-glucosio (DeoxiGlu) per un periodo di 2 o 4 ore per simulare un fenomeno ischemico. Completato il periodo di incubazione, alle cellule è stato aggiunto terreno di coltura completo. Il contenuto di ATP è stato valutato immediatamente dopo (T0) o a 12 (T12), 24 (T24) e 48 (T48) ore dopo il termine dell'ischemia. I valori sono espressi come Media \pm deviazione standard della percentuale sul controllo, cellule non trattate, al tempo T0. * differenza statistica rispetto al controllo ($p < 0.05$); le lettere indicano differenze statistiche tra i vari trattamenti per ogni tempo ($p < 0.05$)

Tabella 7 Effetto della morfina sul contenuto di ATP determinato con metodica a luminescenza normalizzato per il numero di cellule valutato con metodica MTS. Alle cellule è stata aggiunta la soluzione ischemizzante per 2 ore e a seconda del protocollo le cellule sono state precondizionate con l'aggiunta di una delle tre concentrazioni di farmaco 10^{-10} M, 10^{-8} M e 10^{-5} M e successivamente incubate con terreno contenente la corrispondente concentrazione di oppioide (P1) oppure non pretrattate e messe in contatto con il terreno contenente l'oppioide solo nella fase successiva all'ischemia (P2) od ancora solamente pretrattate e lasciate crescere, dopo ischemia, con terreno di coltura completo (P3). I valori sono espressi come Media \pm deviazione standard della percentuale sul controllo, cellule non trattate, al tempo T0. * differenza statistica rispetto al controllo ($p < 0.05$); § differenza statistica rispetto al controllo ($p < 0.05$); le lettere indicano differenze statistiche tra i vari trattamenti per ogni tempo ($p < 0.05$)

		T0	T12	T24
Controllo negativo		100.0 \pm 2.0	97.5 \pm 3.7	121.3 \pm 7.5
Controllo SI		12.9 \pm 9.8*	63.7 \pm 1.0*	68.9 \pm 9.6*
P1	10^{-10} M	21.5 \pm 2.9*	77.6 \pm 3.2*§	67.7 \pm 6.0*
	10^{-8} M	20.2 \pm 3.1*	72.0 \pm 3.5*	61.6 \pm 4.8*
	10^{-5} M	17.8 \pm 2.7*	78.4 \pm 2.8*§	61.5 \pm 6.7*
P2	10^{-10} M		74.5 \pm 0.7*§	70.3 \pm 9.2*
	10^{-8} M		68.9 \pm 1.9*	58.3 \pm 4.7*§
	10^{-5} M		68.3 \pm 3.9*	51.3 \pm 2.1*§
P3	10^{-10} M		72.8 \pm 2.0*	74.7 \pm 3.7*
	10^{-8} M		71.3 \pm 2.8*	61.0 \pm 4.2*
	10^{-5} M		64.0 \pm 2.1*	56.9 \pm 4.9*§

Tabella 8 Effetto del fentanyl sul contenuto di ATP determinato con metodica a luminescenza normalizzato per il numero di cellule valutato con metodica MTS. Per la descrizione dei simboli e delle abbreviazioni si rimanda alla didascalia della Tabella 7.

		T0	T12	T24
Controllo negativo		100.0 \pm 2.0	97.5 \pm 3.7	121.3 \pm 7.5
Controllo SI		12.9 \pm 9.8*	63.7 \pm 1.0*	68.9 \pm 9.6*
P1	10^{-10} M	21.4 \pm 2.5*	80.9 \pm 8.0*§	65.8 \pm 4.4*
	10^{-8} M	20.3 \pm 1.2*	99.7 \pm 3.8*§	65.5 \pm 4.8*
	10^{-5} M	16.2 \pm 2.0*	97.9 \pm 3.0*§	54.6 \pm 1.7*
P2	10^{-10} M		86.5 \pm 3.5*§	58.3 \pm 2.8*§
	10^{-8} M		89.1 \pm 5.0*§	59.3 \pm 3.8*
	10^{-5} M		91.8 \pm 3.7*§	60.0 \pm 2.4*
P3	10^{-10} M		80.2 \pm 4.6*§	66.5 \pm 8.0*
	10^{-8} M		70.3 \pm 5.1*§	60.2 \pm 7.1*
	10^{-5} M		75.6 \pm 2.5*§	56.6 \pm 4.3*§

Tabella 9 Effetto del butorfanolo sul contenuto di ATP determinato con metodica a luminescenza normalizzato per il numero di cellule valutato con metodica MTS. Per la descrizione dei simboli e delle abbreviazioni si rimanda alla didascalia della Tabella 7.

		T0	T12	T24
Controllo negativo		100.0 ± 2.0	97.5 ± 3.7	121.3 ± 7.5
Controllo SI		12.9 ± 9.8*	63.7 ± 1.0*	68.9 ± 9.6*
P1	10⁻¹⁰ M	6.6 ± 0.4*	75.0 ± 4.2*	67.8 ± 10.6*
	10⁻⁸ M	6.7 ± 0.5*	71.3 ± 3.0*	71.0 ± 9.3*
	10⁻⁵ M	5.6 ± 0.6*	59.1 ± 5.9*	67.7 ± 11.5*
P2	10⁻¹⁰ M		73.2 ± 9.1*	87.5 ± 14.3*
	10⁻⁸ M		63.7 ± 3.6*	78.2 ± 4.1*
	10⁻⁵ M		59.4 ± 4.3*	70.4 ± 8.2*
P3	10⁻¹⁰ M		69.8 ± 1.5*	57.7 ± 6.3*
	10⁻⁸ M		69.1 ± 2.2*	57.7 ± 4.2*
	10⁻⁵ M		69.8 ± 9.8*	59.9 ± 2.5*

Tabella 10 Effetto della buprenorfina sul contenuto di ATP determinato con metodica a luminescenza normalizzato per il numero di cellule valutato con metodica MTS. Per la descrizione dei simboli e delle abbreviazioni si rimanda alla didascalia della Tabella 7.

		T0	T12	T24
Controllo negativo		100.0 ± 2.0	97.5 ± 3.7	121.3 ± 7.5
Controllo SI		12.9 ± 9.8*	63.7 ± 1.0*	68.9 ± 9.6*
P1	10⁻¹⁰ M	7.2 ± 0.3*	63.0 ± 5.4*	62.2 ± 6.0*
	10⁻⁸ M	7.0 ± 0.3*	56.7 ± 4.0*	59.0 ± 3.7*
	10⁻⁵ M	9.0 ± 0.4*	61.9 ± 1.9*	65.6 ± 6.2*
P2	10⁻¹⁰ M		65.8 ± 4.1*	64.6 ± 6.2*
	10⁻⁸ M		64.5 ± 3.7*	69.5 ± 8.5*
	10⁻⁵ M		65.3 ± 4.0*	74.6 ± 2.2*
P3	10⁻¹⁰ M		65.3 ± 4.0*§	77.0 ± 8.4*
	10⁻⁸ M		67.2 ± 1.5*	69.9 ± 5.1*
	10⁻⁵ M		66.3 ± 2.1*	68.1 ± 2.8*

Tabella 11 Valutazione dell'effetto della morfina sull'attività delle caspasi -3 e -7 determinata con metodica fluorimetrico normalizzato per il numero di cellule valutato con la metodica CellTiter Blu[®]. Alle cellule è stata aggiunta la soluzione ischemizzante (SI) per 2 ore e a seconda del protocollo le cellule sono state precondizionate con l'aggiunta di una delle tre concentrazioni di farmaco 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵M e successivamente incubate con terreno contenente la corrispondente concentrazione di oppioide (P1) oppure non pretrattate e messe in contatto con il terreno trattato solo nella fase successiva all'ischemia (P2) od ancora solamente pretrattate e lasciate dopo ischemia con terreno di coltura (P3). I valori sono espressi come Media ± deviazione standard della percentuale sul controllo, cellule non trattate, al tempo T0. * differenza statistica rispetto al controllo ($p<0.05$); § differenza statistica rispetto al controllo ($p<0.05$); le lettere indicano differenze statistiche tra i vari trattamenti per ogni tempo ($p<0.05$)

	T0	T12	T24
Controllo negativo	100.0 ± 6.7	100.0 ± 10.0	100.0 ± 14.9
Controllo SI	265.0 ± 16.2*	137.2 ± 9.1*	115.7 ± 10.6
P1	10 ⁻¹⁰ M	153.2 ± 34.9*§	124.4 ± 21.7
	10 ⁻⁸ M	134.6 ± 31.7*§	109.3 ± 5.5
	10 ⁻⁵ M	152.0 ± 30.5*§	126.4 ± 20.1
P2	10 ⁻¹⁰ M	126.8 ± 10.0*§	130.9 ± 8.4*§
	10 ⁻⁸ M	126.7 ± 3.2*§	118.6 ± 4.8
	10 ⁻⁵ M	106.2 ± 5.5§	109.8 ± 7.1
P3	10 ⁻¹⁰ M	118.1 ± 9.7§	122.4 ± 6.8
	10 ⁻⁸ M	126.9 ± 6.7*§	126.8 ± 16.1*
	10 ⁻⁵ M	116.0 ± 9.1§	105.0 ± 9.8

Tabella 12 Valutazione dell'effetto del fentanyl sull'attività delle caspasi -3 e -7 determinata con metodica fluorimetrico normalizzato per il numero di cellule valutato con la metodica fluoroscopica CellTiter Blu[®]. Per la descrizione dei simboli e delle abbreviazioni si rimanda alla didascalia della Tabella 7.

	T0	T12	T24
Controllo negativo	100.0 ± 6.7	100.0 ± 10.0	100.0 ± 14.9
Controllo SI	265.0 ± 16.2*	137.2 ± 9.1*	115.7 ± 10.6
P1	10 ⁻¹⁰ M	146.1 ± 24.2*§	110.7 ± 6.6
	10 ⁻⁸ M	129.6 ± 17.1§	127.6 ± 15.8
	10 ⁻⁵ M	157.7 ± 26.2*§	123.7 ± 3.6
P2	10 ⁻¹⁰ M	100.8 ± 12.6§	113.5 ± 9.5
	10 ⁻⁸ M	107.9 ± 10.1§	120.3 ± 10.5*
	10 ⁻⁵ M	91.0 ± 12.0§	120.2 ± 17.4*
P3	10 ⁻¹⁰ M	102.5 ± 8.0§	108.8 ± 6.7
	10 ⁻⁸ M	108.6 ± 17.6§	113.7 ± 8.0
	10 ⁻⁵ M	91.2 ± 13.9*§	119.0 ± 1.2

Tabella 13 Valutazione dell'effetto del butorfanolo sull'attività delle caspasi -3 e -7 determinata con metodica fluorimetrico normalizzato per il numero di cellule valutato con la metodica fluoroscopica CellTiter Blu[®]. Per la descrizione dei simboli e delle abbreviazioni si rimanda alla didascalia della Tabella 7.

		T0	T12	T24
Controllo negativo		100.0 ± 6.7	100.0 ± 10.0	100.0 ± 14.9
Controllo SI		265.0 ± 16.2*	137.2 ± 9.1*	115.7 ± 10.6
P1	10⁻¹⁰ M	261.4 ± 10.8*	148.8 ± 13.7*	127.1 ± 6.5*
	10⁻⁸ M	264.7 ± 12.8*	132.6 ± 3.2*	141.8 ± 9.7*§
	10⁻⁵ M	258.8 ± 8.4*	121.6 ± 10.5*	134.2 ± 20.3*§
P2	10⁻¹⁰ M		145.7 ± 7.8*	127.3 ± 23.7*
	10⁻⁸ M		142.9 ± 15.2*	128.2 ± 13.2*
	10⁻⁵ M		133.8 ± 4.0*	129.3 ± 7.1*
P3	10⁻¹⁰ M		129.6 ± 6.6*	140.9 ± 9.0*§
	10⁻⁸ M		128.2 ± 9.4*	125.0 ± 13.7*
	10⁻⁵ M		122.5 ± 3.9*§	123.0 ± 6.9*

Tabella 14 Valutazione dell'effetto della buprenorfina sull'attività delle caspasi -3 e -7 determinata con metodica fluorimetrico normalizzato per il numero di cellule valutato con la metodica fluoroscopica CellTiter Blu[®]. Per la descrizione dei simboli e delle abbreviazioni si rimanda alla didascalia della Tabella 7.

		T0	T12	T24
Controllo negativo		100.0 ± 6.7	100.0 ± 10.0	100.0 ± 14.9
Controllo SI		265.0 ± 16.2*	137.2 ± 9.1*	115.7 ± 10.6
P1	10⁻¹⁰ M	279.2 ± 9.2*	131.5 ± 3.3*	111.4 ± 5.6
	10⁻⁸ M	275.8 ± 10.7*	130.7 ± 14.0*	113.2 ± 6.4
	10⁻⁵ M	246.2 ± 42.1*	113.2 ± 16.1	104.6 ± 3.5
P2	10⁻¹⁰ M		135.4 ± 12.2*	114.8 ± 5.3*
	10⁻⁸ M		130.1 ± 4.0*	118.0 ± 7.7*
	10⁻⁵ M		129.6 ± 8.0*	106.4 ± 7.1
P3	10⁻¹⁰ M		123.8 ± 4.8*	95.5 ± 29.6
	10⁻⁸ M		120.1 ± 6.4*	92.8 ± 8.6*
	10⁻⁵ M		121.4 ± 10.2*	99.7 ± 2.2

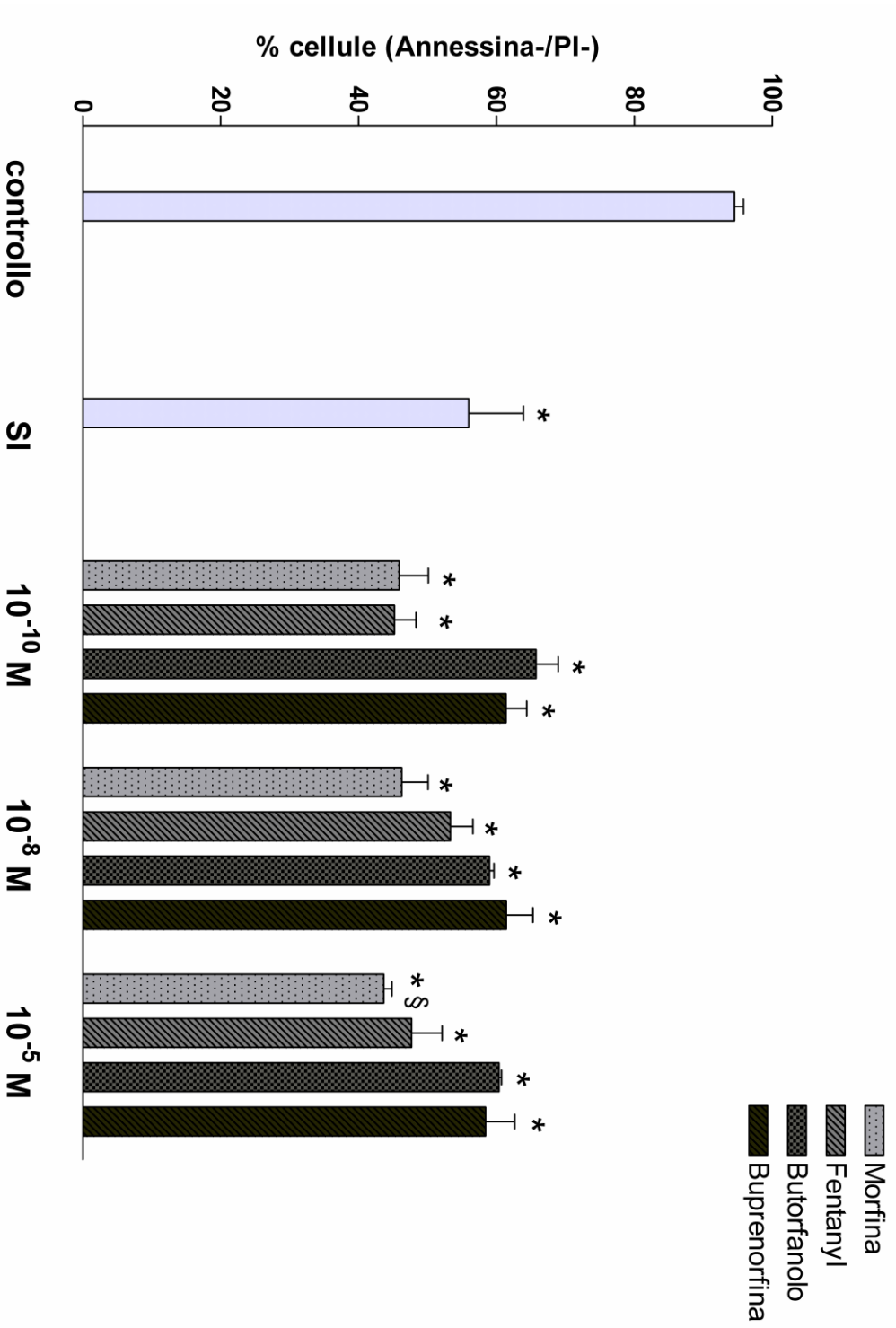


Grafico 42 % di cellule vitali (Annessina-/PI-) valutate mediante l'utilizzo di Annessina V/PI e con metodica fluorocitometrica, dopo 2 ore di precondizionamento con tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina a tre concentrazioni. I dati sono espressi come media ± deviazione standard. * significatività statistica (p<0.05) rispetto al controllo

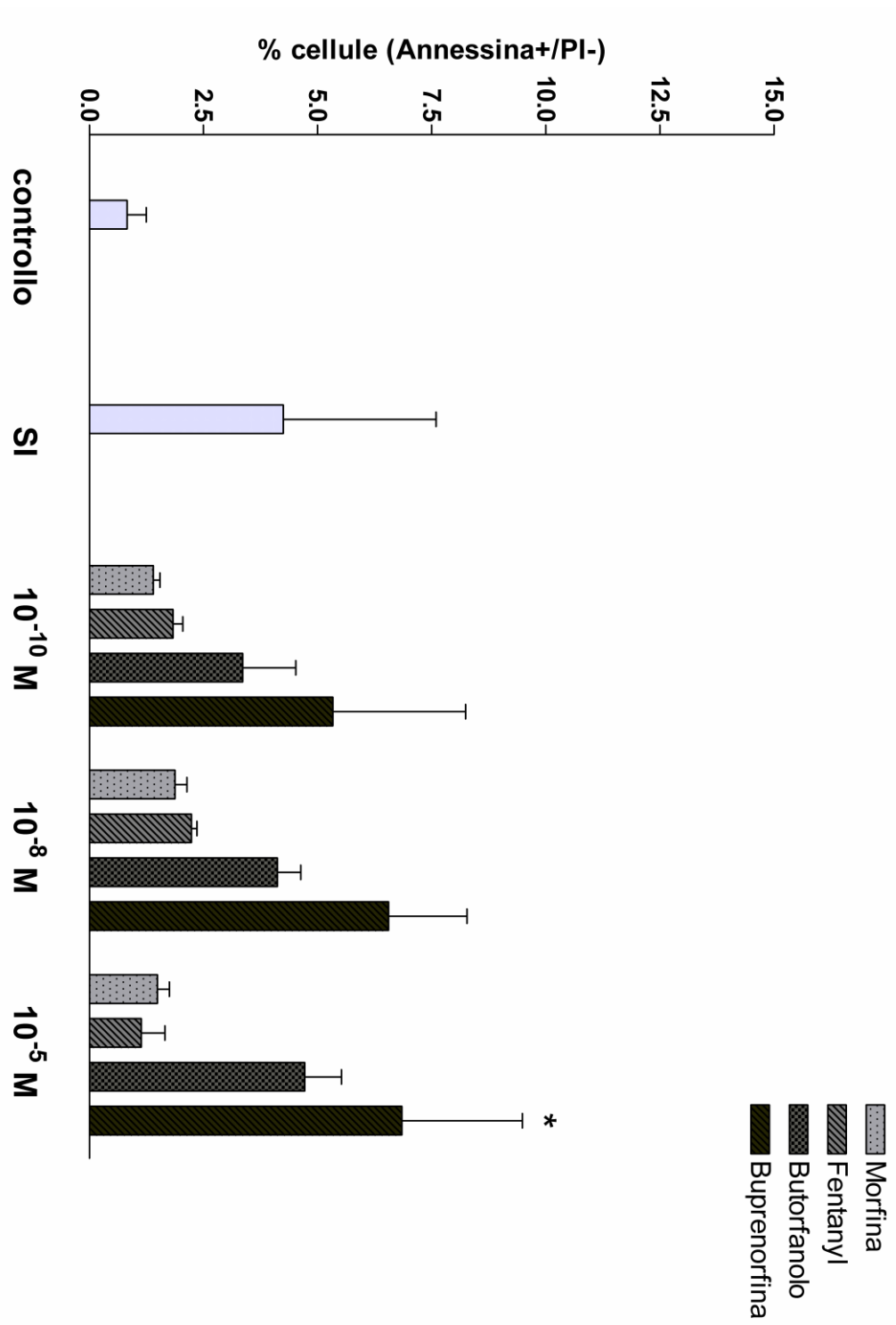


Grafico 43 % di cellule apoptotiche (Annessina+/PI-) valutate mediante l'utilizzo di Annessina V/PI e con metodica fluorocitometrica, dopo 2 ore di precondizionamento con tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina a tre concentrazioni. I dati sono espressi come media ± deviazione standard. * significatività statistica (p<0.05) rispetto al controllo

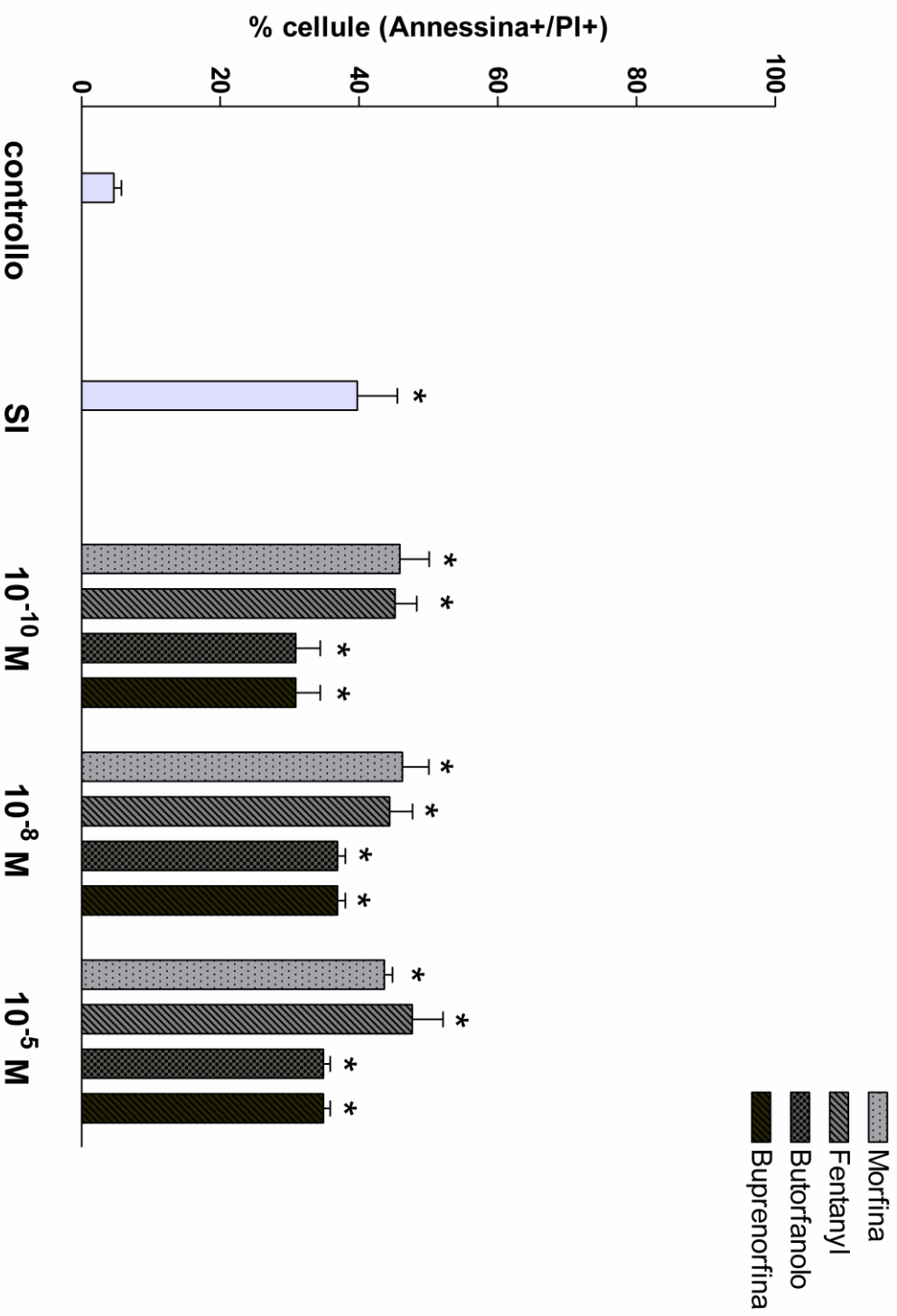


Grafico 44 % di cellule necrotiche (Annexina+/PI+) valutate mediante l'utilizzo di Annexina V/PI e con metodica fluorocitometrica, dopo 2 ore di precondizionamento con tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina a tre concentrazioni. I dati sono espressi come media ± deviazione standard. * significatività statistica (p<0,05) rispetto al controllo

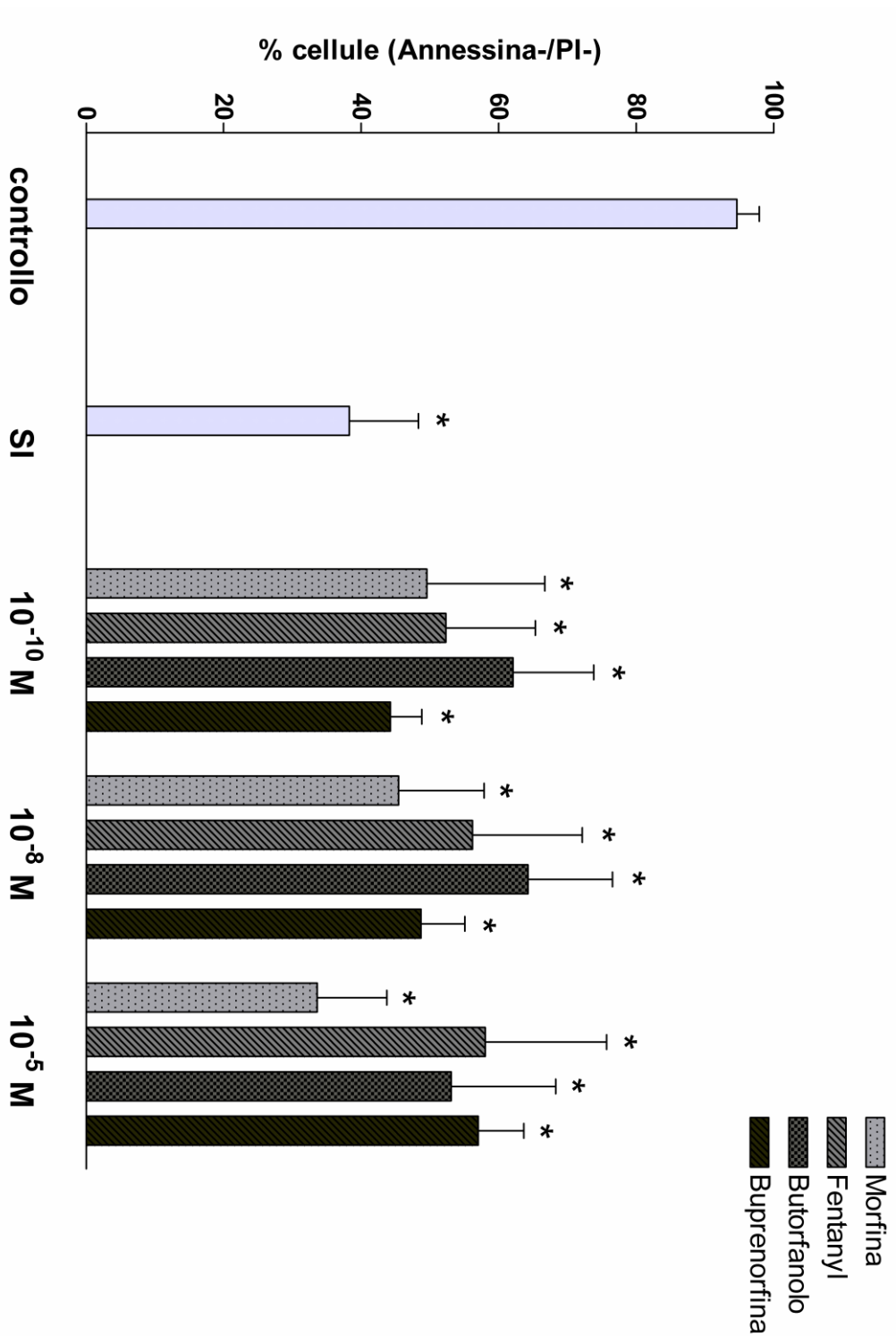


Grafico 45 % di cellule vitali (Annessina-/PI-) valutate mediante l'utilizzo di Annessina V/PI e con metodica fluorocitometrica, dopo 2 ore di precondizionamento con tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina e incubazione per 12 ore con le stesse dosi di oppioidi . I dati sono espressi come media ± deviazione standard. * significatività statistica (p<0.05) rispetto al controllo

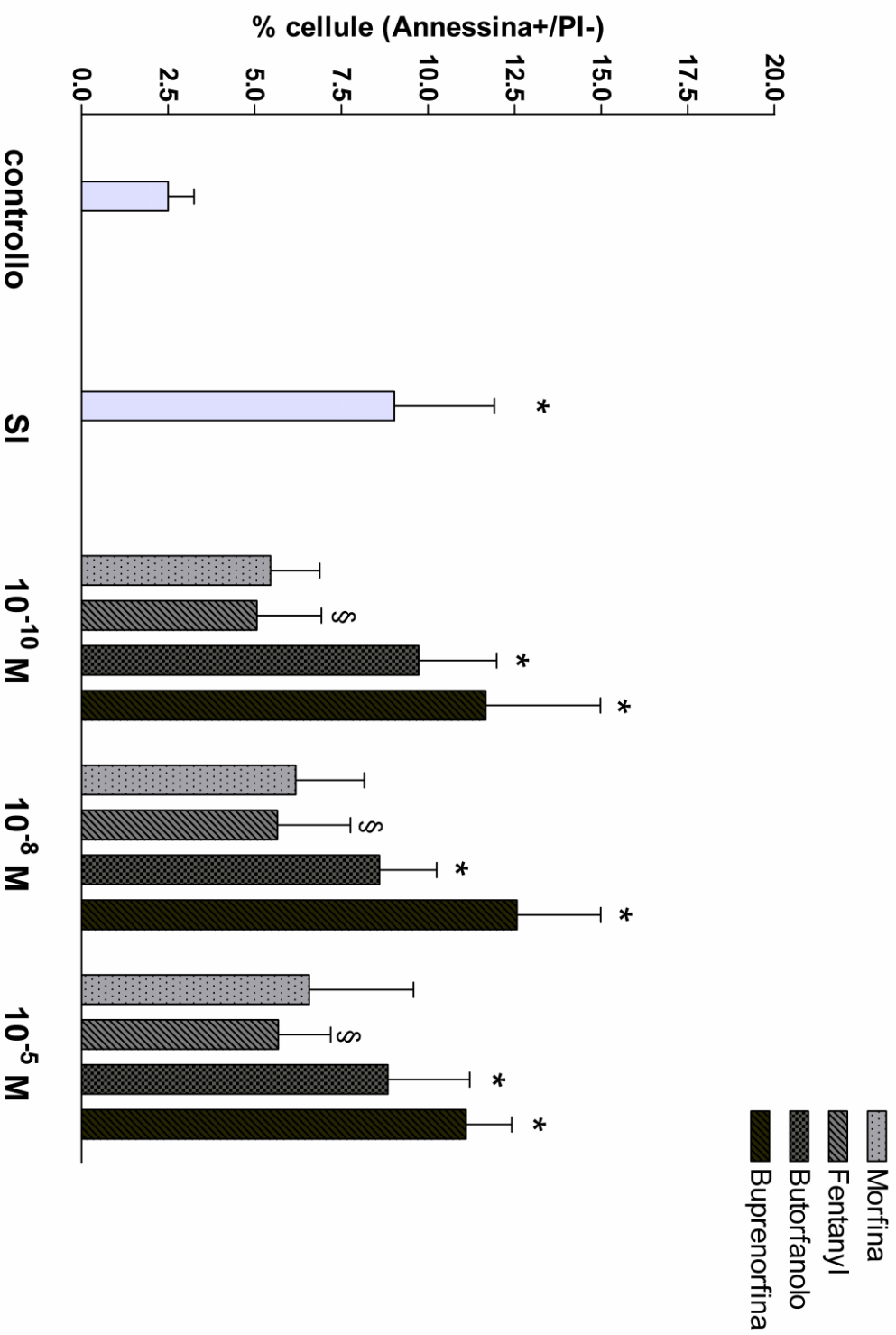


Grafico 46 % di cellule apoptotiche (Annessina+/PI-) valutate mediante l'utilizzo di Annessina V/PI e con metodica fluorocitometrica, dopo 2 ore di precondizionamento con tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina e incubazione per 12 ore con le stesse dosi di oppioidi. I dati sono espressi come media ± deviazione standard. * significatività statistica (p<0,05) rispetto al controllo; § differenze statistiche tra il controllo positivo e le cellule

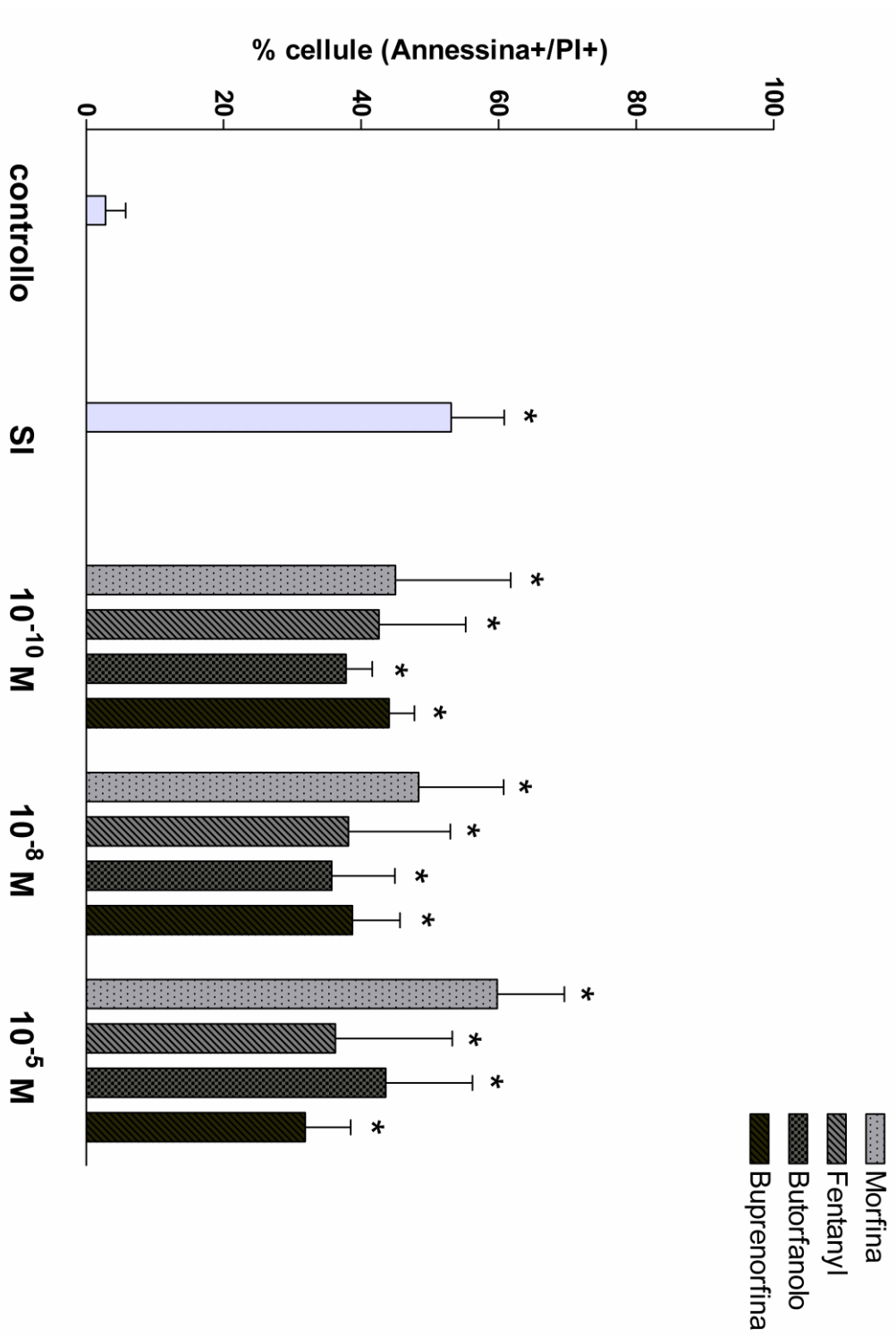


Grafico 47 % di cellule necrotiche (Annessina+/PI+) valutate mediante l'utilizzo di Annessina V/PI e con metodica fluorocitometrica, dopo 2 ore di precondizionamento con tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina e incubazione per 12 ore con le stesse dosi di oppioidi . I dati sono espressi come media ± deviazione standard. * significatività statistica (p<0.05) rispetto al controllo.

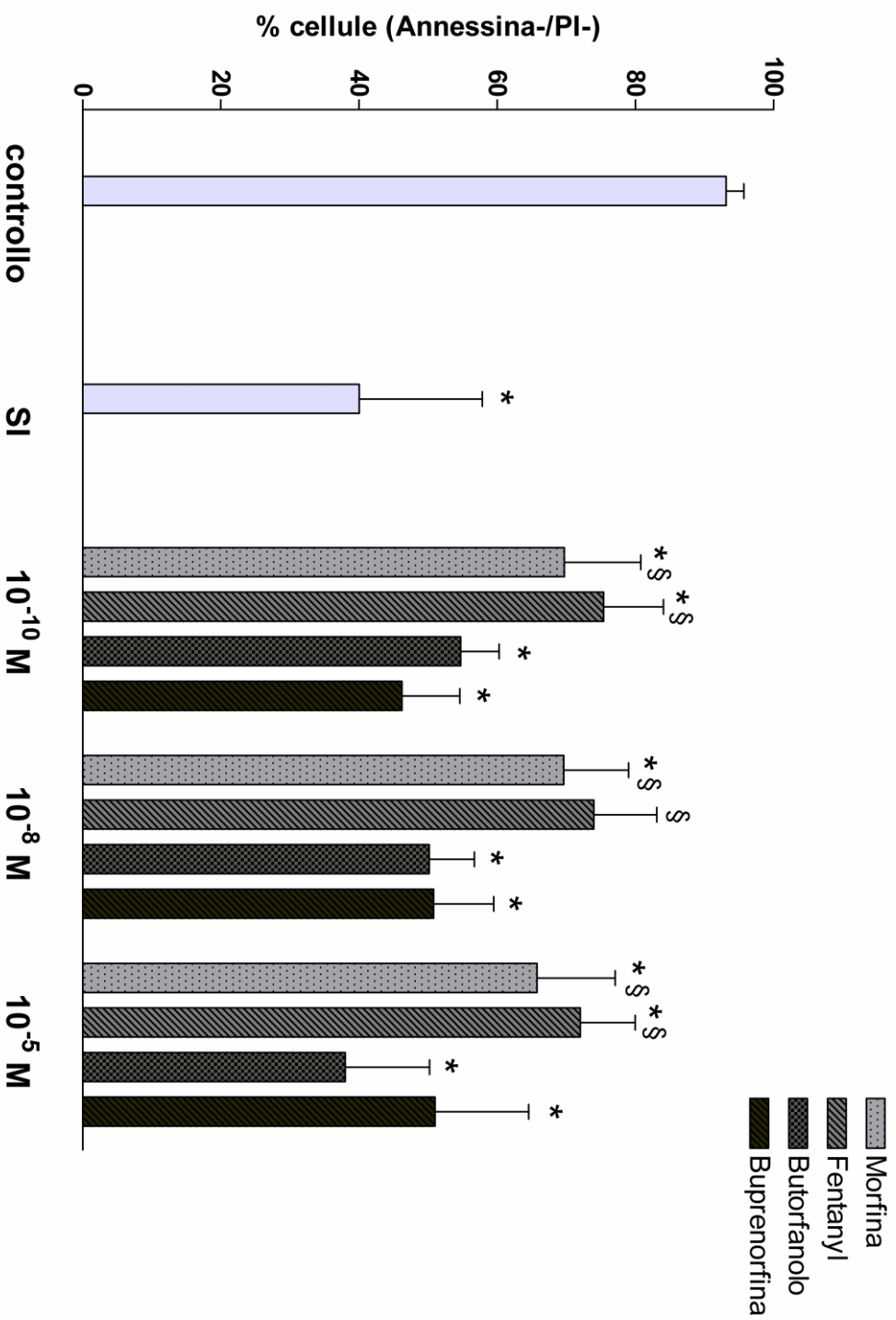


Grafico 48 % di cellule vitali (Annessina-/PI-) valutate mediante l'utilizzo di Annessina V/PI e con metodica fluorocitometrica, dopo 2 ore di precondizionamento con tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina e incubazione per 12 ore con le stesse dosi di oppioidi. I dati sono espressi come media ± deviazione standard. * significatività statistica (p<0.05) rispetto al controllo; § differenze statistiche tra il controllo positivo e le cellule trattate con il farmaco.

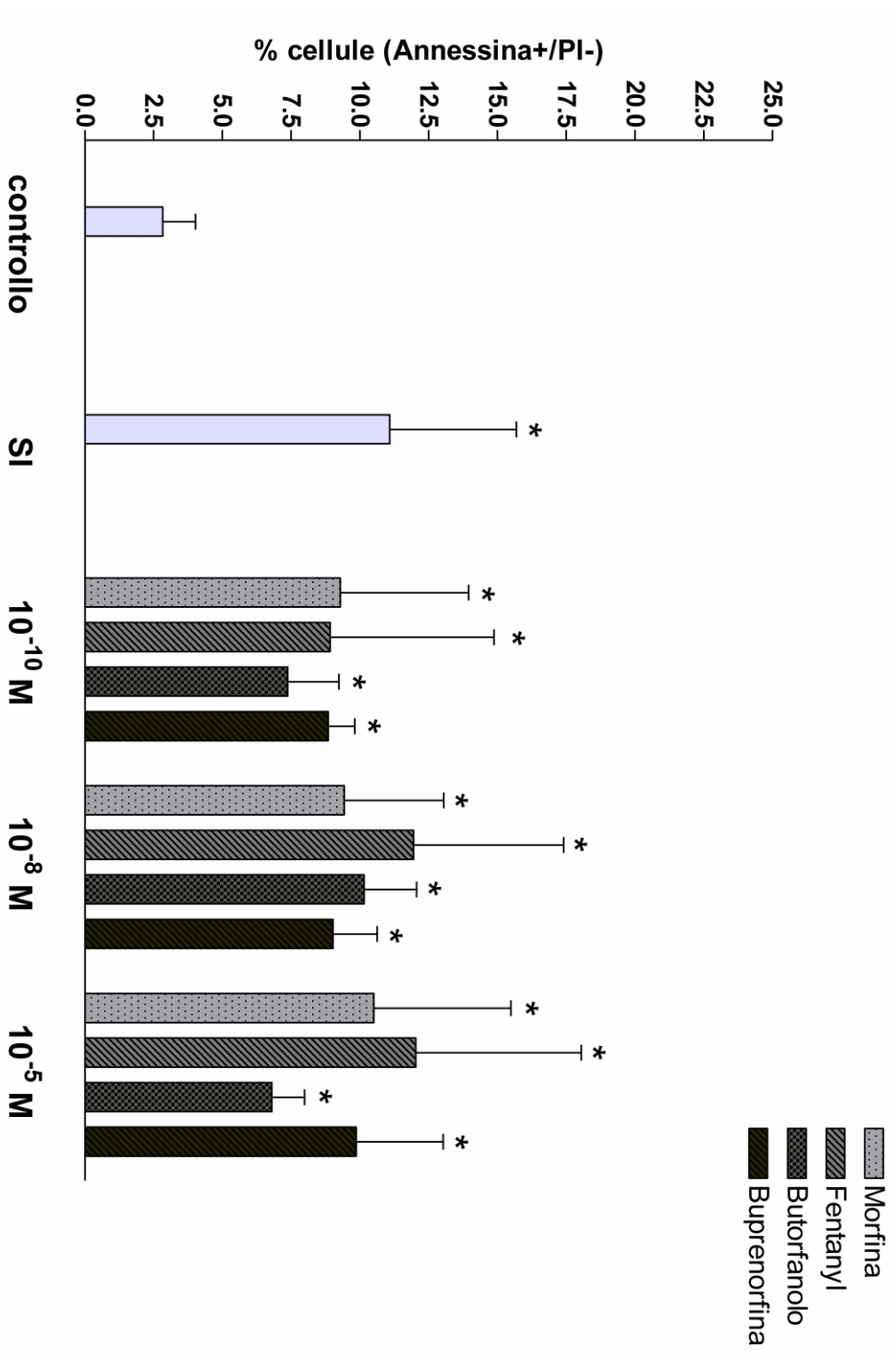


Grafico 49 % di cellule apoptotiche (Annexina+/PI+) valutate mediante l'utilizzo di Annexina V/PI e con metodica fluorocitometrica, dopo 2 ore di preconditionamento con tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina e incubazione per 24 ore con le stesse dosi di oppioidi . I dati sono espressi come media ± deviazione standard. * significatività statistica (p<0.05) rispetto al controllo.

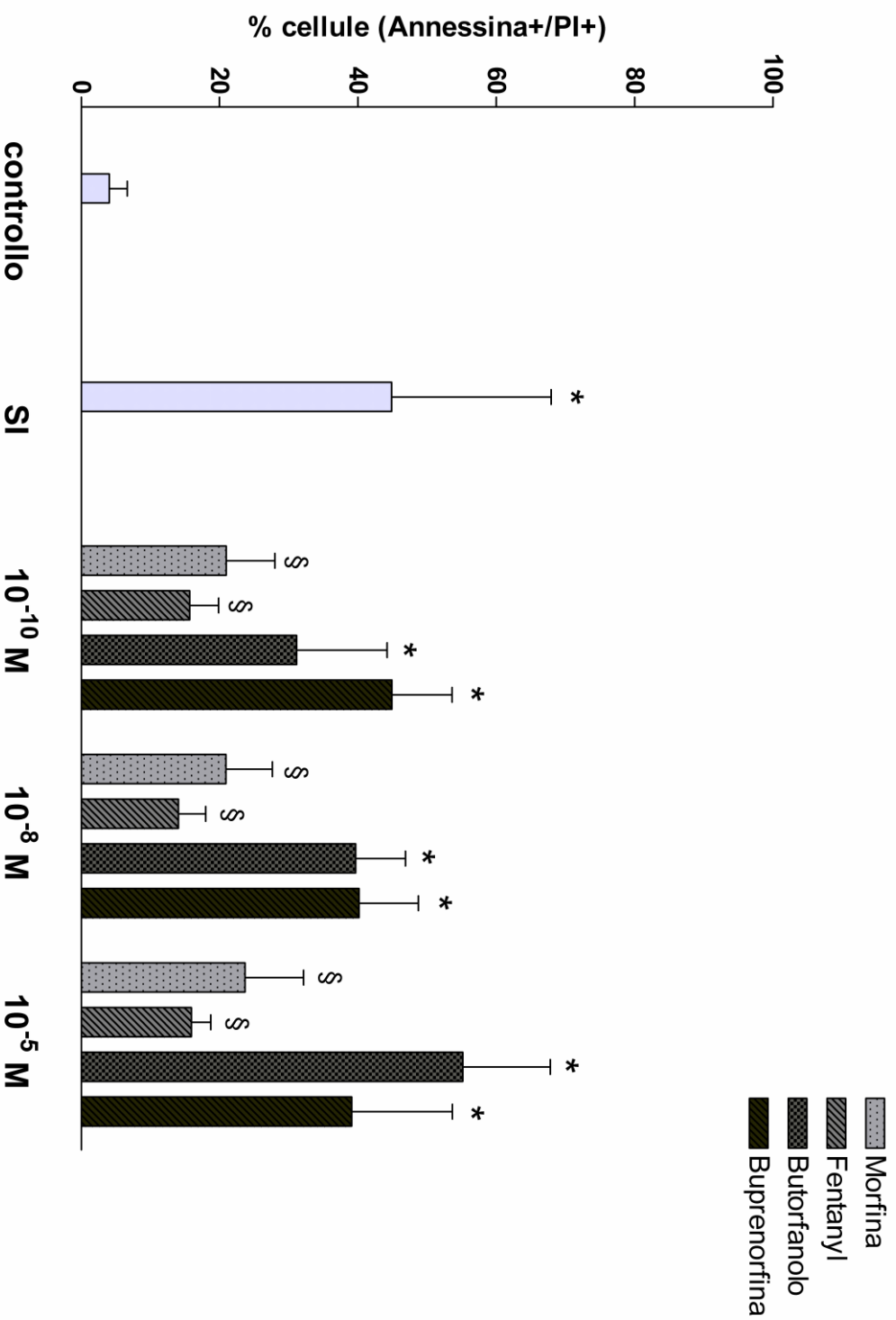


Grafico 50 % di cellule necrotiche (Annessina+/PI+) valutate mediante l'utilizzo di Annessina V/PI e con metodica fluorocitometrica, dopo 2 ore di precondizionamento con tre concentrazioni, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁵ M, di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina e incubazione per 24 ore con le stesse dosi di oppioidi . I dati sono espressi come media ± deviazione standard. * significatività statistica (p<0.05) rispetto al controllo; § differenze statistiche tra il controllo positivo e le cellule trattate con il farmaco.

CAPITOLO 6: DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Dai risultati del presente lavoro gli agenti oppioidi hanno dimostrato di possedere un effetto sulla vitalità delle cellule di tubulo renale prossimale più marcata in presenza di un fenomeno di ischemia. L'aggiunta di questi farmaci a cellule non soggette a questa stimolazione sembra non abbia importanti ripercussioni sulla proliferazione e la vitalità valutata dopo 48 ore di esposizione.

La proliferazione delle cellule sembra dipendere in una certa misura dal farmaco con cui vengono messe in contatto. Infatti, seppur non sono presenti marcate differenze con il controllo, il comportamento di morfina, fentanyl, butorfanolo e buprenorfina sulla linea cellulare di tubulo renale OK presenta delle differenze.

Dal presente studio le prove di vitalità valutata con metodica MTS dopo trattamento con morfina hanno evidenziato un lieve effetto proliferativo. Questo effetto sembra essere in contrapposizione a quanto riportato da Hatzoglou *et al.* nel 1996 dove gli autori avevano osservato un effetto sulla crescita della linea OK inversamente correlato alla dose di morfina con cui venivano messe in contatto. La discrepanza tra i due risultati può essere spiegata in termini di tempo di esposizione delle cellule al farmaco, infatti nel lavoro di Hatzoglou le cellule OK venivano incubate con la morfina per 4 giorni, al termine dei quali veniva misurata la proliferazione. Il nostro periodo di incubazione è di 2 giorni, una durata di tempo minore che può non consentire un'adeguata azione dei farmaci sul ciclo cellulare, che nel presente studio non risulta essere modificato dopo trattamento con morfina rispetto alle cellule di controllo sia a 24 che a 48 ore.

Diversamente da quanto ora riportato per la morfina, il fentanyl sembra mostrare un effetto dose dipendente sulla crescita e sulla vitalità delle cellule. Infatti alle dosi di 10^{-10} M si osserva una percentuale di cellule metabolicamente attive superiore al controllo sia dopo 6 che 24 ore. Sebbene limitata, la percentuale di crescita rispetto al controllo, per i tempi

riportati, è rispettivamente di circa il 5 e 7%. Quando le dosi di esposizione al fentanyl sono pari a 10^{-5} M, le cellule subiscono un rallentamento della crescita effetto che si osserva solo dopo 6 ore di esposizione. L'aumento della percentuale di cellule annessina+/PI- presenti a 24 ore fa supporre che questa diminuzione nella vitalità cellulare possa essere legata a fenomeni apoptotici che si ripercuotono a livello di ciclo cellulare. Infatti a 48 ore nel trattamento con il fentanyl alle più alte dosi diminuisce il numero di cellule in fase S, ovvero cellule in sintesi ma non in mitosi.

Nonostante la diminuzione delle cellule in sintesi la percentuale di quelle in fase mitotica G2/M non è differente da quanto osservato rispetto agli altri farmaci. Questo, correlato con la ripresa della vitalità osservata a 24 e 48 ore con MTS, induce a pensare che il fentanyl produca una iniziale inibizione della proliferazione dipendente dalla stimolazione del recettore $\kappa 1$, che si esaurisce rapidamente probabilmente per desensibilizzazione dello stesso. McLaughlin *et al.* hanno osservato che l'esposizioni per un'ora a 10^{-7} M dell'agonista dei KOR U50,488, provoca una desensibilizzazione dell'86% del recettore in cellule ingegnerizzate esprimenti il recettore κ umano. L'U50,488 ha una affinità per i recettori κ piuttosto bassa ma la sua efficacia è simile a quella trovata per la morfina e il fentanyl (Remmers *et al.* 1999). È ragionevole ipotizzare che quanto osservato nelle cellule esposte al fentanyl alla dose di 10^{-5} M, sia legato ad un meccanismo di tipo recettoriale in cui la concentrazione iniziale di fentanyl produce un segnale pro-apoptotico che a 48 ore riduce il numero di cellule in sintesi. Successivamente una volta che il recettore non è più in grado di rispondere alla stimolazione a causa della sua desensibilizzazione, le cellule sopravvissute tendono a proseguire il loro normale ciclo e questo spiegherebbe come non ci siano differenza nella popolazione di cellule in fase G2/M a 48 ore. Inoltre, l'analisi della sottopopolazione sub G1, che rappresenta le cellule il cui nucleo presenta una cromatina frammentata dalle DNAsi attivate presumibilmente durante l'apoptosi o la necrosi,

mostra come ci sia un aumento per la dose massima di fentanyl a 48 ore.

La buprenorfina è un derivato della tebaina, classificato farmacologicamente come un agonista parziale dei recettori μ degli oppioidi ed è un antagonista dei recettori κ verso cui però dimostra una elevata affinità di legame (Sadée *et al.* 1982, Huang *et al.* 2001, Virk *et al.* 2009). Queste sue caratteristiche farebbero supporre che questo farmaco non abbia effetto sulla proliferazione e la vitalità, che dovrebbe essere sovrapponibile al gruppo di controllo. In realtà gli studi di vitalità dopo 48 ore di esposizione alle concentrazioni maggiori mostrano come questa sia diminuita. Questo effetto sarebbe dovuto all'aumento dell'apoptosi osservabile a 24 ore e della necrosi a 48 ore. Anche se non statisticamente significative, il numero di cellule vitali nelle prove con l'annessinaV/PI e quelle in fase di sintesi valutate in citofluoimetria mediante colorazione con PI, sono minori rispetto al controllo. L'assenza di una trasmissione del segnale dopo legame della buprenorfina con il recettore κ e l'assenza degli altri due tipi di recettori oppioidi non espressi sulle cellule OK, farebbe supporre che la buprenorfina sia in grado di inibire la proliferazione attraverso vie alternative.

Un meccanismo che potrebbe spiegare l'attività antiproliferativa della buprenorfina potrebbe vederla capace di legare un recettore che non sia quello per gli oppioidi. Come è stato descritto, la linea cellulare OK esprime tra i vari recettori anche quello per la somatostatina che se stimolato indurrebbe una inibizione della proliferazione cellulare come la si osserva in diverse linee tumorali (Hatzoglou *et al.* 1996, Hatzoglou *et al.* 2005). Nel lavoro presentato nel 1996, Hatzoglou *et al.* hanno dimostrato che la morfina era in grado di indurre un effetto antiproliferativo anche in presenza di diprenorfina, un potente agente antagonista verso tutti i tipi di recettori per gli oppioidi. Altri autori hanno inoltre descritto la possibile interazione di agenti oppioidi differenti dalla morfina, come l'EKC, con il recettore per le somatostatine (Notas *et al.* 2007). Questi risultati, assieme

ad un lavoro pubblicato nel 1995 su cellule di adenocarcinoma mammario (Hatzoglou *et al.* 1996), dimostrano come possa esistere una interazione o cross-reaione tra i recettori della somatostatina e gli agenti oppioidi. È possibile che anche la buprenorfina, strutturalmente correlata alla morfina, abbia la proprietà di legarsi e attivare altri tipi di recettori. Dato che la buprenorfina non ha specificità per il recettore della somatostatina, tenderebbe a occupare prima quelli degli oppioidi e successivamente quelli delle somatostatine dunque questo potrebbe spiegare perché si nota un effetto solo alle dosi più alte.

Il butorfanolo, un agonista puro dei recettori κ verso cui ha una elevata affinità, è un agente che però dimostra una lieve efficacia farmacologica, poco superiore alla meta di quella del fentanyl (Remmers *et al.* 1999, Gharagozlou *et al.* 2006). La sua scarsa efficacia spiegherebbe il suo debole effetto sulla proliferazione e la vitalità cellulare. Dopo 48 ore di esposizione al butorfanolo si osserva un aumento della necrosi nelle cellule e la percentuale di apoptosi è aumentata ma nulla si osserva a livello di prove di vitalità se non una diminuzione non significativa alle dosi di 10^{-5} M che può essere legato ad un effetto della procedura di preparazione del campione piuttosto che di un reale effetto legato al farmaco.

Il destino delle cellule durante un fenomeno ischemico è legata all'entità della diminuzione di ATP. Più precisamente se i livelli calano più del 85% il destino delle cellule è quello di andare incontro a fenomeni necrotici. Se il contenuto di ATP invece è superiore al 25% durante ischemia la morte cellulare avviene per apoptosi (Lieberthal *et al.* 1998). Nelle prove preliminari di deplezione di ATP le cellule sono state messe in contatto per 2 o 4 ore con 10 μ M di antimicina A o con una soluzione contenente la stessa concentrazione di antimicina A e 2 mM di 2-Deossi-D-glucosio. Il contenuto di ATP misurato era del 2.5 % per tutti i protocolli, nonostante Feldenberg abbiano riportato percentuali superiori a quelle osservate nel presente studio, in cellule MDCK trattate con simili

concentrazioni di antimicina A con o senza 2-Deossi-D-glucosio (Feldenberg *et al.* 1999). L'apparente discrepanza può risiedere nella differente linea impiegata, infatti le OK sono cellule di tubulo prossimale e le MDCK sono una linea derivata da tubulo distale. Parrebbe dunque che il tubulo distale sia più resistente di quello prossimale nei confronti di eventi ischemici. Questa ipotesi è confermata da prove *in vitro* e cliniche in cui eventi ischemici acuti danneggiano maggiormente la componente tubulare prossimale piuttosto che distale (Lieberthal & Nigam 1998, Wiegele *et al.* 1998).

Dopo un'ischemia della durata di 2 ore, le OK messe nuovamente in contatto con terreno completo, dimostrano una fase iniziale di ripresa di produzione di ATP, molto accentuata per le prime 12 ore e più lenta nelle successive 12. A 24 ore dopo ischemia le cellule mostrano un calo nella quantità di ATP e la spiegazione più probabile è una diminuzione nel numero di cellule vitali presenti nel campione. La via metabolica che mantiene il contenuto di ATP dopo che il danno ischemico ha reso inefficaci i vari complessi del ciclo della respirazione mitocondriale è la glicolisi. L'importanza della glicolisi dopo ischemia è stata descritta anche a livello di tubulo renale prossimale anche se si dimostra meno efficiente rispetto ad altre porzioni del nefrone (Dickman & Mandel 1990, Lieberthal & Nigam 1998, Weinberg *et al.* 2000).

La quantità di ATP intracellulare misurata nel protocollo P1 è maggiore rispetto al controllo di cellule non trattate con morfina o fentanyl durante le prove di ischemia. Il fentanyl sembra abbia un effetto superiore alla morfina nel preservare il contenuto intracellulare di ATP anche se per ambo gli oppioidi la durata dell'effetto sembra limitato e non più rilevabile a 24 ore. Una possibile spiegazione di quanto osservato è legata alla diminuzione nel numero di cellule vitali dopo ischemia. Infatti la quantità di ATP prodotto durante ischemia è legata al numero di cellule vitali, in cui la respirazione aerobica procede normalmente, e al pool di cellule in cui, il

danno ischemico ha portato ad un disaccoppiamento completo o parziale della fosforilazione ossidativa che non porta alla produzione di ATP. La glicolisi supplisce per il fabbisogno energetico in questo secondo gruppo di cellule. Nonostante in queste siano presenti fattori riducenti mitocondriali come l'NADH, la percentuale di ATP prodotto è minore poiché la glicolisi è in grado di produrne in quantità limitata (Kosieradzki & Rowiński 2008). Insieme, queste osservazioni spiegano come, indipendentemente dalla normalizzazione dei valori di ATP sul numero di cellule misurate con metodica MTS, le cellule trattate con morfina e fentanyl abbiano una percentuale di ATP intracellulare risulti meno elevato rispetto al controllo.

Nonostante l'attivazione delle caspasi effettrici sia minore nel trattamento con morfina e fentanyl, una minor percentuale di apoptosi rispetto al controllo SI si osserva solo nelle prove a 12 ore. L'annessina V è una proteina che lega i fosfolipidi a cui è aggiunto un fluorocromo. Questa molecola lega la fosfatidil serina, un amminofosfolipide normalmente presente sulla porzione interna della membrana, che viene esterificata durante l'apoptosi e funge da segnale di morte per la fagocitosi della cellula (Krysko *et al.* 2008). È stato stimato che, dalla comparsa delle prime modificazioni cellulari al completamento del processo, la durata della fase di esecuzione dell'apoptosi avvenga in circa di 2 ore (Lieberthal & Levine 1996). Così immediatamente dopo l'evento ischemico non è trascorso abbastanza tempo perché si abbia un sufficiente numero di cellule nella fase di esecuzione. Inoltre seppur la durata della fase di esecuzione sia in genere costante, il periodo che intercorre tra la stimolazione della cellula e la comparsa delle alterazioni morfologiche ha una durata variabile da diverse ore a giorni (Earnshaw 1995). Questo spiega perché la metodica con annessina V/PI mostra un segnale apoptotico anche dopo 24 ore dalla stimolazione ischemica. Inoltre, nel periodo che intercorre tra la fine dell'ischemia e le 12 ore successive, un numero variabile di cellule può essere entrato nella fase di esecuzione e quanto osservato a 12 ore è solo

una minima parte dell'apoptosi iniziata dopo ischemia.

L'effetto della morfina e del fentanyl sulla necrosi cellulare è sovrapponibile a quanto osservato per il controllo SI subito dopo il fenomeno ischemico e nelle 12 ore seguenti. Una riduzione rilevante delle cellule Annessina+/PI+ si osserva a 24 ore con un parallelo aumento della vitalità cellulare.

La morfina non sembra avere effetti favorevoli nel preservare il contenuto di ATP se somministrata 2 ore prima o dopo l'evento ischemico, infatti a 12 ore il contenuto di ATP è simile per tutte le concentrazioni al controllo SI. Diversamente il fentanyl ha effetti superiori a quelli della morfina nel preservare l'ATP dopo ischemia quando somministrato prima o dopo l'evento ischemico. Le caspasi sembrano attivate meno in presenza di un pretrattamento o di un post trattamento con il fentanyl rispetto alla morfina la quale ha effetti positivi solo alle dosi maggiori. Questo farebbe supporre che anche per questo fenomeno la maggiore o minore efficacia ed affinità per il recettore giochi un ruolo importante sulla sopravvivenza delle cellule.

Buprenorfina e butorfanolo nelle prove di vitalità con annessina V/PI non mostrano marcate differenze con quanto si osserva nel controllo positivo ischemico e lo stesso avviene per le prove di attivazione delle caspasi-3 e -7 e nel contenuto di ATP. Questi risultati fanno pensare che quanto osservato sia mediato all'attivazione del recettore κ , che non sono attivati dal legame con la buprenorfina o, nel caso del butorfanolo, siano stimolati in modo non adeguatamente intenso da provocare un effetto apprezzabile.

I risultati dello studio condotto sull'effetto protettivo degli oppioidi agonisti puri nel limitare i danni dovuti a ischemia/riperfusion, è confermato anche da numerosi altri lavori. In particolare molto risalto è stato dato negli ultimi anni all'effetto positivo che questi farmaci possono

avere in corso di eventi ischemici cardiaci e di come dopo loro somministrazione si abbia una diminuzione dell'area infartuale (Peart *et al.* 2005, Shim & Kersten 2008). A livello cardiaco sono stati identificati espressi sia i recettori δ che κ per gli oppioidi e si è osservato che entrambi sono in grado di attivare quei fenomeni adattativi che prevengono l'apoptosi della cellule soprattutto se somministrati prima dell'evento ischemico (da Silva *et al.* 2004, Rong *et al.* 2009).

Anche a livello renale alcuni studi in vivo hanno confermato un effetto protettivo della morfina somministrata prima di un evento ischemico. In uno studio del 2009 Pazoki-Toroudi *et al.* hanno osservato come in ratti pretrattati con dosi di morfina di 0.5, 2 e 5 mg Kg⁻¹ la severità delle lesioni istologiche e la capacità di filtrazione erano meglio conservate rispetto al gruppo di controllo (Pazoki-Toroudi *et al.* 2009). In un lavoro precedente gli stessi autori hanno studiato come la somministrazione cronica di morfina sia in grado di migliorare la funzionalità renale e come questo effetto fosse inibito dalla somministrazione di naloxone (Habibey & Pazoki-Toroudi 2008).

Diversi meccanismi molecolari sono in grado di spiegare gli effetti protettivi mostrati dalla morfina e dal fentanyl.

L'attivazione dei recettori degli oppioidi è in grado di portare a fosforilazione la famiglia delle MAPK, che una volta traslocate a livello nucleare inducono la trascrizione di diversi geni provitali in diverse linee cellulari (Gross 2003, Persson *et al.* 2003). Per i KOR l'attivazione di queste particolari chinasi è collegata alla desensibilizzazione del recettore ed infatti ha luogo quando sia le GRK che l'arrestina sono presenti e funzionanti (Bruchas *et al.* 2006). Queste ricerche spiegherebbero perché un effetto protettivo sulle cellule OK si osserva nel nostro studio solo per morfina e fentanyl, gli unici agenti oppioidi a indurre una rilevante stimolazione e di conseguenza desensibilizzazione dei recettori. Un ruolo importante in questa via lo ricoperto anche la PKC la cui *up regulation*,

dopo attivazione di una G_i produce un effetto protettivo dopo preconditionamento, effetto che viene soppresso quando questo enzima viene inibito (Downey *et al.* 2007).

Un secondo meccanismo attraverso cui morfina e fentanyl agirebbero è legato alla modulazione sull'enzima emeossigenasi. La produzione di composti altamente reattivi derivanti dall'ossigeno durante gli eventi di riperfusion induce nella cellula una risposta antiossidante mediata da una particolare proteina della fase acuta, l'emeossigenasi-1 (HO-1) (Patel *et al.* 2004). In cellule derivate da glomerulo renale basse dosi di morfina sono in grado di stimolare la produzione e l'attivazione dell'HO-1 (Patel *et al.* 2003). La capacità del fentanyl di promuovere la produzione della stessa proteina è stata dimostrata in vitro da in un linea cellulare di miocardiociti di ratto (Jancsó *et al.* 2007).

Un altro possibile meccanismo che spiega l'effetto protettivo degli oppioidi li vede coinvolti in una interazione con dei particolari canali del potassio ATP sensibili a livello mitocondriale (K_{ATP}). L'apertura di questi canali è stata associata ad una diminuzione dell'area infartuale dopo ischemia cardiaca (Fryer *et al.* 2000) ed inoltre sono in grado di diminuire la percentuale di apoptosi in culture cellulari di neuronali (Teshima *et al.* 2009). Questi canali sembra siano anche coinvolti nel preconditionamento verso fenomeni di ischemia e riperfusion che altri anestetici sono in grado di indurre. Infatti Assad ha dimostrato come il propofol, un agente ipnotico, sia in grado di aumentare la vitalità cellulare dopo una ischemia indotta con antimicina A in cellule di tubulo renale prossimale (Assad *et al.* 2009). Per alcuni anestetici gassosi allo stesso modo è stata segnalata una interazione con questi canali e sembra sia alla base del loro effetto protettivo nei confronti di ischemia cardiaca (Kersten *et al.* 1997, Toller *et al.* 2000).

Questi canali una volta aperti aumentano la permeabilità della membrana mitocondriale interna al potassio che per gradiente vi penetra assieme ad acqua libera. Il risultato è un aumento del volume della matrice

del mitocondrio.

Attualmente tre sono le possibili spiegazioni per cui l'apertura di questi canali abbia un effetto protettivo. Una prima teoria spiega come durante ischemia questi canali creerebbero un gradiente elettrico che eviterebbe l'entrata degli ioni Ca^{2+} nella matrice mitocondriale limitando così il blocco della respirazione cellulare. Il potassio produrrebbe inoltre un accumulo di acqua nella matrice che sposterebbe, avvicinandole, le membrane interna ed esterna favorendone il contatto e mantenendo le connessioni tra le proteine transmembrinarie favorendo il trasporto di elettroni. Un'ultima ipotesi associa l'apertura di questi canali ad una produzione di composti reattivi derivanti dall'ossigeno che stimolerebbero una *up* regolazione della PKC e così l'attivazione delle MAPK (Ardehali & O'Rourke 2005, Honda *et al.* 2005)

In conclusione, il presente lavoro dimostra che gli oppioidi hanno un effetto sulle cellule OK derivate da tubulo renale prossimale sia in assenza che durante un fenomeno ischemico che diminuisce quasi completamente la quantità di ATP intracellulare. Il meccanismo sembra legato ad una interazione tra il recettore degli oppioidi e i sistemi effettori ed è influenzato dalle caratteristiche farmacodinamiche dei farmaci usati. Per il fentanyl e la buprenorfina è stato osservato un effetto sulla vitalità inversamente correlato alla dose per cellule non sottoposte ad eventi ischemici. Durante un evento ischemico il fentanyl e la morfina somministrati 2 ore prima del danno e immediatamente dopo, sono più efficaci della buprenorfina e del butorfanolo nel prevenire i danni durante le prime 12 e 24 ore. Il fentanyl si dimostra efficace nel diminuire l'attivazione delle caspasi anche quando somministrato solo dopo oppure solamente 2 ore prima l'ischemia mentre la morfina si dimostra efficace solo se somministrata dopo il danno ischemico e alle dosi maggiori.

Butrfanolo e buprenorfina non hanno un comportamento differente da quanto osservato per le cellule soggette solo all'evento ischemico soprattutto sulla percentuale di necrosi e apoptosi si sono dimostrati inefficaci.

I risultati farebbero propendere per un uso della morfina e del fentanyl rispetto a farmaci agonisti parziali od antagonisti dei recettori κ degli oppioidi in corso di chirurgie di trapianto renale in cui è inevitabile il danno ischemico. Questo in ragione delle loro effetto sull'attività metabolica mitocondriale che preserva il contenuto di ATP migliorando pertanto la vitalità cellulare dopo evento ischemico mostrate dalla morfina e dal fentanyl.

Bibliografia:

- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 1996 Oct 18;87(2):171.
- Altier C, Zamponi GW. Signaling complexes of voltage-gated calcium channels and G protein-coupled receptors. *J Recept Signal Transduct Res*. 2008;28(1-2):71-81.
- Ardehali H, O'Rourke B. Mitochondrial K(ATP) channels in cell survival and death. *J Mol Cell Cardiol*. 2005 Jul;39(1):7-16.
- Ashton N, Balment RJ, Blackburn TP. Kappa-opioid-induced changes in renal water and electrolyte management and endocrine secretion. *Br J Pharmacol*. 1989 Jul;97(3):769-76.
- Attali B, Saya D, Vogel Z. Kappa-opiate agonists inhibit adenylate cyclase and produce heterologous desensitization in rat spinal cord. *J Neurochem*. 1989 Feb;52(2):360-9.
- Befort K, Tabbara L, Bausch S, Chavkin C, Evans C, Kieffer B. The conserved aspartate residue in the third putative transmembrane domain of the delta-opioid receptor is not the anionic counterpart for cationic opiate binding but is a constituent of the receptor binding site. *Mol Pharmacol*. 1996 Feb;49(2):216-23.
- Blank M, Shiloh Y. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle*. 2007 Mar 15;6(6):686-95.
- Blackburn TP, Borkowski KR, Friend J, Rance MJ. On the mechanisms of kappa-opioid-induced diuresis. *Br J Pharmacol*. 1986 Nov;89(3):593-8.
- Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*. 1999 Apr 1;18(7):1723-9.
- Bourne HR. How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 1997 Apr;9(2):134-42.
- Bridges TM, Lindsley CW. G-protein-coupled receptors: from classical modes of modulation to allosteric mechanisms. *ACS Chem Biol*. 2008 Sep 19;3(9):530-41.
- Bröker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res*. 2005 May 1;11(9):3155-62.
- Brownstein MJ. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jun 15;90(12):5391-3.
- Bruchas MR, Macey TA, Lowe JD, Chavkin C. Kappa opioid receptor activation of p38 MAPK is GRK3- and arrestin-dependent in neurons and astrocytes. *J Biol Chem*. 2006 Jun 30;281(26):18081-9.
- Cashio P, Lee TV, Bergmann A. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila melanogaster*. *Semin Cell Dev Biol*. 2005 Apr;16(2):225-35.

- Chen YL, Law PY Loh HH. The other side of the opioid story: modulation of cell growth and survival signalling. *Curr Med Chem*. 2008;15(8):772-8.
- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2008 Sep;151(1):10-27.
- Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*. 2001 Jun;94(6):1133-8.
- Connor M, Christie MD. Opioid receptor signalling mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999 Jul;26(7):493-9.
- Daemen MA, van 't Veer C, Denecker G, Heemskerk VH, Wolfs TG, Clauss M, Vandenamee P, Buurman WA. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest*. 1999 Sep;104(5):541-9.
- da Silva R, Grampp T, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology*. 2004 Jan;100(1):59-69.
- De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem*. 1980 Aug 10;255(15):7108-17.
- Denning GM, Ackermann LW, Barna TJ, Armstrong JG, Stoll LL, Weintraub NL, Dickson EW. Proenkephalin expression and enkephalin release are widely observed in non-neuronal tissues. *Peptides*. 2008 Jan;29(1):83-92.
- Dhawan BN, Cesselin F, Raghubir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghesi PS, Hamon M. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev*. 1996 Dec;48(4):567-92.
- DiBona GF, Jones SY. Role of endogenous peripheral opioid mechanisms in renal function. *J Am Soc Nephrol*. 1994 Apr;4(10):1792-7.
- Dickman KG, Mandel LJ. Differential effects of respiratory inhibitors on glycolysis in proximal tubules. *Am J Physiol*. 1990 Jun;258(6 Pt 2):F1608-15.
- Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem*. 1991;60:653-88.
- Downey JM, Davis AM, Cohen MV. Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev*. 2007 Dec;12(3-4):181-8.
- Dreborg S, Sundström G, Larsson TA, Larhammar D. Evolution of vertebrate opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 7;105(40):15487-92.
- Earnshaw WC. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 1995 Jun;7(3):337-43.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:383-424.

- Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* 1997 May 15;57(10):1835-40.
- Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell.* 1986 Mar 28;44(6):817-29.
- Evans CJ, Keith DE Jr, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science.* 1992 Dec 18;258(5090):1952-5.
- Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J.* 2004 Dec 1;384(Pt 2):201-32.
- Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007 Jul;14(7):1237-43.
- Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev.* 2000 Feb;21(1):90-113.
- Gharagozlou P, Hashemi E, DeLorey TM, Clark JD, Lameh J. Pharmacological profiles of opioid ligands at kappa opioid receptors. *BMC Pharmacol.* 2006 Jan 25;6:3.
- Gilmore AP. Anoikis. *Cell Death Differ.* 2005 Nov;12 Suppl 2:1473-7
- Gross GJ. Role of opioids in acute and delayed preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 2003 Jul;35(7):709-18.
- Guedes AG, Rudé EP, Rider MA. Evaluation of histamine release during constant rate infusion of morphine in dogs. *Vet Anaesth Analg.* 2006 Jan;33(1):28-35.
- Habibey R, Pazoki-Toroudi H. Morphine dependence protects rat kidney against ischaemia-reperfusion injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008 Oct;35(10):1209-14.
- Hatzoglou A, Ouafik L, Bakogeorgou E, Thermos K, Castanas E. Morphine cross-reacts with somatostatin receptor SSTR2 in the T47D human breast cancer cell line and decreases cell growth. *Cancer Res.* 1995 Dec 1;55(23):5632-6.
- Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Papakonstanti E, Stournaras C, Emmanouel DS, Castanas E. Identification and characterization of opioid and somatostatin binding sites in the opossum kidney (OK) cell line and their effect on growth. *J Cell Biochem.* 1996 Dec 15;63(4):410-21.
- Harrison LM, Kastin AJ, Zadina JE. Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and antiopiates. *Peptides.* 1998;19(9):1603-30.
- Hengartner MO. Genetic control of programmed cell death and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol.* 1997 Jul-Oct;32(4-5):363-74.

- Honda HM, Korge P, Weiss JN. Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1047:248-58.
- Huang P, Kehner GB, Cowan A, Liu-Chen LY. Comparison of pharmacological activities of buprenorphine and norbuprenorphine: norbuprenorphine is a potent opioid agonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 May;297(2):688-95.
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature.* 1975 Dec 18;258(5536):577-80.
- Ishizuya-Oka A, Hasebe T, Shi YB. Apoptosis in amphibian organs during metamorphosis. *Apoptosis.* 2009 Nov 20 [Ahead print].
- Jancsó G, Cserepes B, Gasz B, Benkó L, Borsiczky B, Ferenc A, Kürthy M, Rácz B, Lantos J, Gál J, Arató E, Sínayc L, Wéber G, Róth E. Expression and protective role of heme oxygenase-1 in delayed myocardial preconditioning. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Jan;1095:251-61.
- Jensen AA, Spalding TA. Allosteric modulation of G-protein coupled receptors. *Eur J Pharm Sci.* 2004 Mar;21(4):407-20.
- Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 2005 Feb;4(2):139-63.
- Jordan B, Devi LA. Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction. *Br J Anaesth.* 1998 Jul;81(1):12-9.
- Joshi S, Lee JW, Wong YH. Stimulation of phospholipase C by the cloned mu, delta and kappa opioid receptors via chimeric G alpha(q) mutants. *Eur J Neurosci.* 1999 Feb;11(2):383-8.
- Kane BE, Svensson B, Ferguson DM. Molecular recognition of opioid receptor ligands. *AAPS J.* 2006 Mar 10;8(1):E126-37.
- Kapusta DR. Opioid mechanisms controlling renal function. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1995 Dec;22(12):891-902.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.
- Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology.* 1997 Aug;87(2):361-70.
- Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Dec 15;89(24):12048-52.
- Kilpatrick ZE, Cakouros D, Kumar S. Ecdysone-mediated up-regulation of the effector caspase DRICE is required for hormone-dependent apoptosis in *Drosophila* cells. *J Biol Chem.* 2005 Mar 25;280(12):11981-6.
- Knapp RJ, Malatynska E, Fang L, Li X, Babin E, Nguyen M, Santoro G, Varga EV, Hruba VJ, Roeske WR, *et al.* Identification of a human delta opioid

- receptor: cloning and expression. *Life Sci.* 1994;54(25):PL463-9.
- Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant Proc.* 2008 Dec;40(10):3279-88.
- Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 2005 Nov;12 Suppl 2:1463-7.
- Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods.* 2008 Mar;44(3):205-21.
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature.* 1996 Nov 28;384(6607):368-72.
- Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2007 Jan;14(1):32-43.
- Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Vital functions for lethal caspases. *Oncogene.* 2005 Aug 4;24(33):5137-48.
- Law PY, Wong YH, Loh HH. Mutational analysis of the structure and function of opioid receptors. *Biopolymers.* 1999;51(6):440-55.
- Lieberthal W, Levine JS. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol.* 1996 Sep;271(3 Pt 2):F477-88.
- Lieberthal W, Menza SA, Levine JS. Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *Am J Physiol.* 1998 Feb;274(2 Pt 2):F315-27.
- Lieberthal W, Nigam SK. Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury. *Am J Physiol.* 1998 Nov;275(5 Pt 2):F623-31.
- Lomize AL, Pogozheva ID, Mosberg HI. Structural organization of G-protein-coupled receptors. *J Comput Aided Mol Des.* 1999 Jul;13(4):325-53.
- Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature.* 1977 Jun 9;267(5611):495-9.
- Ma *et al.* 2001
- Mansson E, Bare L, Yang D. Isolation of a human kappa opioid receptor cDNA from placenta. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Aug 15;202(3):1431-7.
- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 1995 Nov 1;182(5):1545-56.

- Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther.* 1976 Jun;197(3):517-32.
- McLaughlin JP, Xu M, Mackie K, Chavkin C. Phosphorylation of a carboxyl-terminal serine within the kappa-opioid receptor produces desensitization and internalization. *J Biol Chem.* 2003 Sep 5;278(36):34631-40.
- Melino G, Knight RA, Nicotera P. How many ways to die? How many different models of cell death? *Cell Death Differ* 2005; 12:1457-62.
- Mercadante S, Arcuri E. Opioids and renal function. *J Pain.* 2004 Feb;5(1):2-19.
- Metzger TG, Ferguson DM. On the role of extracellular loops of opioid receptors in conferring ligand selectivity. *FEBS Lett.* 1995 Nov 13;375(1-2):1-4.
- Milligan G, Mitchell FM, Mullaney I, McClue SJ, McKenzie FR. The role and specificity of guanine nucleotide binding proteins in receptor-effector coupling. *Symp Soc Exp Biol.* 1990;44:157-72.
- Minami M, Onogi T, Nakagawa T, Katao Y, Aoki Y, Katsumata S, Satoh M. DAMGO, a mu-opioid receptor selective ligand, distinguishes between mu- and kappa-opioid receptors at a different region from that for the distinction between mu- and delta-opioid receptors. *FEBS Lett.* 1995 May 1;364(1):23-7.
- Moroni F (2004) *Farmacologia generale e molecolare* (3rd edn), UTET Spa Divisione Scienze Mediche, Torino, Italia pp525-37.
- Mosaddeghi M, Kapusta DR, Minor LD, Duan N, Paul D. Effects of kappa-opioid receptor agonists on stimulated phosphoinositide hydrolysis in rat kidney. *Eur J Pharmacol.* 1995 May 26;289(3):411-7.
- Movassagh M, Foo RS. Simplified apoptotic cascades. *Heart Fail Rev.* 2008 Jun;13(2):111-9.
- Muir WW III (2002) *Handbook of Veterinary Pain Management* (1st edn), Mosby, St. Louis, Missouri pp 147-8
- Muravchick S, Levy RJ. Clinical implications of mitochondrial dysfunction. *Anesthesiology.* 2006 Oct;105(4):819-37.
- Notas G, Kampa M, Nifli AP, Xidakis K, Papasava D, Thermos K, Kouroumalis E, Castanas E. The inhibitory effect of opioids on HepG2 cells is mediated via interaction with somatostatin receptors. *Eur J Pharmacol.* 2007 Jan 19;555(1):1-7.
- Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene.* 1998 Dec 24;17(25):3237-45.
- O'Brien MA, Kirby R. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *J vet emerg crit car.* 2008 Dec 18;18(6):572-85
- Ocaña M, Cendán CM, Cobos EJ, Entrena JM, Baeyens JM. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. *Eur J Pharmacol.* 2004

Oct 1;500(1-3):203-19.

- Pan HL, Wu ZZ, Zhou HY, Chen SR, Zhang HM, Li DP. Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* 2008 Jan;117(1):141-61.
- Patel J, Manjappa N, Bhat R, Mehrotra P, Bhaskaran M, Singhal PC. Role of oxidative stress and heme oxygenase activity in morphine-induced glomerular epithelial cell growth. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Nov;285(5):F861-9.
- Patel A, van de Poll MC, Greve JW, Buurman WA, Fearon KC, McNally SJ, Harrison EM, Ross JA, Garden OJ, Dejong CH, Wigmore SJ. Early stress protein gene expression in a human model of ischemic preconditioning. *Transplantation.* 2004 Nov 27;78(10):1479-87.
- Pazoki-Toroudi HR, Ajami M, Habibey R. Pre-medication and renal preconditioning: a role for alprazolam, atropine, morphine and promethazine. *Fundam Clin Pharmacol.* 2009 Aug 17. [Epub ahead of print] accesso alla rivista il 22 Gennaio 2010
- Peart JN, Gross ER, Gross GJ. Opioid-induced preconditioning: recent advances and future perspectives. *Vascul Pharmacol.* 2005 Apr-May;42(5-6):211-8.
- Persson AI, Thorlin T, Bull C, Eriksson PS. Opioid-induced proliferation through the MAPK pathway in cultures of adult hippocampal progenitors. *Mol Cell Neurosci.* 2003 Jul;23(3):360-72.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Sep;3(9):639-50.
- Reisine T, Law SF, Blake A, Tallent M. Molecular mechanisms of opiate receptor coupling to G proteins and effector systems. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Mar 22;780:168-75.
- Remmers AE, Clark MJ, Mansour A, Akil H, Woods JH, Medzihradsky F. Opioid efficacy in a C6 glioma cell line stably expressing the human kappa opioid receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999 Feb;288(2):827-33.
- Riccobene TA, Omann GM, Linderman JJ. Modeling activation and desensitization of G-protein coupled receptors provides insight into ligand efficacy. *J Theor Biol.* 1999 Sep 21;200(2):207-22.
- Rong F, Peng Z, Ye MX, Zhang QY, Zhao Y, Zhang SM, Guo HT, Hui B, Wang YM, Liang C, Gu CH, Tao C, Cui Q, Yu SQ, Yi DH, Pei JM. Myocardial apoptosis and infarction after ischemia/reperfusion are attenuated by kappa-opioid receptor agonist. *Arch Med Res.* 2009 May;40(4):227-34.
- Roush W. Regulating G protein signaling. *Science.* 1996 Feb 23;271(5252):1056-8.
- Sadée W, Rosenbaum JS, Herz A. Buprenorphine: differential interaction with opiate receptor subtypes in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 1982 Oct;223(1):157-62.
- Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ. A mutation-induced activated

- state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem*. 1993 Mar 5;268(7):4625-36.
- Samways DSK, Henderson G. Opioid elevation of intracellular free calcium: possible mechanisms and physiological relevance. *Cell Signal*. 2006 Feb;18(2):151-61.
- Satoh M, Minami M. Molecular pharmacology of the opioid receptors. *Pharmacol Ther*. 1995;68(3):343-64.
- Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Gobé G, Connor J, O'Toole KM, Olsson CA, Wise GJ, Buttyan R. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol*. 1992 Apr;140(4):831-8.
- Shim YH, Kersten JR. Preconditioning, anesthetics, and perioperative medication. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2008 Mar;22(1):151-65.
- Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000 Feb;45(3):528-37.
- Strahs D, Weinstein H. Comparative modeling and molecular dynamics studies of the delta, kappa and mu opioid receptors. *Protein Eng*. 1997 Sep;10(9):1019-38.
- Teshima Y, Akao M, Li RA, Chong TH, Baumgartner WA, Johnston MV, Marbán E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel activation protects cerebellar granule neurons from apoptosis induced by oxidative stress. *Stroke*. 2003 Jul;34(7):1796-802.
- Thurmon JC, Tranquilli WJ, Benson GJ (1996) *Lumb & Jones' veterinary anesthesia*. (3rd edn), Baltimore, Maryland, USA pp183-209
- Toledo-Pereyra LH, Toledo AH, Walsh J, Lopez-Neblina F. Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion. *Exp Clin Transplant*. 2004 Jun;2(1):174-7.
- Toller WG, Gross ER, Kersten JR, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate- dependent potassium channels: mechanism of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology*. 2000 Jun;92(6):1731-9.
- Townsend D 4th, Brown DR. Characterization of specific delta-opioid binding sites in the distal small intestine of swine. *Eur J Pharmacol*. 2003 Dec 15;482(1-3):111-6.
- Tso PH, Wong YH. G(z) can mediate the acute actions of mu- and kappa-opioids but is not involved in opioid-induced adenylyl cyclase supersensitization. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000 Oct;295(1):168-76.
- Ueda H, Nozaki M, Satoh M. Multiple opioid receptors and GTP-binding proteins. *Comp Biochem Physiol C*. 1991;98(1):157-69.
- Vallar L, Vicentini L, Abbracchio M (2004) *Farmacologia generale e molecolare* (3rd edn), UTET Spa Divisione Scienze Mediche, Torino, Italia pp525-37.

- Virk MS, Arttamangkul S, Birdsong WT, Williams JT. Buprenorphine is a weak partial agonist that inhibits opioid receptor desensitization. *J Neurosci*. 2009 Jun 3;29(22):7341-8.
- Wang JB, Johnson PS, Wu JM, Wang WF, Uhl GR. Human kappa opiate receptor second extracellular loop elevates dynorphin's affinity for human mu/kappa chimeras. *J Biol Chem*. 1994 Oct 21;269(42):25966-9.
- Wang D, Sun X, Sadee W. Different effects of opioid antagonists on mu-, delta-, and kappa-opioid receptors with and without agonist pretreatment. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 May;321(2):544-52.
- Weinberg JM, Venkatachalam MA, Roeser NF, Nissim I. Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 14;97(6):2826-31.
- Wittert G, Hope P, Pyle D. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Jan 26;218(3):877-81.
- Wyllie AH. Death in normal and neoplastic cells. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*. 1974;7:35-42.
- Xie GX, Palmer PP. RGS proteins: new players in the field of opioid signaling and tolerance mechanisms. *Anesth Analg*. 2005 Apr;100(4):1034-42.
- Xu H, Wang X, Partilla JS, Bishop-Mathis K, Benaderet TS, Dersch CM, Simpson DS, Prisinzano TE, Rothman RB. Differential effects of opioid agonists on G protein expression in CHO cells expressing cloned human opioid receptors. *Brain Res Bull*. 2008 Sep 5;77(1):49-54.
- Zhu J, Xue JC, Law PY, Claude PA, Luo LY, Yin J, Chen C, Liu-Chen LY. The region in the mu opioid receptor conferring selectivity for sufentanil over the delta receptor is different from that over the kappa receptor. *FEBS Lett*. 1996 Apr 15;384(2):198-202.

Questo lavoro non sarebbe stato possibile senza il contributo di molte persone. A tutti loro va la mia profonda gratitudine.

Al Professor Roberto Busetto, che mi ha dato l'opportunità di crescere durante il percorso del dottorato, non privo di difficoltà e di momenti difficili.

Al CORIT (Consorzio per la ricerca sul trapianto d'organi), presso il cui laboratorio di immunologia ho eseguito la parte sperimentale.

Al professor Emanuele Cozzi sulla cui disponibilità ed altissima professionalità ho sempre potuto contare.

Alla dottoressa Federica Besenon per l'aiuto nelle procedure pratiche e per le letture al citofluorimetro.

Alla dottoressa Marta Vadori, insostituibile compagna di viaggio, va infine un ringraziamento speciale. Verso di lei nutro un sentimento di infinita stima, riconoscenza ed amicizia. Senza il suo impegno e le sue inesauribili energie questo lavoro non avrebbe mai visto la luce.

Alla dottoressa Giulia Maria De Benedictis, che per prima mi ha messo la pulce nell'orecchio riguardo anestesia ed apoptosi, da cui poi tutto è partito.

A tutti i colleghi e gli amici che mi hanno accompagnato durante tutto il dottorato non facendomi mai mancare il loro appoggio e il loro affetto.