

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Biologiche e Chimiche Applicate

Dottorato di ricerca in FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA SPERIMENTALI

CICLO XXIII

CONTRIBUTO DELL'ISTAMINA E DELLE PROTEASI SERINICHE NEL DANNO POST- ISCHEMICO INTESTINALE

Coordinatore e Tutor:
Chiar.ma Prof.ssa ELISABETTA BAROCELLI

Dottorando:
Dott. Thomas Gobbetti

TRIENNIO ACCADEMICO 2008-2010

Abstract

L'ischemia mesenterica acuta è una condizione patologica causata dallo scompenso tra la perfusione di ossigeno al distretto intestinale da una parte e la domanda metabolica tissutale dall'altra. L'incidenza in aumento nel corso di questi ultimi anni, l'eziologia multifattoriale, la complessità della patogenesi e la mancanza di terapie risolventi riservano a questa patologia una posizione di rilievo negli attuali studi di ricerca.

In questo lavoro di tesi in un modello sperimentale di ischemia e riperfusione intestinale nel topolino è stato indagato il ruolo svolto dall'istamina nella patogenesi del danno associato ad una condizione di ischemia mesenterica acuta. La principale fonte intestinale di istamina è rappresentata dalla degranolazione dei mastociti mucosali. I risultati hanno dimostrato che il trattamento con il Cromolyn, uno stabilizzatore dei mastociti, ha esercitato un effetto protettivo sul reclutamento granulocitario che segue un evento ischemico intestinale. Sulla base di queste indicazioni, sembra logico ritenere che l'istamina liberata in risposta alla degranolazione dei mastociti possa contribuire alla patogenesi del danno da ischemia e riperfusione intestinale. Infatti, abbiamo evidenziato che l'istamina svolge un ruolo determinante durante le prime ore di riperfusione mediante l'attivazione del recettore H₄ il cui blocco è il solo in grado di svolgere un effetto protettivo e preventivo nei confronti della chemiotassi dei granulociti neutrofili.

Nel presente lavoro, in un analogo modello di infiammazione intestinale, è stato dimostrato che anche le proteasi svolgono un ruolo decisivo nella patogenesi di questa malattia. Infatti, è stata rilevata un'aumentata attività serin-proteasica nel plasma e nel tessuto intestinale associata al danno da ischemia e riperfusione. L'inibizione di questa attività protegge l'intestino dall'infiltrazione granulocitaria post-ischemica ed aumenta il grado di sopravvivenza degli animali. Inoltre, abbiamo dimostrato che l'effetto proinfiammatorio delle proteasi seriniche associate al danno tissutale dipende dall'attivazione del recettore PAR₁ e PAR₂.

Lo sviluppo di terapie complementari in grado di bloccare selettivamente l'attività del recettore istaminico H₄ e di inibire l'attività delle proteasi seriniche può rappresentare un ulteriore approccio terapeutico nella prevenzione del danno locale e sistemico determinato da una condizione di ischemia e riperfusione intestinale.

Ai miei genitori

INDICE

CAPITOLO I - Introduzione

1.1. L'ischemia mesenterica acuta	1
1.1.1. Anatomia della macro e micro circolazione intestinale	1
1.1.2. Eziologia	4
1.1.3. Fisiopatologia	5
1.1.4. Mediatori coinvolti	6
1.1.5. Conseguenze sistemiche	12
1.1.6. Strategie protettive	13

CAPITOLO II - Contributo dell'istamina nel danno post-ischemico intestinale

2.1. L'istamina e i suoi recettori	16
2.2. I mastociti	22
2.2. Scopo della ricerca	26
2.3. Materiali e metodi	27
2.4. Risultati	32
2.5. Discussione	39

CAPITOLO III - Contributo delle proteasi seriniche nel danno post-ischemico intestinale

3.1. Proteasi & pars (protease-activated receptors)	43
3.1.1 Meccanismo d'azione dei PARs	44
3.1.2. Meccanismo di trasduzione del segnale	46
3.1.3. Meccanismo di disattivazione dei PARs	47
3.1.4. Protease-activated receptor statin	48
3.1.5. PARs nell'intestino: espressione e funzione	48
3.1.6. Proteasi seriniche intestinali	51
3.2. Scopo della ricerca	52
3.3. Materiali e metodi	53
3.4. Risultati	58
3.5. Discussione	68

BIBLIOGRAFIA	74
--------------	----

CAPITOLO I

INTRODUZIONE

1.1. L'ischemia mesenterica acuta

L'ischemia mesenterica acuta, come tutti i processi ischemici, è una condizione patologica causata dallo scompensamento tra la perfusione di ossigeno al distretto intestinale da una parte e la domanda metabolica tissutale dall'altra. Nel corso di questi ultimi anni, a causa essenzialmente del numero crescente di pazienti anziani o colpiti da malattie cardiovascolari, l'incidenza di questa patologia è in aumento rappresentando circa 1/1000 di tutte le ospedalizzazioni e da 1 a 2/100 delle ospedalizzazioni per dolori addominali. Nonostante l'incidenza relativamente bassa, l'ischemia mesenterica acuta è un'emergenza addominale fatale dal 60 e all'80% dei casi ed è associata principalmente alla chirurgia addominale, al trapianto intestinale, al bypass cardiopolmonare, all'ernia strangolata o all'enterite necrotizzante neonatale.¹ La prognosi incerta, l'elevata mortalità, l'approccio multidisciplinare e la mancanza di terapie risolventi riservano a questa patologia una posizione di rilievo negli attuali studi di ricerca.

1.1.1. Anatomia della macro e micro circolazione intestinale

La circolazione splanchnica arteriosa è assicurata da tre vasi principali che traggono origine comune dall'aorta addominale: l'arteria celiaca (CA), l'arteria mesenterica superiore (SMA) e l'inferiore (IMA). Ciascuno di questi assi arteriosi irrorava un distretto intestinale specifico. Inoltre, una serie di rami arteriosi collaterali, più o meno sviluppati da un individuo all'altro, fungono da sistema di redistribuzione dell'apporto di sangue permettendo di minimizzare le conseguenze di un eventuale evento ischemico (Tabella 1). Malgrado questa vascolarizzazione collaterale, esiste una zona intestinale critica più sensibile ad un eventuale debito di ossigeno: si tratta della parte centrale dell'intestino

tenue e della giunzione retto-sigmoidea. Il sistema venoso è generalmente parallelo al sistema arterioso e le vene mesenteriche superiori e inferiori si uniscono per partecipare alla formazione della vena porta.

L'irrorazione splancnica arteriosa riceve circa il 25% della gettata cardiaca (35% nel periodo post-prandiale) a fronte di un distretto anatomico che rappresenta solamente il 5% del peso del corpo. La gittata cardiaca è uniformemente ripartita tra l'arteria celiaca e l'arteria mesenterica superiore, e destinata solo in misura minoritaria all'arteria mesenterica inferiore. Peraltro, la distribuzione del flusso sanguigno ai tessuti intestinali non è uniforme: il 70 % è destinato alla mucosa intestinale, caratterizzata da un'intensa attività metabolica, il 5% alla sottomucosa e circa il 25% allo strato muscolare e alla tonaca sierosa.

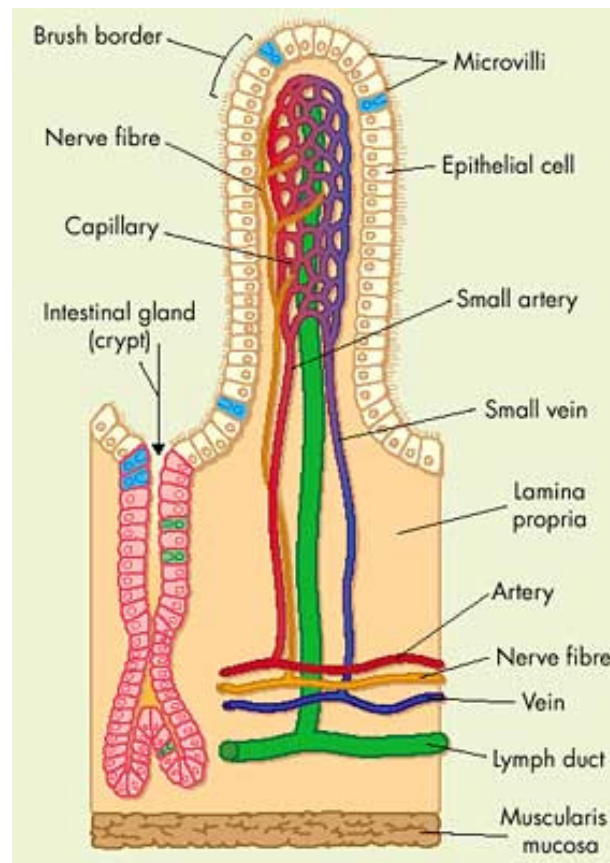
Tabella 1 – Vascolarizzazione splancnica nell'uomo.

Vasi principali	Rami arteriosi collaterali	Territori vascolarizzati
Tronco celiaco	Arteria gastrica sinistra	Stomaco, duodeno, pancreas, milza, fegato.
	Arteria epatica comune	
	Arteria splenica	
Arteria mesenterica superiore	Arteria pancreatico-duodenale inferiore	Digiuno, ileo, pancreas, colon trasverso, ascendente e flessura destra.
	Arteria colica media	
	Arteria colica destra	
	Arterie digiunali e ileali	
Arteria mesenterica inferiore	Arteria colica sinistra	Colon trasverso, flessura sinistra, colon discendente prossimale, retto.
	Arterie sigmoidee	

(da Seguin & Malledant, Urgence Pratique – 2007 n°83)

La vascolarizzazione dei villi intestinali è molto particolare. L'apporto di sangue arterioso è basato sulla presenza di un'arteriola centrale afferente che dà origine ad un fitto letto capillare che la circonda. Quest'ultimo ridiscende tutta la lunghezza dell'arteriola, fa capo a delle venule post-capillari e queste, in seguito, ad una venula efferente (Figura 1). Tale sistema favorisce la creazione di una controcorrente artero/venosa che permette la

Figura 1 –Struttura di un villo intestinale.



(da <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/V/villus.html>)

diffusione di ossigeno dalle arteriole alle venule bypassando la sommità del villo. Questo fenomeno determina l'origine di un gradiente di concentrazione d'ossigeno tra la base e la sommità del villo dell'ordine dei 10 mmHg. Durante un evento ischemico lo scambio controcorrente genera una condizione di ipossia maggiore alla sommità che alla base del villo e ciò spiega perché le lesioni ischemiche iniziali interessino tipicamente la sommità dei villi intestinali.^{2,3}

1.1.2. Eziologia

Le cause più frequenti di ischemia intestinale acuta sono associate a disordini del sistema cardiovascolare quali la formazione di emboli o trombi arteriosi che interessano principalmente l'arteria mesenterica superiore (SMA), ma anche quella inferiore (IMA); più raramente trombi venosi. Altresì condizioni ischemiche non occlusive possono essere responsabili di questa patologia (Tab. 2).

La formazione di un embolo arterioso è la causa più frequente, rappresentando il 40% dei casi. La maggior parte degli emboli origina da trombi delle cavità cardiache di sinistra o da lesioni valvolari. I trombi sono a loro volta dovuti ad aritmie (fibrillazione atriale) o alla presenza di aree discinetiche successive ad infarto miocardico o ad altre affezioni cardiache (cardiomiopatie dilatative). Circa il 15% degli emboli si arresta all'origine dell'arteria mesenterica superiore, ma la maggior parte si colloca a 3-10 cm da tale punto, poco oltre l'origine dell'arteria colica media. Quasi sempre vi è concomitante embolizzazione di altri distretti arteriosi.

La formazione di un trombo arterioso, responsabile del 30% dei casi di ischemia mesenterica acuta, è solitamente associata a lesioni aterosclerotiche e si verifica spesso all'origine dei vasi. La lesione ateromastica progredisce lentamente negli anni, fino al raggiungimento di un limite critico di stenosi. A questo punto, è sufficiente una riduzione del flusso per favorire l'improvvisa trombizzazione della parte del lume rimasta pervia.

La trombosi venosa costituisce una rara evenienza, stimata intorno al 10%. Il tasso di mortalità a lungo termine risulta particolarmente elevato, pari a 83%. Può essere interessata direttamente la vena mesenterica superiore o l'occlusione può verificarsi a livello portale. Inoltre, si distinguono forme primitive, idiopatiche, da forme secondarie a varie affezioni, sistemiche o locali. L'occlusione venosa si traduce in una stasi ematica che impedisce il regolare flusso arterioso e provoca congestione capillare, emorragia sottomucosa ed infarto intestinale.

A tutt'oggi poco conosciuta, la patogenesi dell'ischemia mesenterica non occlusiva (20%) è la conseguenza di un deficit di flusso a cui fa seguito una vasocostrizione mesenterica. Si verifica in seguito a deficit della pompa cardiaca, shock, emoconcentrazione, somministrazione di farmaci e sostanze ad azione vasocostrittiva (digitale, cocaina ecc.) e può complicare interventi cardiocirurgici.⁴

Tabella 2 – Eziologia dell'ischemia mesenterica.

Causa	Manifestazione	Fattori di rischio
Embolo arterioso	Acuta	Aritmia, infarto, endocardite cardiomiopatie, aneurismi ventricolari.
Trombo arterioso	Patogenesi insidiosa con dolore costante e crescente	Aterosclerosi, ipotensione, estrogeni, ipercoagulabilità.
Non occlusiva	Acuta/subacuta	Ipovolemia, ipotensione, insufficienza cardiaca, agonisti α -adrenergici, digossina, β -bloccanti.
Trombo venoso	Subacuta	Epato-splenomegalia, epatite, pancreatite, infezioni, chirurgia addominale.

(da Oldenburg et al., Arch Intern Med 2004)

1.1.3. Fisiopatologia

Qualunque sia la causa, quando la perfusione ematica mesenterica diminuisce, grazie all'apertura degli sfinteri pre-capillari aumenta la densità dei capillari perfusi e la disponibilità tissutale di ossigeno (O_2). Ciò contribuisce a migliorare la tolleranza dell'intestino all'ischemia mantenendo inizialmente costante il consumo tissutale di O_2 .² Tuttavia, il superamento della soglia critica, al di sopra della quale le capacità di compenso sono oltrepassate, determina l'instaurarsi delle prime lesioni cellulari. L'intensità e la durata dell'evento ischemico condiziona l'importanza del danno prodotto.⁵

La carenza di O_2 dovuta alla condizione ischemica determina innanzitutto il blocco del metabolismo aerobio e la conseguente mancata produzione di adenosina trifosfato (ATP). L'accumulo di metaboliti tossici e la compromissione della fosforilazione ossidativa influisce negativamente sul funzionamento delle pompe ioniche di membrana Na^+/K^+ ATP-dipendenti, determinando la compromissione dell'omeostasi cellulare e le prime alterazioni tissutali. Gli ioni sodio, accumulandosi all'interno della cellula, richiamano acqua per osmosi e determinano un rigonfiamento dannoso per la sopravvivenza cellulare. L'alterazione delle pompe ioniche produce inoltre un aumento di Ca^{++} intracellulare, non solo per un maggiore afflusso dello ione dall'esterno, ma anche a causa del mancato uptake nel reticolo endoplasmatico. L'alterazione dell'omeostasi del calcio, a seguito di un aumento citosolico dello ione, provoca l'attivazione di una serie di enzimi come le

fosfolipasi, endonucleasi e ATP-asi che danneggiano la membrana fosfolipidica sia esterna sia degli organelli intracellulari. ⁶

La riperfusione che segue un evento ischemico da un lato permette il ripristino del metabolismo aerobio, la rimozione delle sostanze tossiche ed un progressivo ritorno alle normali funzioni cellulari, ma dall'altro scatena una serie di processi ossidativi e infiammatori paradossalmente ancor più lesivi dell'ischemia stessa (*oxygen paradox*). Questo fenomeno determina la formazione anormale di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS), il rilascio di mediatori dell'infiammazione e la chemiotassi di granulociti neutrofili. Inoltre, i leucociti attivati, le cellule endoteliali, i monociti, i mastociti e le piastrine rilasciano a loro volta ROS e una varietà di mediatori dell'infiammazione dal TNF- α al fattore attivante piastrinico (PAF) ai leucotrieni (LT) generando una sorta di circolo vizioso che aumenta esponenzialmente la risposta infiammatoria. ⁶

1.1.4. Mediatori coinvolti

Formazione dei radicali liberi dell'ossigeno

Evento fondamentale nella patogenesi del danno da ischemia e riperfusione (ischemia/reperfusion injury, IRI) è la produzione dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS): l'anione superossido (O_2^-), il perossido d'idrogeno (H_2O_2) e il radicale ossidrile ($OH\cdot$). I ROS non sono altro che molecole con un singolo elettrone spaiato nell'orbitale più esterno, perciò altamente instabili. Prodotti in grandi quantità, queste molecole svolgono multiple azioni cellulari deleterie a causa della loro reattività nei confronti di proteine, carboidrati, ma soprattutto degli acidi grassi che costituiscono i fosfolipidi di membrana. Il danno provocato è in grado di propagarsi (perossidazione lipidica) mediante una reazione a catena, in quanto i lipidi, privati degli elettroni, tendono a reintegrarne la mancanza sottraendoli alle molecole contigue, con compromissione dell'integrità delle membrane cellulari e subcellulari. Il danno si estende ad altre macromolecole fino a coinvolgere le proteine del nucleo e il DNA. Inoltre, i ROS giocano un ruolo importante nel reclutamento dei leucociti circolanti essenzialmente a partire dalle venule post-capillari.

Durante la riperfusione la concentrazione di ROS aumenta senza controllo e i sistemi antiossidanti fisiologici, tra cui enzimi come la superossido dismutasi (SOD), la catalasi e la glutatione perossidasi, non riescono a neutralizzarne l'eccesso.

L'aumento di Fe^{2+} , che si verifica a causa dell'instabilità delle membrane lisosomiali e dell'abbassamento del pH cellulare che inibisce il legame dei metalli di transizione alle loro proteine carriers, catalizza ulteriormente la formazione di radicali liberi attraverso la reazione di Fenton:



a sua volta promotrice di quella di Haber-Weiss;



L'attività dell'enzima Xantina Ossidasi (XO) e della NO-sintasi (NOS) è tra le principali fonti di ROS. In condizioni fisiologiche l'ipoxantina, formata dal catabolismo dell'ATP, è convertita in xantina dall'enzima Xantina Deidrogenasi (XDH). Durante l'ischemia si verifica un aumento di calcio intracellulare che, attraverso il taglio proteolitico, favorisce la conversione della XDH in XO, portando ad un accumulo di ipoxantina. Con la riperfusione e il ritorno dell'ossigeno, l'ipoxantina e la XO accumulate trovano le condizioni ottimali per reagire e produrre una cascata di radicali dell'ossigeno, in particolare l'anione superossido e il perossido d'idrogeno.¹

Il monossido di azoto (NO) è sintetizzato da una famiglia di enzimi chiamata NO-sintasi (NOS) che converte l'amminoacido L-arginina in NO e citrullina. Il ruolo dell'NO, è ambivalente e ancora controverso. Le piccole quantità di NO prodotto fisiologicamente dalle forme costitutive dell'NOS (nNOS ed eNOS) giocano un ruolo protettore durante la fase acuta dell'ischemia e riperfusione e la loro inibizione aggrava le lesioni tissutali.⁷ Infatti, l'NO prodotto in quantità fisiologiche è importante nel ridurre il tono muscolare arteriolare, nell'inibire l'aggregazione piastrinica, nel minimizzare l'interazione tra leucociti e cellule endoteliali e nel prevenire la formazione di mediatori attivanti il fattore NF-kB.^{8,9} Al contrario, la produzione di grandi quantità di NO ma soprattutto del suo principale intermedio reattivo il perossinitrito (ONO_2^-), durante una fase più tardiva di ischemia e riperfusione da parte dell'isoforma inducibile della NOS (iNOS), aggrava la perossidazione lipidica di membrana ed è fonte ulteriore di ROS. Topi knock-out per l'isoforma inducibile della NOS si sono rivelati più resistenti al danno da ischemia e riperfusione e alla traslocazione batterica.¹⁰ Più recentemente è stato dimostrato che l'inibizione dell'iNOS riduce le lesioni associate all' ischemia e riperfusione intestinale nei ratti.¹¹

Neutrofili polimorfonucleati (PMNs)

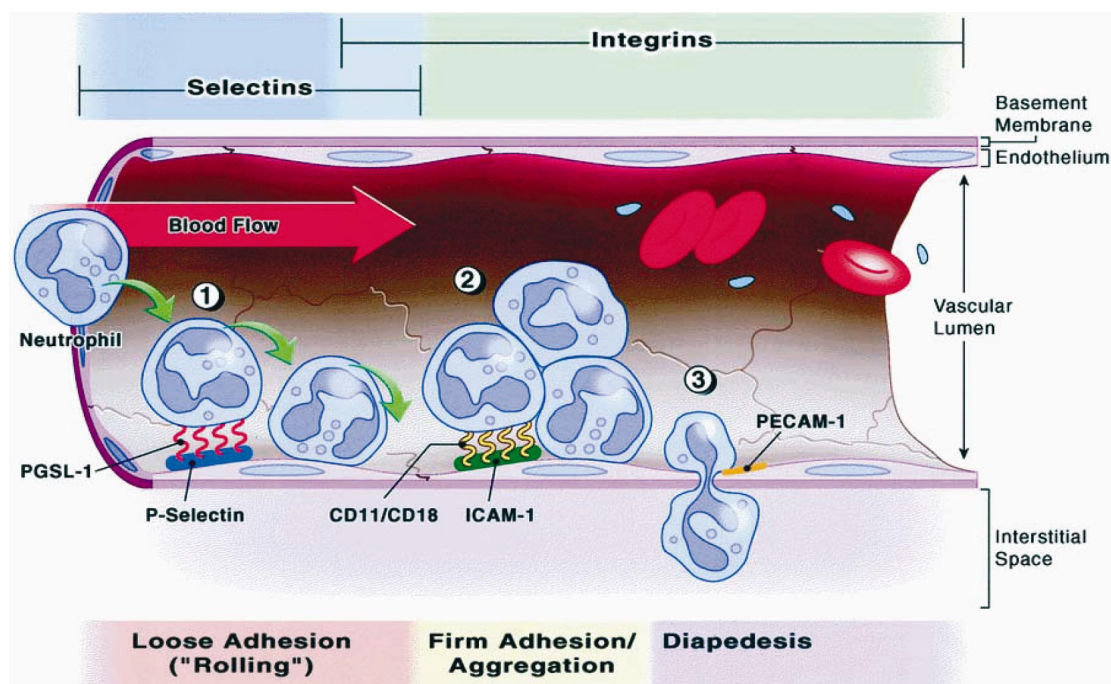
L'infiltrazione leucocitaria di granulociti neutrofili (PMNs) partecipa in maniera determinante alla patogenesi nell'intestino del danno da ischemia e riperfusione. La loro migrazione dai vasi allo spazio tissutale interstiziale è indice del danno tissutale e viene valutata in ambito sperimentale misurando l'attività dell'enzima Mieloperossidasi (MPO) contenuto nei granuli azzurrofilari e liberato durante la risposta infiammatoria. L'MPO agisce come un potente agente microbicida che catalizza la formazione di un potente ossidante, l'acido ipocloroso (HClO), in presenza di ossigeno attivo (H₂O₂) e ioni Cl⁻.

Il richiamo granulocitario nel sito infiammatorio conseguente al danno ischemico sopraggiunge pochi minuti dopo l'inizio della riperfusione e si mantiene elevato per ore. La produzione di leucotrieni (LT), di ROS e il rilascio nel circolo sistemico di sostanze chemiotattiche determina un aumento della permeabilità vasale e induce l'espressione endoteliale di molecole di adesione (selectine e integrine) che permettono ai neutrofili di rotolare sulla superficie endoteliale, di aderire agli endoteli delle venule post-capillari e di migrare per diapedesi nello spazio interstiziale (Fig. 2). A questo punto i neutrofili possono espletare le loro funzioni che consistono nella produzione di metaboliti dell'acido arachidonico, degranolazione e secrezione di enzimi proteolitici (elastasi, catepsina G, proteinasi 3),¹² di perossidasi (MPO). Partecipando alla produzione di ROS ("burst" respiratorio) contribuiscono ed esacerbano la risposta infiammatoria in una sorta di processo autocatalitico.^{1,13}

NF-κB

Il fattore di trascrizione NF-κB (Nuclear factor-kappaB) controlla l'espressione di geni codificanti per numerose proteine proinfiammatorie coinvolte nel danno da ischemia e riperfusione. Quando non è attivo l'NF-κB si trova nel citoplasma complessato ad una proteina inibitoria IκBα. Una varietà di segnali extracellulari può attivare l'enzima IκB kinase (IKK) che a sua volta fosforila la proteina IκBα determinandone l'ubiquitinazione e degradazione. In questo modo NF-κB viene reso disponibile e attivo. L'NF-κB trasloca nel nucleo dove si lega a specifiche sequenze del DNA denominate *response elements* (RE). Il complesso DNA/NF-κB attrae altre proteine quali i coattivatori e l'RNA polimerasi che trascrive il DNA in mRNA. L'mRNA come noto è esportato nel citoplasma e tradotto in proteina. La riperfusione, attraverso la produzione di citochine e ROS, induce l'attivazione

Figura 2 – Tappe della migrazione dei granulociti neutrofili verso siti flogistici



Durante il periodo di **marginazione** il flusso sanguigno rallenta (in conseguenza dell'aumento della permeabilità vascolare) permettendo ai leucociti di posizionarsi lungo la parete del vaso. Il **rotolamento** dei leucociti lungo l'endotelio è permesso dalle deboli adesioni transitorie tra selectine (P/E-selectine) sulla superficie endoteliale e le selectine espresse costitutivamente sui leucociti (L-selectine). L'**adesione** leucocitaria salda è garantita grazie all'interazione tra specifiche molecole di adesione le integrine (CD11/CD18) che legano i recettori endoteliali ICAM-1 e VCAM-1. Solo ora, i leucociti inseriscono i loro pseudopodi nelle giunzioni tra le cellule endoteliali e oltrepassano la membrana basale per migrare verso gli spazi extravascolari (**diapedesi**).

(da Mallick et al., *Dig. Dis. Sci.* 2004)

e la traslocazione all'interno del nucleo dell'**NF- κ B** consentendo l'espressione di enzimi inducibili come l'iNOS, la PLA2 (fosfolipasi A2), la COX2 (cicloossigenasi-2) o l'espressione di citochine (TNF- α , IL-1, IL-6) e molecole di adesione (ICAM-1, VCAM-1, P-selectina, E-selectina).¹⁴

L'attivazione dell'**NF- κ B** è stata dimostrata in diversi modelli sperimentali di ischemia e riperfusione che interessano vari distretti incluso quello intestinale. Recentemente è stato messo in evidenza che l'inibizione dell'**NF- κ B** previene l'aumento sistemico di TNF- α riducendo di conseguenza la risposta infiammatoria in un modello di ischemia e riperfusione intestinale nel topolino.¹⁵ Altri studi, tuttavia, dimostrano che l'inibizione dell'**NF- κ B** può determinare un danno apoptotico alla mucosa riperfusa. Ciò suggerisce una duplice funzione del sistema NF- κ B che risulta responsabile sia della generazione che della risoluzione del danno da ischemia e riperfusione.¹⁶

Sistema del complemento

Il sistema del complemento consiste in un insieme di proteine plasmatiche e di membrana che una volta attivate generano una cascata enzimatica che amplifica la risposta immunitaria dell'organismo. L'attivazione della via classica del complemento nella patogenesi del danno da ischemia e riperfusione intestinale è ben documentata:¹⁷ l'attivazione del sistema incrementa la produzione di anione superossido e allo stesso tempo diminuisce i livelli di superossido dismutasi (SOD) aumentando di fatto il danno da radicali con un duplice meccanismo.

In animali sottoposti a ischemia e riperfusione intestinale il trattamento con un inibitore del complemento, il composto sCR1, ha significativamente attenuato il danno mucosale, la permeabilità vascolare e ha incrementato il grado di sopravvivenza. Il trattamento con anticorpi contro la frazione C5 ha diminuito l'attività mieloperossidasi polmonare e intestinale post-ischemica. Inoltre, impedendo la traslocazione nucleare dell'NF- κ B, il trattamento ha inibito l'aumento dell'espressione di molecole di adesione (ICAM-1) o di citochine proinfiammatorie (TNF- α , IL-1, INF- γ) conseguente il danno ischemico.^{18,19}

Piastrine

Non solo i PMNs e le cellule endoteliali, ma anche le piastrine sono coinvolte nella patogenesi del danno post-ischemico. Le piastrine, in modo analogo ai PMNs, rotolano e aderiscono all'endotelio vascolare mediante l'interazione con le P-selectine endoteliali. La formazione di tappi di fibrina, l'aggregazione piastrinica, l'adesione leucocitaria unita ad una fuoriuscita di plasma dai vasi determinano facilmente la formazione di coaguli che ostruendo il microcircolo rendono, di fatto, più esteso il danno ischemico (fenomeno del "*no-reflow*").²⁰ Pur essendo anucleate, una volta attivate, le piastrine possono produrre ROS, rilasciare sostanze pro-infiammatorie come il trombossanoA₂, leucotrieni, PAF (fattore attivante le piastrine) e serotonina.

PAF (fattore attivante le piastrine)

Il PAF è un mediatore di natura fosfolipidica prodotto da diversi tipi cellulari come le piastrine, i basofili, i neutrofili o le cellule endoteliali. Il PAF è responsabile dell'attivazione e dell'aggregazione piastrinica, della chemiotassi e attivazione leucocitaria, della vasodilatazione e dell'aggravarsi della cascata ossidativa. Alcuni studi dimostrano che l'evento ischemico inibisce l'attività della PAF-acetilidrolasi aumentando i livelli di PAF e amplificandone gli effetti biologici in modo da determinare una maggiore espressione delle molecole d'adesione ICAM-1, un aumento della secrezione di IL-6 e una diminuzione di IL-10.⁶

Linfociti B e T

Se da anni è stato stabilito che le cellule dell'immunità innata come i PMNs partecipano al danno da ischemia e riperfusione intestinale, solo recenti evidenze dimostrano che anche i linfociti e quindi che anche l'immunità cellulo-mediata gioca un ruolo importante nella patofisiologia del danno post-ischemico. Nel topolino è stato dimostrato che i linfociti T esercitano un ruolo fondamentale nelle prime fasi dell'ischemia e riperfusione intestinale attraverso la produzione della citochina proinfiammatoria IL-17.²¹ È noto che i linfociti B contribuiscono alla produzione di anticorpi che si legano alle cellule danneggiate dal danno ischemico e fissano il complemento. È stato anche dimostrato che i linfociti B possono concorrere al danno tissutale attraverso un meccanismo anticorpo-indipendente: i linfociti B invadono il tessuto intestinale danneggiato in risposta alla produzione della chemochina CXCL13 e la loro deplezione protegge il tessuto intestinale dallo sviluppo del danno da riperfusione.²²

Altri mediatori

Un processo coinvolto nel danno da ischemia e riperfusione intestinale è la liberazione di **serotonina** (5-idrossi-triptamina). Quest'ammina bioattiva, ampiamente distribuita a livello periferico, è sintetizzata dai neuroni del sistema nervoso enterico (SNE), dagli enterociti mucosali (ECs) oltre che dai mastociti o accumulata nelle piastrine circolanti. Esperimenti in vivo su topi hanno dimostrato che l'uso dell'antagonista 5HT_{2A} (ketanserina) previene l'infiltrazione dei leucociti, l'aggregazione piastrinica e l'alterazione della permeabilità vasale causate da una condizione di ischemia e riperfusione intestinale.²³

TNF- α è una citochina proinfiammatoria ampiamente rilasciata dai macrofagi, monociti, linfociti e mastociti in corso di infiammazione. Questa citochina gioca un ruolo cruciale nella chemiotassi granulocitaria e nella mortalità associata a modelli sperimentali di ischemia e riperfusione. Il trattamento di ratti con anticorpi anti-TNF- α ha dimostrato prevenire la diapedesi granulocitaria e il danno tissutale conseguente ad un evento ischemico intestinale.

Il ruolo dell'**IL-10**, una citochina anti-infiammatoria prodotta principalmente dai monociti e in misura minore dai linfociti, nell'ischemia e riperfusione è ancora controverso. Infatti, studi su animali knock-out per l'IL-10 suggeriscono che una somministrazione della stessa esercita un effetto antiinfiammatorio durante il danno da riperfusione.^{24,25} Altri studi dimostrano invece che questa citochina non gioca un ruolo determinante a livello locale o sistemico, ma addirittura aumenta il danno mucosale associato alla risposta infiammatoria post-ischemica.^{26,27}

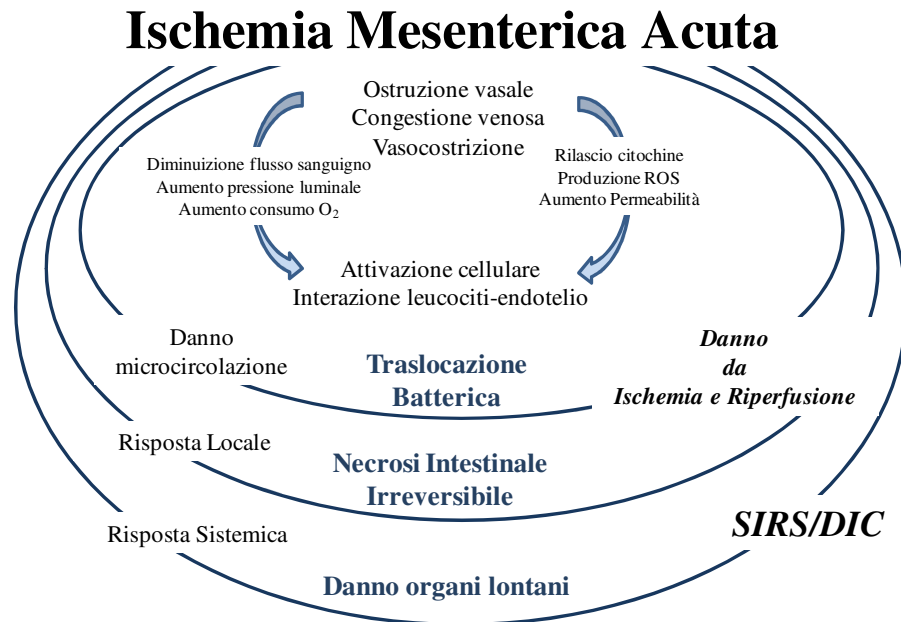
1.1.5. Conseguenze sistemiche

Le principali conseguenze sistemiche (Fig. 3) di uno stato di ischemia e riperfusione intestinale riguardano, innanzitutto, l'alterazione della funzione assorbente dell'intestino e la conseguente diminuzione della capacità di assimilare le sostanze nutritive. Inoltre, l'aumento della permeabilità mucosale, causata dall'infiammazione e dal danno alle membrane permette ai batteri, costituenti la flora endogena intestinale, di oltrepassare la barriera mucosale ed essere trasportati verso gli organi linfatici (milza e linfonodi) e di conseguenza verso tutti gli altri distretti dell'organismo attraverso il circolo sanguigno. La disseminazione batterica è all'origine di un possibile stato di sepsi e di shock.

La produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), di citochine infiammatorie e la sepsi seguente alla traslocazione batterica contribuiscono allo sviluppo di una sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS) che può progredire fino ad uno stato di "*multiple organ failure*" (MOF), una condizione patologica potenzialmente letale in cui tutti gli organi subiscono un grave scompenso. La MOF è caratterizzata da una disfunzione del sistema immunitario, dall'attivazione della cascata della coagulazione che predispone ad eventi trombotici e alla coagulazione intravasale disseminata (CID). L'organo più frequentemente colpito dalle conseguenze del danno da ischemia e riperfusione intestinale

è il polmone in quanto sensibile all'infiltrazione di granulociti neutrofilici e coinvolto nella sindrome respiratoria acuta (ARDS) dalle conseguenze fatali.⁶

Figura 3 - Conseguenze locali e sistemiche dell'ischemia mesenterica acuta.



(modificata da Yasuhara et al., Surg. Today 2005)

1.1.6. Strategie protettive

Diversi potenziali approcci terapeutici sono stati proposti e sperimentati con successo in modelli animali per il trattamento del danno da ischemia e riperfusione intestinale.

Tra le terapie più efficaci annoveriamo:

- Preconditioning ischemico
- Terapia con antiossidanti
- Terapia anticomplemento
- Terapia antileucocitaria
- Ipotermia
- Utilizzo di perfluorocarboni

Il **precondizionamento ischemico** (IPC) consiste nell'esporre il tessuto intestinale a uno o multipli brevi periodi di ischemia rendendo il tessuto resistente nei confronti di un successivo evento ischemico più prolungato. L'effetto protettivo dell'IPC fu descritto per la prima volta nel 1986 da Murry²⁸ e i suoi collaboratori mediante studi sul cuore di cane. Solo nel 1996 da Hotter tale effetto fu dimostrato anche a livello intestinale.²⁹

Gli effetti protettivi dell'IPC possono essere distinti in due diverse fasi in base alla durata e meccanismo d'azione: la prima fase è definita "precondizionamento classico o acuto" (*early IPC*) e si manifesta immediatamente dopo il primo breve periodo ischemico durando circa 2-3 ore. Una seconda fase di protezione è detta di "precondizionamento tardivo" (*late IPC*) e inizia 12-24 ore dopo l'insulto ischemico mantenendosi per circa 3-4 giorni. Mentre il preconditionamento acuto si manifesta entro pochi minuti e opera mediante una modulazione diretta di specifiche funzioni cellulari (stimolazione della fosfolipasi C, attivazione della proteina chinasi C), la fase tardiva di protezione richiede una sintesi *de novo* di proteine tramite l'attivazione di geni che codificano per enzimi come l'NOS enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi.¹

La disponibilità fisiologica di **antiossidanti** endogeni non è tale da neutralizzare la grande quantità di specie radicaliche che si formano a seguito del danno da ischemia e riperfusione. L'utilizzo di antiossidanti esogeni come l'allopurinolo, superossido dismutasi, chelanti del ferro, etanolo, acido ascorbico, tocoferolo è risultato utile in diversi studi in vari modelli animali.¹

La **terapia anticomplemento** consiste nel trattamento del danno da ischemia e riperfusione attraverso l'inibizione del complemento o la deplezione dello stesso. Con successo è stata sperimentata nei roditori la somministrazione di antagonisti della componente C5a del complemento o di anticorpi monoclonali anti-C5. Questi approcci terapeutici hanno protetto nei confronti del danno da ischemia e riperfusione nei roditori diminuendo il rilascio di TNF- α e il conseguente danno tissutale.^{30,31}

Lo scopo di una **terapia antileucitaria** può essere raggiunto attraverso tre diverse strategie. La prima è quella di inibire l'attivazione leucocitaria attraverso la somministrazione di antagonisti di mediatori proinfiammatori che attraggono e attivano i leucociti (antagonista del TNF- α ³², antagonista LTB4³³). La seconda consiste nell'inibire la sintesi di molecole di adesione attraverso la somministrazione di sostanze in grado di

regolare la loro trascrizione genica e proteica (inibitore NF- κ B)¹⁵. La terza strategia consiste nel limitare l'adesione dei leucociti all'endotelio utilizzando anticorpi monoclonali diretti contro le molecole di adesione sugli endoteli vascolari.³⁴

L'**ipotermia** intestinale sperimentalmente indotta nei ratti (mantenendo la temperatura tissutale tra i 15-20°C) si è dimostrata capace di proteggere la mucosa intestinale dal danno associato all'ischemia mesenterica. Sebbene il meccanismo rimanga non del tutto conosciuto è probabile che la protezione venga garantita attraverso un meccanismo polifattoriale: ridotto consumo di ossigeno e ATP, ridotta formazione di ROS e una ridotta attivazione dell'NF- κ B.³⁵

I **perfluorocarboni (PCFs)** sono idrocarburi in cui alcuni degli atomi d'idrogeno sono sostituiti con atomi di fluoro. Queste molecole sono caratterizzate da una costante di legame dell'ossigeno bassa e sono infatti capaci di trasportare da 40 a 50 ml di ossigeno per 100 ml di soluzione, cioè più del doppio della quantità di ossigeno che l'emoglobina interamente saturata trasporta fisiologicamente. Alcuni studi hanno dimostrato che i PCFs riducono il danno generato dall'ischemia e riperfusione intestinale. La somministrazione intraluminale di PCFs, ad esempio, preserva la funzionalità e l'integrità della mucosa intestinale. Il lavaggio peritoneale con PCFs riduce il danno polmonare e intestinale in seguito a ischemia mesenterica.^{1,36,37}

CAPITOLO II

CONTRIBUTO DELL'ISTAMINA NEL DANNO POST-ISCHEMICO INTESTINALE

2.1. L'istamina e i suoi recettori

L'istamina è un'ammina biogena primaria isolata e caratterizzata agli inizi del XX secolo. L'istamina si trova ampiamente distribuita in tutti i tessuti dell'organismo dei mammiferi e deriva dalla decarbossilazione dell'amminoacido istidina per opera di un enzima specifico chiamato istidina decarbossilasi (HDC). Sono riconosciuti due principali tipi di deposito di istamina: il primo è rappresentato dai mastociti e dai polimorfonucleati basofili dove è stoccata in forma inattiva all'interno di granuli citoplasmatici complessata con eparina e condroitin-solfato e rilasciata a seguito di vari stimoli immunologici o non-immunologici; il secondo deposito è rappresentato dalle cellule enterocromaffino-simili e dai neuroni istaminergici. Vi sono evidenze che l'istamina, in realtà, venga prodotta anche da molte cellule della linea emopoietica come le piastrine, i monociti/macrofagi, le cellule dendritiche, i neutrofili, i linfociti e da queste immediatamente secreta non appena sintetizzata (queste cellule non posseggono nel loro citoplasma granuli di deposito).³⁸ Tali cellule, infatti, a differenza di mastociti e basofili, presentano un'elevata attività della HDC, ma hanno un basso contenuto di istamina di deposito.^{39,40} Il patrimonio istaminico dei mastociti e dei basofili è coinvolto nei fenomeni allergici, nel processo infiammatorio e in generale in tutti i processi citolesivi. Diversamente, all'istamina non-mastocitaria sono state attribuite funzioni di tipo paracrino a livello gastrico e di tipo neurotrasmettitoriale a livello del SNC.

La maggiore parte dell'istamina è prontamente metabolizzata ad opera di due principali enzimi. La N τ -metiltransferasi metabolizza l'istamina a N τ -metilistamina poi successivamente ossidata dalla monoamino ossidasi B (MAO B) nel corrispondente

principale metabolita urinario: l'acido N τ -metilimidazolacetico. Il 15-30% dell'istamina viene invece metabolizzata dalla diammino-ossidasi in acido imidazolacetico.⁴⁰

Nel corso degli anni, è stato dimostrato che le attività biologiche dell'istamina si esplicano su molteplici sistemi e apparati, quali il sistema immunitario, ematopoietico, il sistema nervoso centrale e periferico, l'apparato gastrointestinale e cardiovascolare. È ormai evidente che in aggiunta agli effetti di neurotrasmettore modulatore a livello centrale e della risposta infiammatoria acuta nelle reazioni allergiche, l'istamina modula a diversi livelli la risposta immunitaria antigene-specifica ed è coinvolta nella modulazione di alcuni stati infiammatori cronici. L'istamina, infatti, partecipa alla maturazione delle cellule dendritiche, ne influenza la capacità di indurre la polarizzazione T-cellulare e di interferire sull'equilibrio della risposta Th1/Th2 (Fig. 4)^{41,42}

Le attività dell'istamina sono state attribuite all'interazione del mediatore con quattro diversi sottotipi recettoriali espressi sulla membrana cellulare (H₁, H₂, H₃, H₄). Tutti i recettori identificati appartengono alla superfamiglia dei recettori a 7 domini transmembrana accoppiati a proteine G (Tab. 4 e 5).

Il **recettore H₁** è accoppiato a proteine G_{q/11} e la sua attivazione determina la mobilitazione di ioni calcio (Ca⁺⁺) dai depositi intracellulari. Questo recettore è il principale responsabile delle reazioni allergiche, della contrazione della muscolatura liscia e dell'aumento della permeabilità vascolare. Localizzato a livello endoteliale, quando attivato, induce una marcata vasodilatazione tramite la liberazione di NO. La vasodilatazione H₁ mediata è rapida e di breve durata a differenza di quella H₂ mediata, più lenta e sostenuta. Esso è localizzato su varie cellule immunocompetenti e il suo livello di espressione cambia in corso di affezioni quali rinite allergica, miocardite autoimmune, artrite reumatoide e arterosclerosi.^{43,44} È stata descritta la possibilità che la proteina G $\alpha_{q/11}$, in seguito al legame dell'istamina sul recettore H₁, attivi il fattore di trascrizione NF-kB, responsabile della regolazione dell'espressione di molti geni codificanti per citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-1, IL-6, GM-CSF) e molecole di adesione (I-CAM, V-CAM, P-selectina).⁴⁵ Il recettore H₁ è in grado di attivare il fattore di trascrizione NF-kB sia in assenza di agonista (attività costitutiva) sia in presenza del ligando (attività agonista-dipendente). In particolare, la sub-unità G $\alpha_{q/11}$ e la sub-unità G- $\beta\gamma$ sono coinvolte entrambe nell'attivazione di NF-kB mediata dall'agonista, mentre l'attivazione costitutiva di NF-kB è mediata esclusivamente dalla sub-unità G- $\beta\gamma$.⁴⁶ È pertanto lecito ipotizzare che l'attività infiammatoria dell'istamina sia mediata anche dall'attivazione di NF-kB e che agonisti inversi del recettore H₁ possano avere un ruolo nella attenuazione della flogosi.

Figura 4 – L'istamina regola l'attività di cellule dendritiche e linfociti.

Linfociti B

H₁ inibisce immunità umorale, induce immunità cellulo-mediata
 H₂ inibisce immunità cellulo-mediata
 Topi H₁^{-/-} mostrano aumentata specificità IgE
 Topi H₂^{-/-} mostrano diminuita specificità IgE

Linfociti Th2

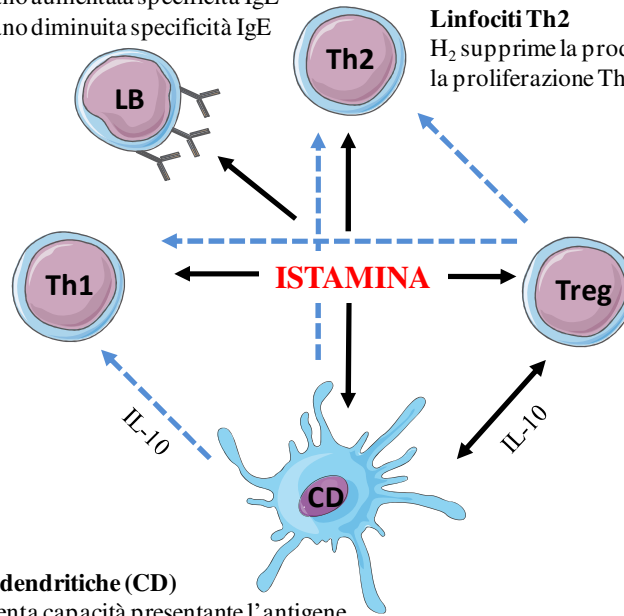
H₂ sopprime la produzione di IL-4, IL-13 e la proliferazione Th2

Linfociti Th1

H₁ aumenta produzione di IFN- γ e la proliferazione Th1
 H₂ antagonizza questi effetti

Linfociti T regolatori

L'istamina aumenta la produzione di IL-10 e potenzia l'effetto negativo del TGF- β attraverso H₂



Cellule dendritiche (CD)

H₁ aumenta capacità presentante l'antigene
 H₂ induce produzione di IL-10, sopprime la presentazione dell'antigene e agevola lo sviluppo di linfociti T che secernono IL-10
 H₄ è funzionalmente espresso e attiva CD della pelle

(da Jutel et al., *Clinical et Experimental Allergy* 2009)

Sulle cellule dendritiche sono espressi tutti e 4 i recettori istaminergici conosciuti. H₁ e H₃ mediano un'attività proinfiammatoria e aumentano la capacità presentante l'antigene, mentre il recettore H₂ inibisce questa capacità. Linfociti Th1 mostrano una predominante, ma non esclusiva espressione di recettore H₁, mentre linfociti Th2 esprimono maggiormente il recettore H₂. L'istamina stimola la produzione di IFN- γ da parte dei Th1. Il recettore H₂ dei Th₂ agisce principalmente come regolatore negativo della loro proliferazione e produzione di IL-4 e IL-13. L'istamina attraverso il recettore H₁ aumenta la risposta Th1 mediata mentre attraverso il recettore H₂ regola negativamente sia la risposta Th1 che la risposta Th2, dimostrando un ruolo essenziale nell'immunoregolazione. L'istamina stimola, inoltre, la produzione di anticorpi da parte dei linfociti B. Il recettore H₁ può bloccare la risposta immunomediata aumentando la produzione della citochina specifica dei Th1, l'IFN- γ . Al contrario, il recettore H₂ amplifica la risposta umorale. La produzione di IgE allergiche è regolata in maniera opposta dal recettore H₁ o H₂. Topi privi geneticamente del recettore H₁ mostrano un'aumentata produzione di IgE allergiche specifiche, mentre al contrario la delezione genetica del recettore H₂ sopprime la sintesi anticorpale.

Tabella 4 – Recettori istaminergici, espressione, segnale intracellulare e accoppiamento a proteine G.

Recettore	Localizzazione	Segnale Cellulare	Proteina G
H ₁	Neuroni, muscolatura liscia bronchiale, epatociti, condrociti, cellule endoteliali, cellule epiteliali, neutrofili, eosinofili, monociti, cellule dendritiche, linfociti T e B.	↑ Ca ⁺⁺ , GMPc, fosfolipasi D, fosfolipasi A2, NF-kB.	G _{q/11}
H ₂	Neuroni, muscolatura liscia bronchiale e vascolare, cellule parietali, epatociti, condrociti, cellule endoteliali, cellule epiteliali, neutrofili, eosinofili, monociti, cellule dendritiche, mastociti, linfociti T e B.	AMPc, c-Fos, c-Jun, PKC, p70S6K.	Gα _s
H ₃	Neuroni istaminergici e non istaminergici, eosinofili, monociti, cellule dendritiche, scarsa espressione nei tessuti periferici.	↑ Ca ⁺⁺ , MAP chinasi, inibizione AMPc.	G _{i/o}
H ₄	Elevata espressione nelle cellule midollari ed ematopoietiche periferiche, eosinofili e neutrofili, basofili, mastocellule, cellule T; scarsa espressione nei tessuti periferici, milza, timo, polmoni, intestino tenue, colon e cuore.	↑ Ca ⁺⁺ , inibizione AMPc.	G _{i/os}

(da Akdis et al., *Eur J Pharmacol* 2006)

Il legame tra **recettore H₂**, accoppiato a proteine G_s, e istamina attiva un segnale di trasduzione intracellulare che coinvolge sia i secondi messaggeri del sistema dell'adenilato ciclasi sia del fosfatidilinositolo bifosfato (PIP2). Il recettore H₂ si trova sulle cellule parietali gastriche, dove controlla la secrezione acida; inoltre, la sua attivazione è responsabile del rilascio della muscolatura liscia bronchiale e vasale e può influire sull'ino/cronotropismo cardiaco. In realtà, esso ha anche altre funzioni e interviene nella risposta immunitaria: al coinvolgimento di tale recettore istaminergico viene attribuita l'attività dell'istamina sulla differenziazione dei granulociti e sulla chemiotassi dei basofili. Al contrario, i recettori H₂ quando attivati da alte concentrazioni di istamina, hanno l'effetto di inibire la chemiotassi degli eosinofili.^{47,48} La stimolazione del recettore H₂ regola negativamente il rilascio di istamina da parte dei basofili e mastociti. L'attivazione

del recettore H₂ linfocitario inibisce la sintesi di anticorpi, la proliferazione di cellule T, la citolisi cellulo-mediata e la produzione di citochine.

Il **recettore H₃** (clonato solo nel 1999) è accoppiato generalmente a proteine G_i, è in grado di ridurre i livelli di AMPc e l'accumulo di Ca²⁺. Descritto, in origine, come recettore presinaptico presente sulle terminazioni nervose del sistema nervoso centrale (SNC) successivamente è stato identificato anche nel sistema nervoso periferico (SNP): esso esercita un controllo a feedback negativo su sintesi e secrezione dell'istamina, ⁴⁹ è coinvolto nel rilascio di istamina e di altri neurotrasmettitori quali acetilcolina, GABA, dopamina, noradrenalina, glutammato e serotonina.

A livello centrale i recettori H₃ sono distribuiti in diverse aree della corteccia e in nuclei sottocorticali (ipotalamo, ippocampo, cervelletto, *substantia nigra*) e la loro attivazione produce sedazione antagonizzando gli effetti eccitatori della stimolazione H₁. Nel tratto gastrointestinale prevengono la contrazione provocata dall'istamina attraverso i recettori H₁ e riducono la secrezione gastrica agendo in opposizione all'effetto H₂. Nell'albero respiratorio la loro stimolazione antagonizza l'effetto broncocostrittore dell'istamina H₁-mediato. La stimolazione H₃ interferisce inoltre con la vasocostrizione e il cronotropismo positivo simpatico. È stato ipotizzato che il contributo dei recettori H₃ nella risposta infiammatoria coinvolga l'inibizione della liberazione di neuropeptidi dai terminali delle fibre nervose afferenti responsabili della genesi della risposta infiammatoria neurogenica.⁴⁵

Anche il **recettore H₄** si accoppia a proteine G_i ed ha un'analogia con il recettore H₃, che supera il 68% se si considerano le similarità nelle proprietà fisico-chimiche dei diversi amminoacidi. Questo recettore si differenzia dal precedente per la localizzazione sito-specifica: il recettore H₄ è espresso a bassi livelli nell'encefalo, fegato e polmone, mentre è ampiamente distribuito nelle cellule ematopoietiche midollari e periferiche (eosinofili, neutrofilo) e sui mastociti. Il ruolo del recettore H₄, verso cui l'istamina presenta la massima affinità ³⁸, anche per la sua recente scoperta (2000), non è ancora del tutto chiaro; sembra che esso sia coinvolto nella risposta immunitaria e in particolare nella chemiotassi degli eosinofili indotta dall'istamina, nell'up-regulation delle molecole di adesione, nell'accumulo di mastociti nei tessuti interessati da flogosi allergica. È stata osservata la mancata chemiotassi in risposta alla somministrazione di istamina nei mastociti ottenuti da topi knock-out per il recettore H₄, mentre H₄ antagonisti come la tioperamide e il composto JNJ7777120 sono in grado di bloccare la migrazione di queste cellule indotta dall'istamina in topi wild type.^{50,51}

Seppure in modo contraddittorio, recenti pubblicazioni forniscono indicazioni circa il ruolo dell'istamina nello sviluppo delle lesioni conseguenti al danno ischemico intestinale⁵², ma anche cerebrale⁵³ ed epatico.^{54,55} Tuttavia, poiché la maggior parte di queste ricerche valutano gli effetti dell'istamina esogena, rimane ampiamente sconosciuto il ruolo dell'istamina proveniente dalla degranolazione mastocitaria nella partecipazione al danno da ischemia-riperfusion.

Tabella 5 – Ruolo dei recettori istaminergici.

	Recettore H₁	Recettore H₂	Recettore H₃	Recettore H₄
Funzione generale	Prurito, dolore, vasodilatazione, ↑ permeabilità vascolare, ipotensione; rossore, tachicardia, mal di testa, broncocostrizione, stimolazione del riflesso della tosse e dell'innervazione vagale afferente delle vie aeree, rallentamento della conduzione atrio-ventricolare.	Aumento secrezione acida gastrica, ↑ permeabilità vascolare, ipotensione; rossore, tachicardia, mal di testa, broncodilatazione, attività sull'ino/cronotropismo, ↑ produzione di muco.	Previene l'eccessiva broncocostrizione, prurito (non c'è coinvolgimento dei mastociti).	Differenziazione dei mieloblasti e pro mielociti.
Ruolo nella infiammazione allergica e nella modulazione della risposta immune	Aumenta il rilascio di istamina e di altri mediatori, l'espressione di molecole di adesione e la chemiotassi di eosinofili e neutrofilii; aumenta la capacità delle cellule presentanti l'antigene, co-stimola l'attività delle cellule B; aumenta i Th1, INF γ , diminuisce la risposta umorale e la produzione di IgE.	Diminuisce la chemiotassi di eosinofili e neutrofilii; diminuisce il rilascio di IL-12 dalle cellule dendritiche, aumenta IL-10 e induce lo sviluppo di Th ₂ ; aumenta l'immunità umorale; diminuisce l'immunità cellulare; sopprime le cellule Th ₂ e le citochine.	Coinvolto probabilmente nel controllo infiammazione neurogenica.	Aumenta il flusso di calcio negli eosinofili; aumenta la chemiotassi degli eosinofili; aumenta la produzione di IL-16.
Funzione nel sistema nervoso centrale	Sonno/veglia, appetito, termoregolazione, emozioni/comportamento aggressivo, locomozione, memoria, apprendimento.	Neuroendocrina	Auto-Eterorecettore presinaptico; riduce liberazione istamina, dopamina, serotonina, noradrenalina e acetilcolina.	Da definire

(da Akdis et al., *Eur. J. Pharmacol* 2006)

2.2. I Mastociti

I mastociti sono elementi cellulari del sistema immunitario ampiamente distribuiti nell'organismo. Essi sono particolarmente concentrati nelle regioni più esposte agli antigeni, quali i tessuti connettivi sub-epiteliali degli apparati respiratorio, gastroenterico e urinario. I mastociti sono cellule mobili piuttosto grandi (diametro di 20-30 μm), di forma ovale o allungata, munite di prolungamenti villiformi e contenenti mitocondri, un complesso di Golgi ben sviluppato e scarse cisterne di reticolo endoplasmatico. La loro caratteristica morfologica più saliente consiste nella presenza, nel citoplasma, di numerosi granuli solubili in acqua che si colorano metacromaticamente con i coloranti basici come il blu di toluidina. I granuli, così stipati da mascherare il nucleo, contengono eparina, istamina, serotonina e proteasi. Inoltre, quando attivati, i mastociti possono liberare nello spazio extracellulare diverse citochine e mediatori lipidici (eicosanoidi) sintetizzati *de novo* come le prostaglandine e i leucotrieni. Tutti questi mediatori hanno un ruolo importante non solo nell'immunità innata e in quella specifica, promuovendo o sopprimendo lo sviluppo, la sopravvivenza, la proliferazione, la migrazione o la funzione delle cellule del sistema immunitario, ma anche nella regolazione della risposta infiammatoria.

I mammiferi possiedono due distinti tipi di mastociti, che differiscono per morfologia, colorazione istologica e distribuzione: un tipo è presente solo a livello mucosale (MMC) del polmone e dell'intestino, l'altro è presente nella maggior parte dei tessuti connettivali (CTMC) nello strato sottomucoso e muscolare. Entrambi i tipi di mastociti derivano da un precursore comune cellulare (MCp) che origina nel midollo osseo e che ancora immaturo migra nei vari tessuti attraverso il circolo sanguigno. I MMC intestinali giungono alla sede definitiva tissutale controllati nel loro movimento dall'integrina $\alpha 4\beta 7$ e *in loco* acquisiscono il fenotipo maturo.⁵⁶

Il tratto gastrointestinale, come tutti gli apparati in diretto contatto con l'esterno, è particolarmente ricco in MMC. I mastociti della mucosa intestinale si sono dimostrati essere degli elementi chiave in diversi processi fisiopatologici. Di fatto, i mastociti sono una componente fondamentale della risposta immunitaria innata mucosale. È noto da tempo che i mastociti, la cui attivazione può essere indotta da diversi stimoli immunologici di tipo IgE-mediati, giocano un ruolo basilare nella modulazione della risposta di natura allergica scatenando la liberazione di mediatori infiammatori.

Tabella 6 - Mediatori mastocitari e loro effetto fisiopatologico.

Classe	Sottoclasse	Mediatori	Effetto
Preformati	Amine biogene	Istamina	Vasodilatazione, dolore, angiogenesi, mitogenesi, dolore.
		Serotonina	Vasocostrizione, dolore
	Chemochine	IL-8, MCP-1, MCP-3, MCP-4, RANTES	Chemiotassi e infiltrazione tissutale leucocitaria.
	Enzimi	Arisulfatasi	Idrolisi lipidica e dei proteoglicanici.
		Carbossipeptidasi A	Degradazione peptidica
		Chimasi	Danno tissutale, sintesi angiotensina II.
		Chinogenasi	Sintesi chinine vasodilatatorie, dolore.
		Metalloproteasi	Danno tissutale
		Fosfolipasi	Formazione acido arachidonico
		Triptasi	Danno tissutale, infiammazione, dolore, attivazione PAR ₂ .
Peptidi e proteine	Fattore di rilascio corticotropina	Infiammazione, vasodilatazione.	
	Bradichinina	Infiammazione, dolore, vasodilatazione.	
	Endorfine	Analgesia	
	Endotelina	Sepsi	
	Neurotensina	Infiammazione, dolore.	
	Renina	Vasocostrizione	
	Somatostatina	Azione anti-secretoria	
	VIP	Vasodilatazione	
	Sostanza P	Infiammazione, dolore.	
	VEGF	Angiogenesi, vasodilatazione.	
Proteoglicani	Eparina	Angiogenesi	
	Condroitinsolfato	Antinfiammatorio	
	Acido ialuronico	Componente tessuto connettivo	
Fattori angiogenetici	Angiogenina, Angiopoietina, FGF- α , b-FGF, EGF, PDGF, VEGF, TGF- β , IL-8.	Angiogenesi	
Sintetizzati de novo	Citochine	IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16, IL-17, IL-32, INF- γ , TNF- α , TGF- β	Infiammazione, migrazione attivazione proliferazione leucocitaria, dolore.
		Fattori di crescita	SCF, GM-CSF, b-FGF, NGF, VEGF
	Metab. fosfolipidi	LTB ₄ PAF	Chemiotassi leucociti Attivazione piastrinica, vasodilatazione.
		PGD ₂	Broncocostrizione, dolore.
	Altri	NO ROS	Vasodilatazione Infiammazione

(modificata da Theoharides et al., Ann.N.Y.Acad.Sci. 2008)

Recentemente, il ruolo dei mastociti è stato messo in rilievo anche nella patogenesi di numerosi fenomeni non propriamente allergici come: glomerulonefriti,⁵⁷ sarcoidosi,⁵⁸ artrite reumatoide,⁵⁹ fibrosi polmonare idiopatica.⁶⁰ Inoltre, i MMC del tratto gastrointestinale sono utilizzati come cellule *end effectors* dell'asse nervoso encefalo-intestinale (*brain-gut axis*). Questo asse connette il sistema nervoso centrale al sistema nervoso periferico (enterico e autonomo) attraverso una serie di vie di comunicazione costituita da fibre afferenti ed efferenti.

L'attivazione dell'asse encefalo-intestinale, per esempio in seguito al verificarsi di eventi stressanti, può attivare i MMC che per questo motivo sono annoverati tra le possibili cause di IBS (*irritable bowel syndrome*).⁶¹ Altri attivatori mastocitari non IgE-mediati sono: gli oppiacei, i componenti della cascata del complemento, alcuni neuropeptidi, citochine, chemochine, parassiti, batteri patogeni anche i ROS. Per degranolazione i mastociti possono liberare diversi mediatori: l'istamina (che è uno dei principali effettori dell'infiammazione), la serotonina, diverse chemochine e citochine, fattori di crescita, proteasi, proteoglicani, leucotrieni, TNF- α ed un gran numero di interleuchine (IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-16, IL-18, IL-25) (Tab. 6). Tutte queste sostanze biologicamente attive possono modificare profondamente la fisiologia del sistema gastrointestinale causando un aumento della permeabilità mucosale, determinando la chemiotassi e l'attivazione dei leucociti e alterazione della motilità intestinale. Negli ultimi anni numerose evidenze scientifiche hanno dimostrato che i mastociti svolgono un ruolo di primaria importanza nel danno da ischemia e riperfusione tanto nell'intestino tenue quanto nel colon.

Boros e i suoi collaboratori hanno dimostrato che l'induzione farmacologica della degranolazione mastocitaria prima di un evento ischemico nel cane protegge l'intestino tenue dai danni istologici conseguenti all'ischemia e riperfusione.⁴⁵ L'aumento della permeabilità mucosale in ratti sottoposti a 60 minuti di ischemia seguita da 45 minuti di riperfusione è efficacemente attenuata in animali privi geneticamente di mastociti rispetto al ceppo wild type.⁴⁶ La rilevazione, durante la riperfusione, di aumentati livelli nel plasma di rat mast cell protease II (proteasi contenuta esclusivamente nei mastociti di ratto) a seguito di un evento ipossico ha dimostrato che i mastociti si attivano e degranolano soprattutto al momento della riperfusione a seguito della formazione in grande quantità di radicali liberi dell'ossigeno.⁶² L'inibizione farmacologica della degranolazione mastocitaria (ottenuta con Cromolyn o Ketotifene) ha dimostrato attenuare il danno locale e sistemico associato all'ischemia e riperfusione nel ratto.^{52,63} Non solo nell'intestino

tenue, ma anche nel colon il ruolo della degranolazione mastocitaria è importante nella patogenesi del danno post-ischemico. Santen e i suoi collaboratori hanno dimostrato che topi geneticamente privi di mastociti mostrano un'attenuata risposta infiammatoria nel colon a seguito di un evento ipossico e che la secrezione di chemochine da parte dei mastociti è in grado di indurre il reclutamento granulocitario associato all'ischemia e riperfusione in questa sede.⁶⁴ Non solo, recentemente è stato dimostrato che infiltrazione nel colon di mastociti consegue ad un evento di ischemico congiuntamente alla morte neuronale nel tessuto.⁶⁵ Tutte queste evidenze hanno portato a focalizzare la mia attività di ricerca nella prima parte del mio dottorato sul ruolo svolto dall'istamina endogena di origine mastocitaria in un modello di ischemia e riperfusione intestinale nel topolino.

2.2. Scopo della ricerca

Durante la prima parte del mio dottorato di ricerca presso il dipartimento di Scienze Farmacologiche, Biologiche e Chimiche Applicate dell'Università di Parma ho valutato gli effetti dell'istamina endogena nel danno da ischemia e riperfusione mesenterica nel topolino. A questo scopo topi femmina di ceppo swiss sono stati sottoposti ad un'ischemia intestinale reversibile di 45 minuti seguita da una riperfusione di 5 ore.

Dopo aver sacrificato l'animale, sono stati valutati alcuni parametri infiammatori nel tessuto intestinale:

- l'attività mieloperossidasi, come indice di infiltrazione granulocitaria tissutale,
- il dosaggio dei livelli di malondialdeide, come indice di perossidazione lipidica,
- il contenuto intestinale di acqua, come indicatore dell'edema infiammatorio.

Inoltre, per valutare eventuali alterazioni della motilità intestinale, sono stati presi in esame alcuni parametri motori:

- il transito gastrointestinale;
- il transito colonico.

Al fine di dimostrare l'importanza dell'istamina liberata per degranulazione mastocitaria nel corso della riperfusione, un gruppo di animali è stato trattato con diversi dosaggi di uno stabilizzatore delle mast cellule mucosali (Cromolyn) appena prima di rimuovere l'ostruzione transitoria dell'arteria SMA.

In seguito, per chiarire quali recettori istaminici siano maggiormente coinvolti nel danno da ischemia-riperfusione, sono stati trattati diversi gruppi sperimentali con differenti bloccanti selettivi per i vari recettori istaminici: la Mepiramina, antagonista selettivo H₁, la Famotidina, anti H₂, e l'M85, un composto sintetizzato nei laboratori del Dipartimento Farmaceutico dell'Università di Parma come H₃ antagonista. A causa di problemi di solubilità non è stato possibile utilizzare il composto antagonista selettivo H₄ JNJ7777120. Di conseguenza, per bloccare questo recettore si è somministrato l'agonista inverso H_{3/4} Tioperamide.

2.3. Materiali e metodi

L'esperimento è stato condotto in conformità alle normative della comunità Europea sull'utilizzo e la cura degli animali da laboratorio e in accordo con le leggi italiane (DL 116/92).

Chirurgia addominale

Questa sperimentazione è stata condotta utilizzando topi femmina swiss (18-24 g di peso) mantenuti a digiuno nelle 12 ore antecedenti l'esperimento, con libero accesso all'acqua. Gli animali sono stati anestetizzati con Nembutal (65 mg/kg i.p.). Dopo laparotomia, l'intestino è stato estratto dalla cavità addominale e spostato verso sinistra per visualizzare e occludere temporaneamente con una clip microvascolare l'arteria mesenterica superiore (SMA). Con questa procedura si riesce ad ottenere una condizione di ischemia acuta estesa a tutto l'intestino tenue e alla porzione prossimale del crasso. L'intestino viene mantenuto umido con delle garze imbevute di soluzione fisiologica e la temperatura corporea è mantenuta tramite l'utilizzo di lampade riscaldanti e un tappeto termico regolato a 37°C. Dopo 45 minuti di ischemia la clip viene rimossa e l'addome è suturato per permettere una riperfusione di 5 ore prima del sacrificio degli animali per inalazione di CO₂.

Attività mieloperossidasi (MPO)

L'attività dell'enzima MPO, indicatore dell'accumulo tissutale di neutrofili, viene determinata secondo il metodo di Krawisz ⁶⁶ leggermente modificato. Subito dopo il sacrificio la prima metà dell'intestino, che corrisponde al duodeno e a parte del digiuno, viene conservata in criotubi e congelata in azoto liquido fino al giorno seguente. Dopo scongelamento, ciascuna porzione di tessuto viene pesata e lisata meccanicamente con omogeneizzatore "Ultra Turrax T25 Basic" in dieci volumi di una soluzione contenente l'inibitore delle proteasi aprotinina (1 µg/ml Sigma, Milano, Italia) sciolta in un buffer di PBS 100mM a pH 7.4 e centrifugato 20 minuti a 10000 rpm a 4°C. Il pellet così ottenuto (contenente più del 90% dell'attività di MPO) viene omogenato ulteriormente in 5 volumi di PBS 50mM pH 6 contenente esadeciltrimetilammonio (HTAB) (Sigma, Milano, Italia) allo 0,5% e aprotinina. L'omogenato che ne deriva viene quindi diviso in due aliquote e sottoposto a tre cicli di congelamento in azoto liquido (10') e scongelamento a 37°C (15'). Dopo centrifugazione un'aliquota (100 µl) del surnatante viene fatta reagire con la

soluzione di reazione (900 µl) contenente H₂O₂ 0.0005% e O-dianisidina (Sigma, Milano, Italia) 0,167 mg/ml in PBS 50mM pH 6. I dati di assorbanza sono letti a 470 nm da uno spettrofotometro e i risultati sono espressi in unità di MPO per milligrammo di tessuto umido (U/mg) (MPO standard Calbiochem, Milano, Italia). Un'unità di MPO è definita come la quantità di enzima che degrada 1 µmole di perossido al minuto a 25°C.⁶⁷

Livelli di malondialdeide (MDA)

I livelli intestinali di MDA sono interpretati come indici di perossidazione lipidica. La concentrazione di MDA nella seconda parte di intestino prelevato è determinata seguendo il metodo di Ohkawa.⁶⁸ Una volta sacrificato l'animale, la porzione intestinale che corrisponde alla seconda metà dell'intestino tenue (parte del digiuno e ileo) viene pesata e omogenata in 10 volumi di KCl 1,15%. Un'aliquota di questo omogenato (300 µl) viene aggiunta alla soluzione di reazione contenente 200 µl di SDS 8,1%, 1500 µl di acido acetico 20% pH 3.5, 1500 µl di acido tiobarbiturico (Sigma, Milano, Italia) 0,8% e 500 µl di acqua distillata. I campioni così preparati sono mantenuti a 95°C per 60' per permettere la reazione tra MDA e acido tiobarbiturico e centrifugati dopo raffreddamento a 3000 rpm per 10 minuti. Il valore di assorbanza del surnatante viene letto a 532 nm da uno spettrofotometro. I dati sono espressi come nmol/mg di tessuto umido (MDA standard, Sigma, Milano, Italia).

Edema intestinale

Il contenuto intestinale di acqua è stato valutato prelevando circa 2 cm di intestino tenue corrispondente al tratto digiuno-ileale; i campioni raccolti sono stati aperti lungo il bordo antimesenterico e lasciati essiccare per 24 ore. L'edema è stato valutato come incremento relativo del peso del campione di tessuto umido rispetto al peso secco [(peso bagnato)-(peso secco)/peso secco].⁶⁹

Transito gastro-intestinale (GIT)

La motilità del tratto gastrointestinale superiore dell'intestino è stata valutata tramite la somministrazione (1 ml/100 g di peso corporeo) intragastrica di un marker nero non assorbibile (0,25 ml di una miscela al 10% carbone vegetale [Sigma, Milano, Italia] e al 5% gomma arabica [Sigma, Milano, Italia] in soluzione salina) 45 minuti prima del sacrificio. L'intestino tenue, nel tratto compreso tra il piloro e la valvola ileo-ciecale viene

prelevato. L'entità del transito intestinale viene espressa come percentuale di intestino percorso dal marker rispetto alla lunghezza totale dell'intestino.

Transito colonico (CT)

Il transito del colon viene valutato seguendo il metodo di Raffa et al.⁷⁰ Un'ora prima della fine della riperfusione, usando un tubicino in silicone, viene inserita dall'ano nel colon distale a 2 cm di profondità una pallina di circa 3 mm di diametro. Il tempo richiesto per espellere la pallina è utilizzato per valutare eventuali variazioni della motilità del colon a seguito del protocollo sperimentale applicato.

Trattamenti

Sono stati individuati i seguenti gruppi sperimentali costituiti da 10-12 animali ciascuno:

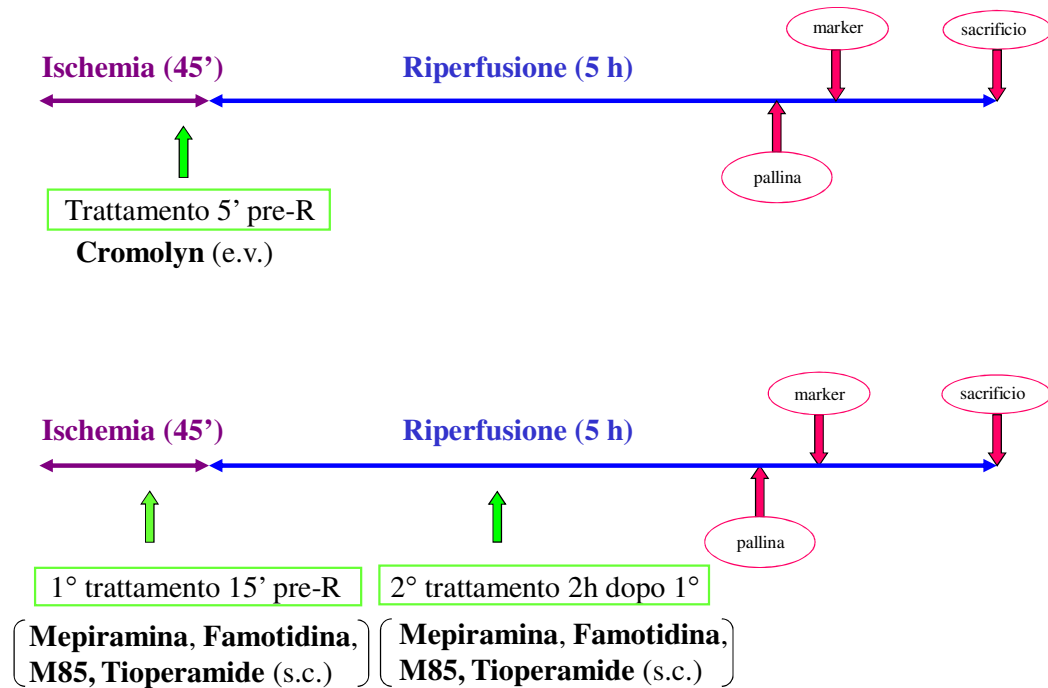
- Topi sottoposti a ischemia (45 minuti) e riperfusione (5ore) (I/R);
- Topi falsi operati (Sham) che hanno subito la stessa manipolazione chirurgica degli I/R eccezione fatta per l'occlusione della SMA;

A ciascun gruppo è stato somministrato il seguente trattamento farmacologico (Fig. 5):

1. I/R + soluzione fisiologica s.c. (sottocute) oppure e.v. (endovena) secondo le stesse modalità seguite per i trattamenti farmacologici;
2. I/R + Cromolyn sodico (Sigma, Milano, Italia) 30 mg/kg e.v. 5' prima della riperfusione;
3. I/R + Cromolyn sodico 50 mg/kg e.v. 5' prima della riperfusione;
4. I/R + Cromolyn sodico 75 mg/kg e.v. 5' prima della riperfusione;
5. I/R + Mepiramina (Sigma, Milano, Italia) 2 mg/kg s.c. 15' prima della riperfusione e ripetuta 2 h dopo la prima somministrazione;
6. I/R + Famotidina (Sigma, Milano, Italia) 3 mg/kg s.c. 15' prima della riperfusione e ripetuta 2 h dopo la prima somministrazione;
7. I/R + M85 (sintetizzato nei laboratori del Dipartimento Farmaceutico dell'Università di Parma) 5 mg/kg s.c. 15' prima della riperfusione e ripetuta 2 h dopo la prima somministrazione;
8. I/R + Tioperamide (Sigma, Milano, Italia) 10 mg/kg s.c. 15' prima della riperfusione e ripetuta 2 h dopo la prima somministrazione.

Cromolyn, Mepiramina, Famotidina, M85 e Tioperamide sono stati sciolti in soluzione fisiologica.

Figura 5 - Schema dei trattamenti farmacologici.



Gruppi corrispondenti di animali falsi operati (Sham), formati da topolini che avevano subito laparotomia, manipolazione ed esposizione dell'intestino senza occlusione della SMA e corrispondente trattamento farmacologico sono stati utilizzati come controllo.

Analisi statistica

I dati sono espressi come medie \pm errore standard e analizzati statisticamente utilizzando il software GraphPad Prism 5. Tutti i dati erano distribuiti normalmente. L'analisi statistica tra i gruppi IR e Sham è stata eseguita utilizzando il t-test di Student per i dati non appaiati. Le differenze tra i trattamenti nelle stesse condizioni sperimentali (I/R o Sham) è stata eseguita attraverso l'analisi della varianza 1-way ANOVA seguita dal post-test di Bonferroni. Le differenze sono state considerate significative per valori di $*P < 0.05$,

molto significative per valori di $**P < 0.01$ ed estremamente significative per valori di $***P < 0.001$.

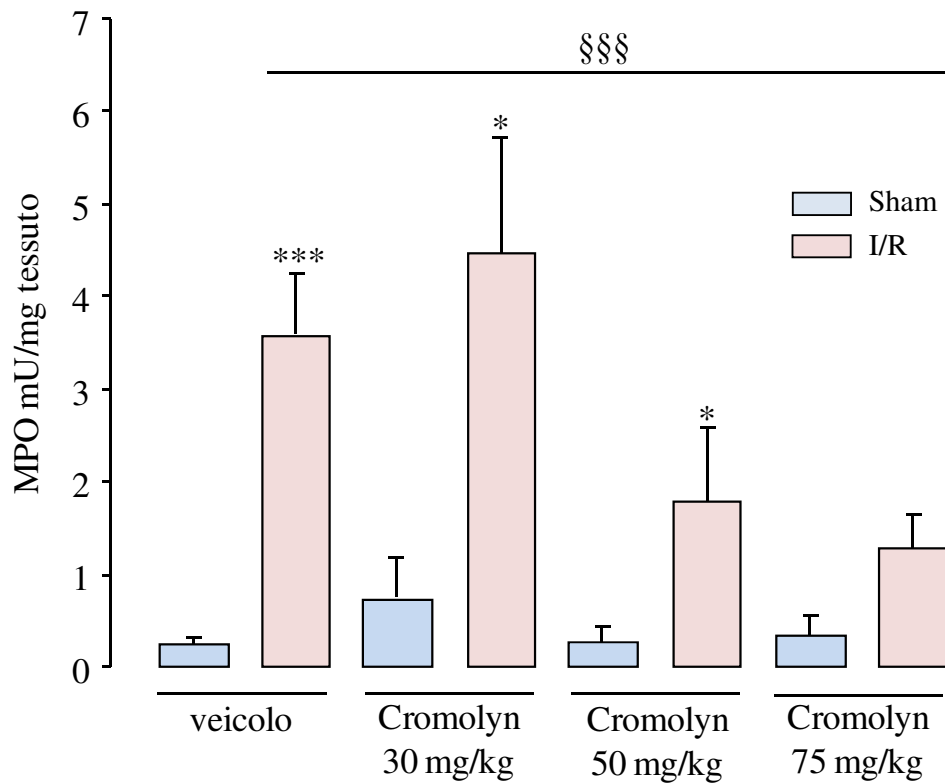
2.4. Risultati

Cromolyn, stabilizzatore dei mastociti, riduce il reclutamento granulocitario intestinale post-ischemico.

La determinazione dell'attività della mieloperossidasi (MPO) viene considerata come utile indicatore dell'infiltrazione tissutale di granulociti neutrofilici in risposta ad un processo infiammatorio acuto. L'applicazione e la successiva rimozione del clip all'origine dell'arteria mesenterica superiore ha prodotto una condizione di ischemia e riperfusione e un aumento, in maniera massiccia, dell'MPO intestinale rispetto a quanto osservato con la semplice manipolazione dell'intestino come realizzato nei topolini falsi operati (Sham) (3.6 mU MPO/mg tessuto I/R vs 0.3 mU MPO/mg tessuto Sham; *** $P < 0.001$). Dall'esame della figura 6 emerge in modo chiaro che la somministrazione endovenosa dello stabilizzatore dei mastociti Cromolyn ai diversi dosaggi (30, 50, 75 mg/kg), cinque minuti prima dell'inizio della riperfusione (5'pre-R), ha ostacolato l'infiltrazione granulocitaria evocata dal processo di ischemia e riperfusione in modo dose-dipendente. La dose più bassa (30 mg/kg) non ha variato l'attività di questo enzima rispetto al controllo trattato con fisiologica. La somministrazione di Cromolyn alla dose di 50 mg/kg ha ridotto del 50% l'infiltrazione granulocitaria, la dose maggiore di 75 mg/kg ha abbassato ulteriormente l'attività mieloperossidasi fino al 36% in modo altamente significativo (1.29 mU MPO/mg tessuto ^{§§} $P < 0.01$).

Il grado di perossidazione lipidica del tessuto intestinale, determinato mediante misurazione dei livelli di malondialdeide (MDA), è risultato significativamente incrementato nei tessuti prelevati da topi I/R rispetto agli animali Sham trattati con il veicolo (306.4 nmoli MDA/mg tessuto I/R vs 196.9 nmoli MDA/mg tessuto Sham; * $P < 0.05$). Lo stravasamento di essudato infiammatorio, valutato come incremento relativo del peso del campione di tessuto umido rispetto al peso dello stesso campione dopo 24 ore di essiccamento, nell'animale I/R è risultato significativamente maggiore rispetto all'animale falso operato (4.3 ratio I/R vs 3.1 ratio Sham; *** $P < 0.001$). Entrambi questi parametri, associabili allo stato infiammatorio tissutale non sono stati modificati in modo significativo dai trattamenti con le diverse dosi dello stabilizzatore dei mastociti (Tabella 7).

Figura 6 – Attività mieloperoxidasica in tessuti intestinali prelevati da topolini I/R e Sham trattati con fisiologica o con Cromolyn 30, 50 e 75 mg/Kg e.v.



Gli effetti dell'ischemia-riperfusione sulla motilità intestinale, i cui dati sono riportati nella tabella 7, sono stati espressi come percentuale di intestino tenue percorso da un marker non assorbibile, somministrato per via orale, relativamente alla motilità del tratto gastrointestinale superiore e come tempo di espulsione di una pallina inserita nel colon distale dall'ano, relativamente al transito nel colon. Il transito gastrointestinale superiore risulta accelerato (incremento del 20%) negli animali I/R rispetto agli Sham e non influenzato dal trattamento con Cromolyn. Il transito colonico è risultato rallentato negli animali sottoposti a I/R trattati con fisiologica rispetto ai corrispondenti falsi operati. In risposta al trattamento con Cromolyn 75 mg/kg il tempo medio di espulsione della pallina si è ridotto del 55% (*P<0.05).

Tabella 7 – Risultati dei livelli di malondialdeide, dell'edema intestinale, del transito gastrointestinale e del transito colonico in topolini I/R e Sham trattati con fisiologica o Cromolyn 30, 50 e 75 mg/Kg e.v.

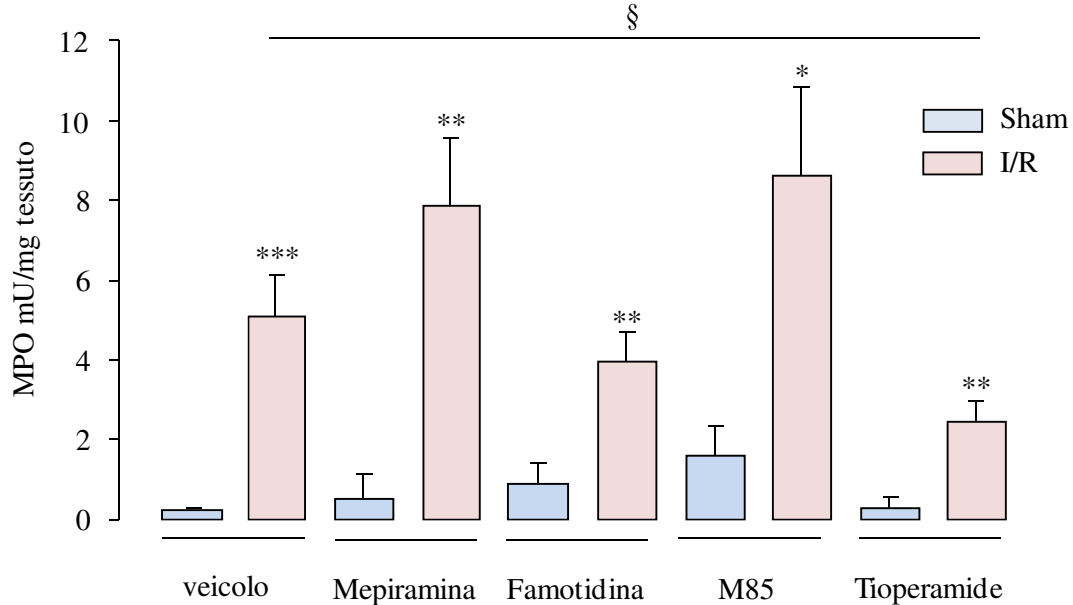
GRUPPO	TRATTAMENTO	MDA nmol/mg tessuto	EDEMA wet to dry ratio	CT min	GIT % transito
I/R	Veicolo	306.4±43.1*	4.3±0.2***	51.7±8.2*	49.9±4.6*
	CROMOLYN 75mg/KG	353.3±78.3	4.6±0.4*	19.2±6.1 [§]	49.8±5.4*
Sham	Veicolo	196.9±22.5	3.1±0.2	8±0.7	37±3.1
	CROMOLYN 75mg/KG	201.4±31.1	3.3±0.3	9±1.2	38±3.4

*P<0.05 e ***P<0.001 vs Sham corrispondente; [§] P<0.05 vs IR fisiologico; nt = non testato

Effetti del trattamento con gli antagonisti recettoriali istaminici: l'antagonismo del recettore H₄ protegge l'intestino dal reclutamento granulocitario post-ischemico.

Anche in questo pool di animali la condizione di ischemia e riperfusione determina un notevole incremento dell'infiltrazione leucocitaria, come indicato dall'attività mieloperossidasi intestinale negli animali I/R trattati con il veicolo rispetto ai corrispondenti Sham (5.1 mU MPO/mg tessuto I/R vs 0.06 mU MPO/mg tessuto Sham; ***P<0.001). Dall'esame della figura 7 emerge in modo chiaro che tra tutti gli antagonisti recettoriali istaminici solamente la Tioperamide ha ridotto in maniera significativa l'attività mieloperossidasi negli animali I/R rispetto al gruppo trattato con solo veicolo (2.46 mU MPO/mg tessuto I/R Tioperamide vs 5.1 mU MPO/mg tessuto I/R fisiologica; [§]P<0.05). Nessuno degli altri antagonisti testati è stato in grado di ostacolare l'infiltrazione granulocitaria evocata dal processo di ischemia e riperfusione intestinale. Al contrario, si può notare un aumento dell'attività mieloperossidasi, seppure non significativo in termini statistici a causa della marcata variabilità, in seguito al trattamento con M85 e Mepiramina.

Figura 7 – Attività mieloperossidasi in tessuti intestinali prelevati da topolini I/R e Sham trattati con fisiologica o con i diversi antagonisti istaminici.



I livelli intestinali di malondialdeide, importante marker di lipoperossidazione associata ad uno stress ossidativo, sono risultati più elevati nei tessuti ileali prelevati da topi I/R trattati con veicolo rispetto ai corrispondenti Sham (* $P < 0.05$). Tra i vari trattamenti testati nessuno ha ridotto significativamente i livelli di MDA intestinale in risposta all'occlusione della SMA nei gruppi I/R, seppure dopo trattamento con Famotidina ed M85, H_3 antagonista selettivo, i valori di malondialdeide registrati nei topolini I/R siano risultati tendenzialmente minori rispetto ai topolini I/R trattati con fisiologica e molto vicini a quelli dei topolini Sham sottoposti al trattamento col farmaco (Figura 8).

Il contenuto di acqua del tessuto intestinale è stato considerato indice dell'edema infiammatorio che si verifica in seguito a una condizione di ischemia e riperfusione intestinale. Dall'esame dei dati rappresentati in figura 9 appare chiaro che nei topolini I/R, sia nel gruppo trattato con la fisiologica sia con i diversi antagonisti, si sviluppa un edema superiore a quello che si riscontra nei corrispondenti Sham (***) $P < 0.001$). Nessuno dei trattamenti con i diversi antagonisti recettoriali istaminici ha determinato un cambiamento di questo parametro, che fosse significativo in termini statistici, rispetto al gruppo trattato con il veicolo.

Figura 8 – Contenuto di MDA in tessuti intestinali prelevati da topolini I/R e Sham trattati fisiologica o con i diversi antagonisti recettoriali istaminici.

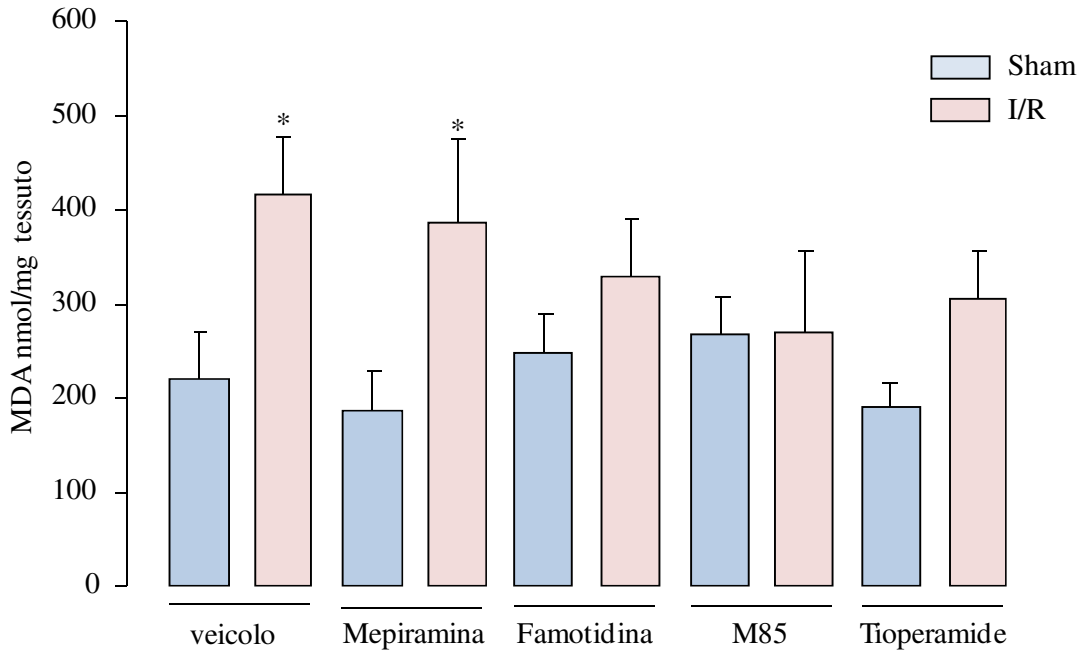
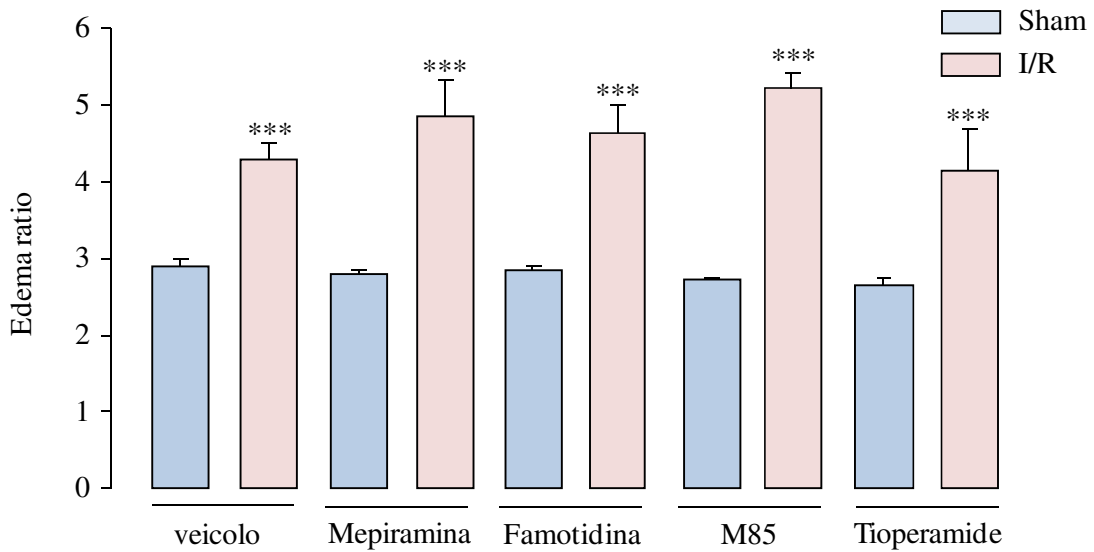


Figura 9 – Edema infiammatorio intestinale in topolini I/R e Sham trattati con fisiologica o con i diversi antagonisti recettoriali istaminici.



L'interruzione transitoria del flusso sanguigno mesenterico seguita dalla ri-perfusione si ripercuote, oltre che sui parametri infiammatori, anche sulla motilità del tratto gastrointestinale superiore. Infatti, l'ischemia seguita da una ri-perfusione di 5 ore ha determinato nell'animale I/R trattato con veicolo un'apparente accelerazione del transito quantificata come aumento della percentuale percorsa dal marker non assorbibile rispetto a quanto misurato nel corrispondente animale Sham. Anche se nessuno dei diversi trattamenti è stato in grado di modificare in modo significativo questa situazione, dall'analisi del grafico 10 si nota che nei gruppi I/R trattati con Famotidina o Tioperamide il transito è aumentato del 27 e del 17% rispetto al gruppo I/R trattato con il veicolo. L'ischemia mesenterica, causata dall'occlusione temporanea della SMA, induce un'alterazione della motilità colonica. Negli animali I/R il transito è risultato ritardato rispetto ai corrispondenti Sham seppure ai limiti della significatività statistica. Per quanto riguarda gli effetti dei diversi antagonisti recettoriali istaminici testati, solamente la Famotidina si è dimostrata efficace nel contrastare il rallentamento del transito riscontrato negli animali ischemici (52.7 min I/R fisiologica vs 39.5 min I/R Famotidina; *P<0.05). Al contrario la mepiramina, in maniera significativa, ha ritardato il transito colonico aumentando i tempi di espulsione della pallina che in tutti gli animali ha raggiunto il valore soglia (cut off) massimo (figura 11).

Figura 10 – Transito gastrointestinale in topolini I/R e Sham trattati con soluzione fisiologica o con i diversi antagonisti recettoriali istaminici.

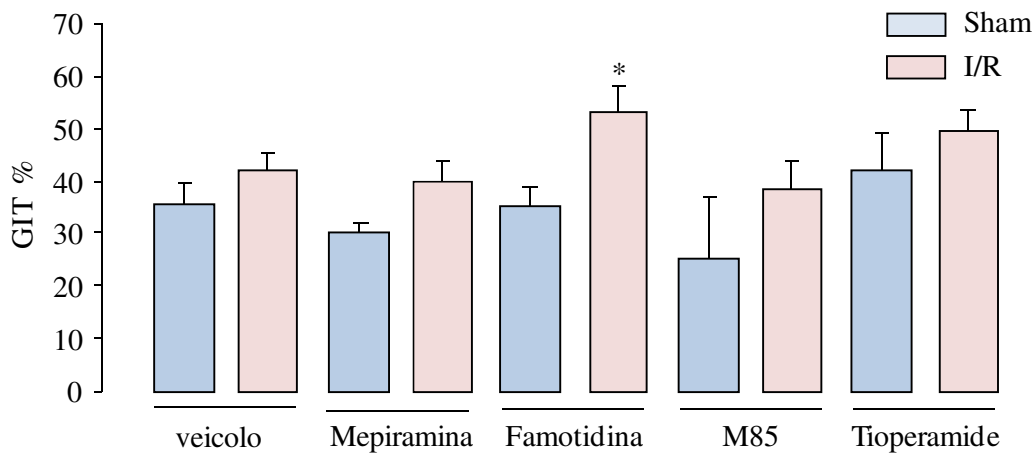
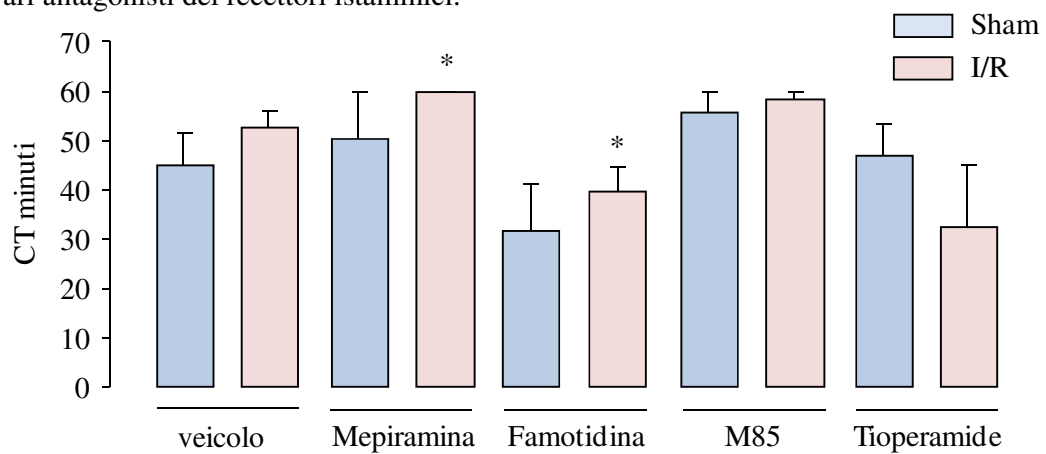


Figura 11 – Transitto colonico in topi I/R e Sham trattati con soluzione fisiologica o con vari antagonisti dei recettori istaminici.



2.5. Discussione

L'occlusione meccanica dell'arteria mesenterica superiore nel topolino scatena una risposta infiammatoria intestinale, che danneggia seriamente l'integrità della mucosa, evidenziabile attraverso l'aumento locale di infiltrato leucocitario, di prodotti della lipoperossidazione, di stravasato di essudato infiammatorio. A questi aspetti si accompagnano alterazioni del profilo motorio del tratto gastrointestinale superiore e colonico.^{71,72}

Numerosi studi hanno dimostrato che la degranolazione dei mastociti mucosali e l'adesione dei leucociti alle cellule endoteliali sono entrambi importanti fattori coinvolti nella patogenesi del danno che sta alla base della distruzione della mucosa intestinale.⁶⁴ È noto che i mastociti mucosali sono localizzati a stretto contatto delle venule post-capillari sottomucosali. Questi piccoli vasi rappresentano i target primari dell'interazione tra i leucociti e le cellule endoteliali durante il danno da ischemia e riperfusione. I mastociti sono conosciuti per il loro coinvolgimento nelle reazioni allergiche e anafilattiche; tuttavia, recenti scoperte dimostrano che sono implicati in una grande varietà di patologie infiammatorie che colpiscono diversi organi come cuore, articolazioni, polmoni, encefalo, cute e intestino.⁷³ In quest'ultimo distretto i mastociti partecipano alla costituzione della barriera emato-intestinale fungendo da cellule "sentinelle" che, attivandosi, determinano una risposta infiammatoria difensiva e sono considerate come uno dei componenti del quarto livello di difesa della mucosa intestinale.⁷⁴ Il ruolo della degranolazione dei mastociti mucosali nella patogenesi del danno da ischemia e riperfusione intestinale è stato oggetto di varie indagini sperimentali. È noto che il reclutamento post-ischemico nel piccolo intestino, ma anche nel colon, dei granulociti neutrofili è strettamente correlato all'attivazione dei mastociti mucosali.⁶⁴ Steiner e i suoi collaboratori hanno dimostrato che l'ipossia sistemica determina una rapida attivazione dei mastociti da parte dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS) prodotti durante il periodo di ischemia e soprattutto di riperfusione.⁷⁵ Diverse evidenze scientifiche dimostrano che la degranolazione preventiva della popolazione di mastociti intestinali, mediante somministrazione del composto 48/80 nel cane⁷⁶, o la loro stabilizzazione farmacologica, con Cromolyn o Ketotifene nei ratti attenua il danno da ischemia e riperfusione intestinale.^{52,72,77,78}

I risultati raccolti in questo lavoro permettono di formulare le seguenti considerazioni: nei topolini, l'occlusione dell'arteria mesenterica superiore per 45 minuti seguita da 5 ore di riperfusione ha scatenato una risposta infiammatoria evidenziabile con un aumento

locale di infiltrato granulocitario. Il trattamento con Cromolyn appena prima della ri-perfusione ha limitato l'infiltrazione leucocitaria in maniera altamente significativa rispetto al gruppo controllo (Sham). Questi risultati permettono di confermare l'importanza della degranolazione dei mastociti mucosali nella patogenesi del danno conseguente a ischemia e ri-perfusione. Inoltre, dati preliminari, che hanno mostrato una minore efficacia protettiva del Cromolyn in seguito a somministrazione pre-ischemica, supportano l'ipotesi secondo cui la ri-ossigenazione dei tessuti, durante la ri-perfusione, è il fattore scatenante tale degranolazione.

Tra i mediatori rilasciati negli spazi interstiziali e nel plasma per effetto della degranolazione mastocitaria, l'istamina occupa uno spazio di rilievo. In quanto ammina vasoattiva, l'istamina aumenta il calibro e la permeabilità dei vasi sanguigni favorendo lo stravasamento di plasma e di proteine plasmatiche nell'ambiente extracellulare, con conseguente formazione di edema e promuovendo il rilascio dei granulociti neutrofili. Inoltre, l'istamina è coinvolta in modo complesso nella regolazione della risposta immunitaria attraverso la mediazione e la differente espressione dei 4 sottotipi recettoriali istaminici, che danno contributi talvolta opposti nelle risposte infiammatorie ed immunologiche.⁴⁵ È stata dimostrata la capacità dell'istamina di stimolare l'adesione, il rotolamento e la diapedesi dei leucociti polimorfonucleati sull'endotelio vasale, attraverso l'aumentata espressione di molecole di adesione come la P-selectina, sostenuta principalmente dall'attivazione del recettore H₁.⁷⁹ Inoltre, il recettore H₄ per l'istamina, espresso sulle cellule ematopoietiche periferiche e del midollo osseo, eosinofili, cellule dendritiche, mastociti e basofili, è stato recentemente oggetto di numerose ricerche in quanto coinvolto nella chemiotassi e reclutamento dei mastociti e granulociti neutrofili.^{51,80}

Sulla base di queste indicazioni sembra logico ritenere che l'istamina liberata in risposta alla degranolazione dei mastociti possa contribuire alla patogenesi del danno da ischemia e ri-perfusione intestinale. Tuttavia, le ricerche condotte in merito non hanno prodotto risultati univoci. Alcuni studi dimostrano gli effetti benefici dell'istamina nel processo di riparazione della mucosa intestinale. La stimolazione dei recettori H₄ previene il danno da ischemia e ri-perfusione epatica nel ratto.⁵⁵ Motoki e i suoi collaboratori, in un modello analogo di ischemia e ri-perfusione, individuano nell'agonismo H₂ e H₄ operato dal Dimaprit la causa della diminuzione di IL-12, promuovendo un effetto protettivo dal danno post-ischemico.⁸¹ Attraverso la somministrazione esogena di L-istidina nel ratto, è stata dimostrata l'importanza del sistema istaminergico centrale nel prevenire la formazione di edema cerebrale e sopprimere il richiamo di cellule infiammatorie attraverso la

stimolazione del recettore H_2 , in un modello di ischemia e riperfusione cerebrale.^{53,82} Il coinvolgimento e l'attivazione del recettore H_1 sono elementi determinanti ai fini della riparazione della mucosa intestinale a seguito di un evento ischemico.⁸³

Altri studi sperimentali, al contrario, hanno individuato in alcuni antagonisti istaminici un ruolo chiave nella prevenzione del danno da ischemia e riperfusione. La Ranitidina riduce il danno da ischemia e riperfusione epatica inibendo l'attivazione dei neutrofili.⁸⁴ Cuzzocrea e collaboratori hanno dimostrato che la somministrazione di istaminasi, aumentando il catabolismo dell'istamina, previene il danno da ischemia e riperfusione intestinale.⁸⁵ Recentemente l'antagonismo del recettore H_1 è stato associato ad una diminuzione del danno emorragico intestinale a seguito di ischemia e riperfusione nel ratto, senza tuttavia prevenire l'infiltrazione leucocitaria tissutale.⁸⁶

Nel nostro modello sperimentale riprodotto nei topolini, ottenuto attraverso l'occlusione per 45 minuti della SMA seguiti da 5 ore di riperfusione, il trattamento con specifici antagonisti dei recettori istaminici, somministrati 15 minuti prima dell'evento ischemico e ripetuti dopo 2 ore, ha prodotto un chiaro risultato. Nessun trattamento farmacologico ha svolto un ruolo protettivo nei confronti dei parametri infiammatori presi in esame ad eccezione della Tioperamide (10 mg/kg s.c.), che ha apportato una significativa diminuzione dell'attività mieloperossidasi, parametro indicativo dell'infiltrazione leucocitaria tissutale. L'effetto protettivo della Tioperamide, agonista inverso non selettivo H_3/H_4 , sembra attribuibile al solo blocco del recettore H_4 come dimostrato dall'inefficacia della somministrazione dell'antagonista selettivo H_3 , M85. Questo composto non solo non ha apportato nessun miglioramento dei parametri valutati, ma ha addirittura incrementato lievemente l'attività mieloperossidasi. Questi risultati, che riconoscono al blocco del recettore H_4 dell'istamina un possibile ruolo protettivo nei confronti della reazione infiammatoria innescata da I/R, si allineano con i risultati ottenuti da altri autori in studi condotti in vitro nei quali la stimolazione del recettore H_4 induce la chemiotassi dei mastociti senza, tuttavia, determinarne la degranolazione.⁵¹ Altri studi effettuati in vivo associano all'antagonismo del recettore H_4 , ottenuto con la somministrazione di Tioperamide, la capacità di inibire il reclutamento dei neutrofili dipendente dai mastociti, indotto dallo Zymosan in un modello sperimentale di peritonite acuta nel topo.⁸⁰

Per quanto riguarda lo studio dell'alterazione motoria il trattamento con Famotidina ha velocizzato il transito colonic e accelerato il transito nel tratto gastrointestinale superiore degli animali I/R suggerendo un possibile coinvolgimento della stimolazione H_2 nella distonilità che accompagna lo stato di ipossia intestinale seguito da riossigenazione. È

noto, infatti, che il controllo istaminergico della motilità intestinale è piuttosto complesso, variabile da specie a specie, e comprende effetti sulla contrattilità della muscolatura liscia sia di tipo diretto, H₁ mediato, sia neurogeno mediato dai recettori H₃ e, in misura minore, H₂.⁸⁷

In un precedente studio, condotto nello stesso modello animale e con gli stessi antagonisti istaminici, che venivano somministrati però in un unico dosaggio 20 minuti prima dell'ischemia, non era stato evidenziato un ruolo particolarmente significativo da parte dell'istamina nelle prime ore di riperfusione.

Il trattamento con Cromolyn ha sottolineato che è solo con l'inizio della riperfusione che avviene una massiccia liberazione di mediatori infiammatori di origine mastocitaria. Alla luce di queste considerazioni, è stato posticipato il trattamento con gli antagonisti istaminici a pochi minuti prima dell'inizio delle riperfusione e mantenuto bloccato il recettore più a lungo, con una seconda somministrazione. Adottando questo nuovo protocollo è emerso che l'istamina svolge un ruolo determinante nella patogenesi del danno da ischemia e riperfusione durante le prime ore di riperfusione, mediante l'attivazione del recettore H₄ il cui blocco è il solo in grado di svolgere un effetto protettivo e preventivo nei confronti della chemiotassi dei granulociti.

CAPITOLO III

CONTRIBUTO DELLE PROTEASI SERINICHE NEL DANNO POST-ISCHEMICO INTESTINALE

3.1. Proteasi & PARs (protease-activated receptors)

Durante questi ultimi 20 anni sono emerse sostanziali novità circa la presenza e l'azione fisiopatologica delle proteasi. Si stima che gli enzimi proteolitici siano codificati dal 2% del genoma umano,⁸⁸ dunque, non è sorprendente che le proteasi partecipino a svariate funzioni biologiche. Da quando è stata messa in evidenza la presenza di recettori che sono selettivamente attivati da proteasi, denominati PARs (protease-activated receptors), le proteasi non sono più considerate solamente come degli enzimi capaci di degradare le proteine extracellulari (catalizzando la rottura del legame peptidico tra il gruppo amminico e il gruppo carbossilico), ma come vere e proprie molecole di segnale in grado di regolare una molteplicità di funzioni cellulari implicate in numerosi processi fisiopatologici.⁸⁹

Gli enzimi in maggior misura responsabili dell'attivazione di questi recettori appartengono alla numerosa famiglia delle proteasi seriniche, così denominate perché l'azione catalitica è dovuta al gruppo -OH in catena laterale della serina, reso reattivo dall'instaurarsi di interazioni tra i residui istidina-serina-aspartato (vicini nella struttura terziaria dell'enzima).

I PARs appartengono ad una superfamiglia dei recettori accoppiati alle proteine G (generalmente G_{αq}, 12/13, i), costituiti da 7 domini transmembranari, con una regione N-terminale extracellulare ed una C-terminale intracellulare. Fino ad oggi sono stati clonati quattro membri della famiglia dei PARs e sono stati numerati in funzione del loro ordine di scoperta (PAR₁, PAR₂, PAR₃ e PAR₄). Nei primi anni novanta fu per la prima volta identificato il recettore PAR₁ come il recettore responsabile dell'aggregazione piastrinica

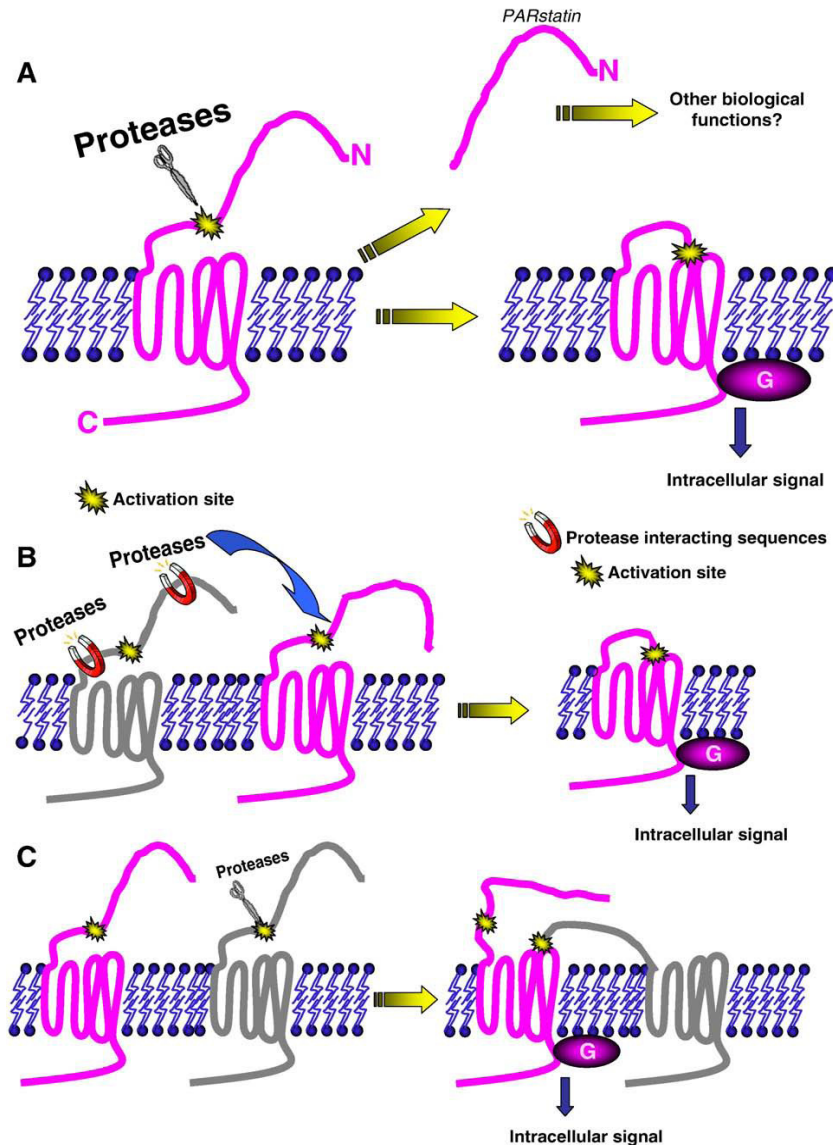
indotta dalla trombina. Più tardi il PAR₂ fu clonato e fu identificato come il recettore che condivideva lo stesso meccanismo d'azione del recettore PAR₁, ma PAR₂ era attivato dalla tripsina. Alla fine del decennio PAR₃ e PAR₄ furono clonati e identificati come 2 altri recettori della trombina.⁹⁰ L'espressione dei PARs è ubiquitaria: sono espressi da molti tessuti nonché da molti tipi di cellule. Cancro, malattie vascolari e condizioni infiammatorie costituiscono le maggiori aree di ricerca dove gli sforzi si sono concentrati per comprendere a fondo il ruolo di questi recettori.

3.1.1 Meccanismo d'azione dei PARs

I PARs si contraddistinguono per un particolare meccanismo d'attivazione (Fig. 12). Le proteasi attivano i PARs attraverso l'idrolisi specifica dell'estremità N-terminale extracellulare del recettore esponendo una nuova sequenza peptidica terminale che agisce come un *tethered ligand*; quest'ultimo, ripiegandosi sul secondo *loop* extracellulare determina l'autoattivazione del recettore. Il PAR nella forma attiva può dare inizio alla reazione del complesso eterotrimerico delle proteine G, le quali promuovono la trasduzione del segnale attraverso delle proteine chinasi. La porzione minima di *tethered ligand* attivante il recettore è costituita da 5 o 6 amminoacidi. Proprio per questa particolarità, i PARs possono essere considerati un gruppo speciale di recettori nei quali una parte del recettore stesso, opportunamente smascherata dall'azione enzimatica delle proteasi, funziona come agonista. Peptidi corrispondenti al *tethered ligand* sono stati sintetizzati in laboratorio. Dato che questi composti, agendo come agonisti, sono in grado di attivare i PARs selettivamente, indipendentemente dalle proteasi e dal clivaggio recettoriale, rappresentano strumenti farmacologici importanti nello studio delle funzioni dei PARs (Tab. 8). Da quando nel 1997 i primi studi hanno dimostrato che alcune proteasi liberate dai neutrofili (elastasi, proteinasi 3, catepsina G) possono inibire l'aggregazione piastrinica indotta dalla trombina⁹¹ è stato ipotizzato che gli enzimi proteolitici non solo possono attivare i PARs, ma possono anche "disarmarli" rendendoli inattivi (Fig. 13). In effetti, numerosi studi dimostrano che i PARs possono essere disattivati da parte di alcune proteasi, rilasciate dai neutrofili o di origine batterica, che idrolizzano il dominio extracellulare tagliando tra il loro sito di attivazione e il primo dominio transmembrana (Fig. 13). Questo taglio rivela un dominio N-terminale che non contiene nessun sito attivatore lasciando il recettore nell'impossibilità di attivarsi; infatti, l'ulteriore arrivo di

altre proteasi attivanti che idrolizzano il corretto sito di attivazione non è in grado di trasmettere alcun segnale.⁹⁰ Tuttavia, questi recettori disarmati possono ancora segnalare attraverso un'attivazione intermolecolare (vedi Fig. 1C).

Figura 12 – Meccanismo di attivazione dei PARs.



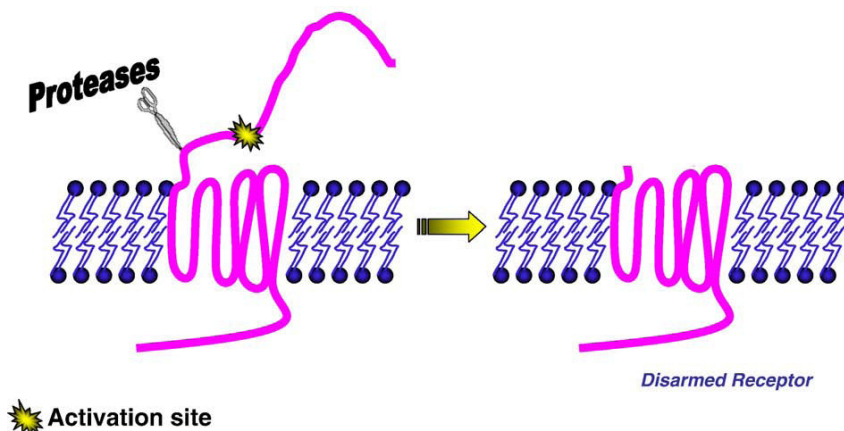
A: Le proteasi idrolizzano in un sito specifico il dominio N-terminale extracellulare rivelando una nuova sequenza terminale che agisce come *tethered ligand* il quale attiva il recettore. Il clivaggio specifico nel sito di attivazione libera un piccolo peptide chiamato PARstatin il quale possiede a sua volta proprietà funzionali. **B:** Alcuni PARs (recettore in grigio) possiedono delle “protease-interacting sequences”, poste a monte o a valle del sito di attivazione del recettore, che permettono alle proteasi di essere attratte nelle prossimità del sito di attivazione facilitandone il taglio proteolitico. **C:** Il *tethered ligand* di un PAR attivato può transattivare un PAR adiacente legandosi al secondo *loop* extracellulare del recettore adiacente. (da Vergnolle, *Pharmacology & Therapeutics* 2009)

Tabella 8 – Peptidi attivatori e proteasi attivatrici o disarmanti i PARs.

	Sequenza <i>tethered ligand</i>	Proteasi attivatrici	Proteasi disarmanti
PAR ₁	Uomo: SFLLR; topo/ratto: SFFLR.	Trombina, tripsina, catepsina G, fattore VIIa, fattore Xa, plasmina, MMP1.	Callicreina 14
PAR ₂	Uomo: SLIGKV; topo/ratto: SLIGRL.	Tripsina, triptasi, fattore Xa, callicreine (14/5/6), proteinasi 3.	Elastasi neutrofila, proteinasi 3, catepsina G, elastasi P.aeruginosa, proteasi T. denticola.
PAR ₃	Uomo: TFRGAP; topo: SFNGGP.	Trombina, tripsina, fattore Xa.	
PAR ₄	Uomo: GYPGQV; topo: GYPGKF.	Trombina, tripsina, catepsina G, fattore VIIa, fattore Xa, callicreina 14.	

(modificata da Vergnolle, *Pharmacology & Therapeutics* 2009)

Figura 13 – Meccanismo di disarmo dei PARs



(da Vergnolle, *Pharmacology & Therapeutics* 2009)

3.1.2. Meccanismo di trasduzione del segnale

I PARs possono essere accoppiati a proteine G eterodimeriche differenti. Il PAR₁, il primo di questa famiglia di recettori ad essere stato studiato, interagisce con diverse subunità α : in particolare con la subunità $G_{q11\alpha}$, $G_{12/13\alpha}$ e $G_{i\alpha}$. Uno dei principali meccanismi di attivazione, che coinvolge la subunità $G_{q11\alpha}$, determina l'attivazione della fosfolipasi C, l'idrolisi dei fosfoinositidi e la formazione di inositolo trifosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG) con la successiva mobilitazione del calcio intracellulare e l'attivazione della fosfochinasi C (PKC) nonché della fosfolipasi A₂. PAR₁ media, inoltre, l'attivazione della Rho-chinasi, accoppiandosi alla subunità $G_{12/13\alpha}$, e inibisce la formazione di AMPc attivando la subunità $G_{i\alpha}$. Tra i vari sottotipi di PARs, vi sono delle

differenze soprattutto per quanto riguarda le subunità coinvolte in questi processi, e gli unici dati noti sono relativi al PAR₁. Meno noto è il meccanismo di *signaling* del PAR₂. È stato dimostrato che gli agonisti del recettore PAR₂ stimolano la produzione di IP3 e la mobilitazione del calcio intracellulare in numerose linee cellulari, incluse cellule transfettate con il cDNA per il PAR₂, cellule epiteliali (cheratinociti ed enterociti), cellule della muscolatura liscia e numerose linee cellulari tumorali. Attivatori PAR₂ attivano le MAP-chinasi ERK1/2 e solo debolmente la MAP-chinasi p38. L'attivazione del PAR₄ che è associato ad una proteina G_q determina l'idrolisi del fosfoinositide e la mobilitazione del calcio intracellulare.⁸⁹

3.1.3. Meccanismo di disattivazione dei PARs

Il clivaggio proteolitico dei PARs è irreversibile: il recettore non può essere riattivato *de novo* da una successiva proteolisi. La natura irreversibile dell'attivazione suggerisce che il recettore non può essere riciclato una volta attivato. Questo rende le cellule non responsive alle proteasi per un notevole periodo di tempo, almeno fino a che la membrana plasmatica non si sia ricaricata di recettori di nuova sintesi o stoccati, ma comunque intatti e quindi nella forma attivabile. È per questo motivo che i PAR vengono definiti “*one shot*” receptors.⁸⁹

La continua presenza del *tethered ligand* attaccato al recettore determina il problema di come il segnale intracellulare possa essere terminato. Due sono i principali meccanismi che possono limitare il segnale prodotto dai PARs: la desensibilizzazione e la rimozione del recettore dalla superficie cellulare attraverso l'endocitosi. Il recettore PAR è desensibilizzato attraverso un meccanismo fosforilazione-dipendente e dal legame con la β-arrestina. Per quanto riguarda PAR₁, è stato dimostrato che anche l'endocitosi clatrina dipendente del recettore partecipa alla regolazione del segnale.⁹² L'internalizzazione PAR₂ avviene, invece, attraverso un meccanismo arrestina dipendente (β-arrestina 1 o 2).⁹³ Anche l'ubiquitinazione può essere implicata nel riciclo del PAR₂; questo processo non interviene nell'endocitosi recettoriale, ma nella traslocazione del recettore dagli endosomi precoci a tardivi e ai lisosomi dove la degradazione proteica spegne in maniera inequivocabile il segnale.⁹⁴

3.1.4. *Protease-activated receptor statin*

A seguito del taglio proteolitico della regione N-terminale del recettore nel sito di attivazione viene rilasciato un peptide, denominato PARstatin, lungo approssimativamente 40 amminoacidi il quale può esercitare alcune funzioni biologiche.⁹⁵ La somministrazione di un peptide sintetico corrispondente alla sequenza amminoacidica del peptide rilasciato a seguito dell'attivazione del recettore PAR₁ (PAR₁statin) promuove in vitro l'aggregazione piastrinica e l'adesione delle piastrine all'endotelio.⁹⁶ Recentemente uno studio condotto in vivo ha dimostrato che il peptide PAR₁statin esercita una forte attività inibitoria dell'angiogenesi (inibizione della migrazione, della crescita cellulare e della formazione di una rete simil-capillare).⁹⁵ È noto che PAR₁statin è capace di attraversare la membrana plasmatica delle cellule endoteliali grazie alla presenza di un dominio idrofobico del peptide.⁹⁵ Tuttavia, il meccanismo molecolare esatto attraverso il quale PAR₁statin può esercitare il proprio effetto biologico è ancora ignoto. L'attività biologica degli altri peptidi rilasciati dall'attivazione dei rimanenti PARs non è stata ancora riportata. Il fatto che il clivaggio proteolitico della regione terminale possa esercitare un duplice effetto, uno conseguente all'interazione del *tethered ligand* con il recettore l'altro determinato dal peptide rilasciato dal clivaggio proteolitico rende ancora più complesso il quadro delle funzioni fisiopatologiche conseguenti all'attivazione in vivo dei PARs.

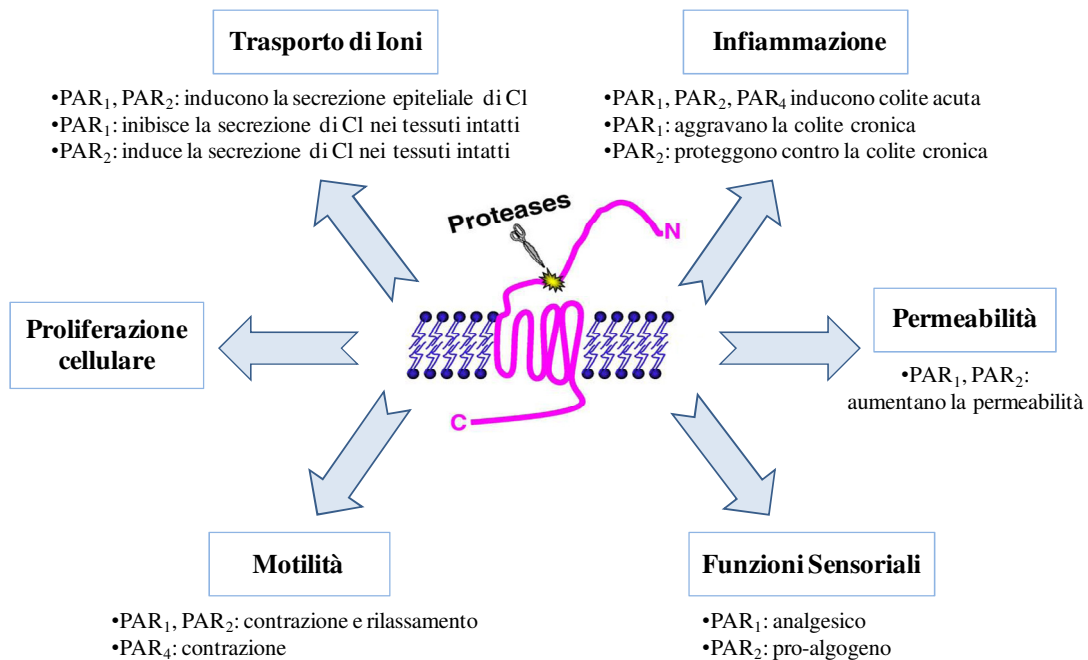
3.1.5. *PARs nell'intestino: espressione e funzione*

I PARs sono espressi sostanzialmente lungo tutto il tratto gastrointestinale e il loro livello di espressione può variare significativamente da un organo all'altro. Nell'uomo, per esempio, PAR₁ e PAR₂ sono fortemente espressi nel colon e nell'intestino tenue, ma più debolmente nello stomaco. PAR₃ è espresso nello stomaco e nel piccolo intestino allorché PAR₄ è fortemente espresso nel colon e nel tenue. A livello cellulare PAR₁ e PAR₂ sono espressi sulle cellule endoteliali della lamina propria, sulle cellule epiteliali, sulle cellule muscolari lisce, sui neuroni enterici, sui fibroblasti e da un certo numero di cellule dell'immunità (neutrofili, mastociti, linfociti, monociti, macrofagi). PAR₄ è stato riscontrato sulla superficie epiteliale e nella sottomucosa. Quali tipi cellulari esprimano PAR₃ resta invece ancora da determinare.⁸⁹

La distribuzione dei PARs suggerisce, quindi, che questi recettori sono implicati in un numero importante di processi fisiopatologici che interessano il tratto digestivo.⁹⁷

Utilizzando dei peptidi selettivi, corrispondenti al *tethered ligand* rilasciato dopo taglio proteolitico del dominio N terminale extracellulare, per ognuno di questi recettori sono stati identificati gli effetti dell'attivazione dei PARs su molte funzioni dell'intestino: trasporto, motilità, proliferazione, permeabilità, funzioni sensitive, e risposta immunitaria (Fig. 14).

Figura 14 – Conseguenze dell'attivazione dei PARs sui processi fisiologici che modulano le funzioni del tratto digestivo.



(modificata da Houle & Vergnolle, *Hépatogastro* 2006)

L'attivazione di PAR₁ e PAR₂ o in vitro su cellule epiteliali, ma anche in vivo nel tessuto intestinale ha dimostrato indurre la secrezione cloridrica associata al trasporto di fluidi attraverso la mucosa determinando diarrea.⁹⁸⁻¹⁰⁰

La contrazione del muscolo liscio intestinale può essere modulata dall'attivazione di PAR₁, PAR₂ e PAR₄;¹⁰¹⁻¹⁰⁴ in vivo agonisti del recettore PAR₁ e PAR₂ determinano un aumento del transito gastrointestinale.¹⁰⁵

Anche se nessuno studio in vivo ha caratterizzato gli effetti dell'attivazione dei PARs in modelli di cancro, è stato dimostrato che l'attivazione di PAR₁ e PAR₂ può indurre la proliferazione di linee cellulari epiteliali di natura tumorale.^{106,107}

Sia PAR₁ che PAR₂ agonisti possono determinare una perdita di funzionalità della barriera intestinale amplificando il passaggio di fluidi, di macromolecole e anche di batteri attraverso gli enterociti della mucosa.^{108,109}

Recentemente, all'attivazione del recettore PAR₂ è stato associato un ruolo pro-nocicettivo in grado di determinare uno stato di ipersensibilità viscerale¹¹⁰. In fine, è stato dimostrato che l'attivazione del recettore PAR₁, PAR₂ e PAR₄ è in grado di evocare una risposta infiammatoria acuta nel colon di topo.¹¹¹⁻¹¹³

Numerosi studi suggeriscono che la stimolazione del recettore PAR₁ gioca un ruolo di primo piano nella genesi di una risposta infiammatoria intestinale nei modelli di colite T-helper1 dipendenti (TNBS acido trinitrobenzensulfonico),¹¹⁴ mentre allo stesso tempo esercita un effetto anti-infiammatorio nei tipi di colite T-helper2 dipendenti (colite indotta da oxazolone).¹¹⁵

Animali knock-out per il recettore PAR₂ hanno permesso di osservare, in entrambi i modelli di colite sia Th1 che Th2 dipendenti, la funzione protettiva dovuta all'assenza del recettore in questione. Il ruolo del PAR₂ come attivatore delle cellule immunitarie intestinali non è stato ancora dimostrato e gli effetti proinfiammatori del recettore PAR₂ sembrano essere dovuti all'attivazione di altri tipi cellulari intestinali.¹¹⁶

È stato dimostrato che l'attivazione intracolica del recettore PAR₂ (ma non PAR₁) determina uno stato infiammatorio di colite attraverso un meccanismo neurogenico che coinvolge la partecipazione di neuropeptidi come la sostanza P e il CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide). Tuttavia, un altro studio dimostra che in modelli di colite indotta da TNBS l'ulteriore stimolazione con PAR₂ agonisti svolge, al contrario, un'azione protettiva a seguito della stimolazione dei neuroni enterici afferenti attraverso il rilascio di CGRP.¹¹⁷

Cattaruzza e collaboratori nel 2006 hanno pubblicato uno studio riguardante gli effetti protettivi dell'attivazione del recettore PAR₂ sull'alterazione della motilità e sul danno tissutale indotto dall'ischemia e riperfusione mesenterica nei roditori.¹¹⁸

3.1.6. *Proteasi seriniche intestinali*

Tra tutti gli apparati dell'organismo, il tratto gastrointestinale è esposto, sia in circostanze del tutto fisiologiche sia durante diversi stati patologici, alla più alta concentrazione di proteasi seriniche.

Le proteasi digestive prodotte dalle ghiandole dello stomaco o dell'intestino, come il pancreas (tripsina, chimotripsina ed elastasi), riempiono costantemente il lume gastrointestinale. È stato dimostrato che la concentrazione fisiologica di tripsina presente nel lume del piccolo intestino può attivare i PAR₂ presenti sulla membrana apicale degli enterociti.¹¹⁹ Nel corso di uno stato infiammatorio intestinale sono stati riscontrati nel fluido intraluminale più alti livelli di triptasi e di tripsina.¹²⁰⁻¹²³ È stato dimostrato che pazienti affetti da IBS (*irritable bowel syndrome*) presentano a livello rettale e di colon ascendente un'attività proteolitica tissutale "*trypsin-like*" in grado di attivare i PAR₂ presenti sui neuroni sensitivi.¹¹⁰ Non è chiaro come la tripsina pancreatica, che è normalmente rilasciata nel primo tratto intestinale in forma inattiva (tripsinogeno) per scopi digestivi possa essere trovata attiva nell'ultimo tratto intestinale. Comunque, diverse isoforme di tripsina extrapancreatica possono essere secrete da altri tipi cellulari incluse le cellule endoteliali, i neuroni e le cellule epiteliali.¹²⁴⁻¹²⁶ In fine, l'intestino è colonizzato da batteri e quindi esposto a proteasi di origine procariotica. In circostanze normali, le giunzioni occludenti (o *tight junctions*) delle cellule epiteliali agiscono come barriera capace di impedire l'ingresso di proteasi dal lume ai tessuti. Tuttavia, durante condizioni di stress o stati infiammatori in cui la permeabilità di questa barriera è alterata, le proteasi dal lume possono penetrare la mucosa e la tonaca muscolare intestinale.¹²⁷

Oltre a questi enzimi proteolitici, durante fenomeni infiammatori o traumi tissutali, anche le proteasi della cascata della coagulazione (FXa, FVIIa, trombina) possono essere potenzialmente presenti nell'intestino.¹²⁸ Inoltre, le proteasi possono essere rilasciate dalle cellule infiammatorie residenti o richiamate per diapedesi nel sito infiammatorio. Proteasi di origine mastocitaria, come la triptasi, e leucocitaria, come catepsina G, proteinasi 3 ed elastasi, sono state riscontrate a livello intestinale e plausibilmente partecipano alla risposta infiammatoria.

Riassumendo, molti di questi enzimi che sono fisiologicamente presenti nel lume dell'intestino o che sono generati e rilasciati durante l'infiammazione possono attivare i PARs delle cellule gastroenteriche influenzando la motilità, la secrezione, la neurotrasmissione e la proliferazione cellulare.

3.2. Scopo della ricerca

Durante la seconda parte del dottorato la mia attività di ricerca si è svolta in collaborazione con la Dott.ssa Nathalie Vergnolle, responsabile dell'équipe: *Médiateurs de l'inflammation, infection et douleur inflammatoire*, presso l'Unità 563 del Centro di Fisiopatologia di Toulouse-Purpan dell'INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), in Francia. Insieme, abbiamo ipotizzato un possibile ruolo svolto dalle proteasi nel danno da ischemia e riperfusione, in particolare, a livello intestinale. Infatti, numerose evidenze scientifiche attribuiscono all'azione delle proteasi seriniche un ruolo rilevante nella patogenesi di malattie infiammatorie gastrointestinali.⁸⁹ A questo scopo dei topolini sono stati sottoposti a un'ischemia di 90 minuti, per occlusione reversibile dell'arteria mesenterica superiore (SMA), seguita da tre diversi periodi di riperfusione: 0, 2 e 5 ore (I/R). Come controllo interno (Sham) abbiamo sottoposto un gruppo di animali a laparotomia addominale individuando la SMA senza tuttavia occluderla.

L'obiettivo dello studio è stato quello di:

1. valutare se il danno da ischemia e riperfusione intestinale è associato ad un aumento dell'attività proteolitica di proteasi seriniche nel plasma e nel tessuto intestinale;
2. dimostrare un eventuale ruolo svolto dalle proteasi seriniche nel danno intestinale post-ischemico attraverso la somministrazione in vivo di un inibitore enzimatico a largo spettro: il FUT-175;
3. infine, per chiarire se l'effetto proinfiammatorio delle proteasi seriniche può essere diretto o mediato dall'interazione con alcuni recettori specifici, un gruppo sperimentale è stato trattato con un antagonista selettivo del recettore PAR₁ e sottoposto a ischemia e riperfusione; un altro gruppo di animali PAR₂^{-/-} è stato sottoposto alle stesse condizioni chirurgiche e confrontato con il proprio ceppo wild type.

3.3. Materiali e metodi

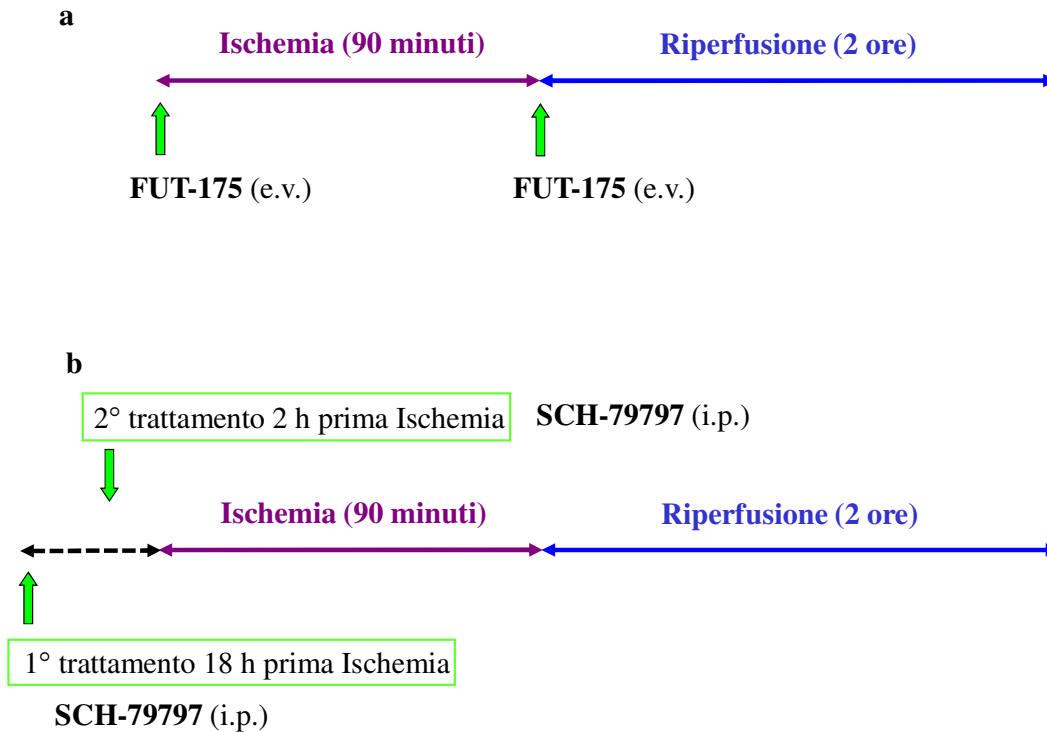
Il protocollo sperimentale è stato approvato dal Comitato Etico e di Salute Animale di Toulouse rispettando le linee guida del Consiglio Francese di Salute Animale e in conformità alle normative della comunità Europea sull'utilizzo e la cura degli animali da laboratorio. Questa sperimentazione è stata condotta su topi maschi C57BL/6 (20-25 g; 8 settimane di età circa) ottenuti da Janvier (Le Genest Saint Isle, France). $PAR_2^{-/-}$ e wild type ($PAR_2^{+/+}$) sono stati ottenuti all'origine da Johnson & Johnson Pharmaceutical Research Institute e mantenuti nello stabulario dell'Unità 563 dell'INSERM. Gli animali sono stati allevati in un ambiente *pathogen-free* con libero accesso all'acqua e al cibo.

Chirurgia addominale e trattamenti

Gli animali sono stati anestetizzati con Nembutal (50 mg/kg i.p.). Dopo laparotomia l'intestino è stato estratto dalla cavità addominale e spostato verso sinistra per individuare e occludere temporaneamente, con una clip microvascolare atraumatica, l'arteria mesenterica superiore (SMA). Con questa procedura si riesce ad ottenere una condizione di ischemia acuta estesa a tutto l'intestino tenue e alla porzione prossimale del crasso. La temperatura corporea è mantenuta tramite l'utilizzo di un tappeto termico riscaldante. Dopo 90 minuti di ischemia la clip è stata rimossa e l'addome è stato suturato per permettere una ri-perfusione di 0, 2 o 5 ore. Un gruppo di animali "falso operato" (Sham), sottoposto a laparotomia addominale senza occlusione arteriosa, è stato utilizzato come controllo. Alla fine del periodo di ri-perfusione, previa dislocazione cervicale, gli animali sono stati sottoposti a laparo/toracotomia al fine di raccogliere il sangue per puntura cardiaca e prelevare il tratto intestinale.

Quando previsto, un gruppo di animali è stato trattato con l'inibitore delle proteasi seriniche, il composto FUT-175 (10 mg/kg in fisiologica, Santa Cruz Biotechnology, France), somministrato per via intravenosa (e.v.) all'inizio del periodo ischemico e ripetuto al momento della ri-perfusione (Fig. 15a). L'antagonista del recettore PAR_1 il composto SCH-79797 (5 mg/kg in carbossimetilcellulosa, Tocris, France) è stato somministrato per via intraperitoneale (i.p.) in due riprese: 18 ore e 2 ore prima dell'operazione chirurgica (Fig. 15b). Alla stessa procedura chirurgica sono stati sottoposti topi $PAR_2^{-/-}$ e il corrispettivo ceppo wild type ($PAR_2^{+/+}$).

Figura 15 – Trattamenti.



Attività proteolitica (AP)

L'attività proteolitica, indice del rilascio di proteasi biologicamente attive, è stata misurata nel plasma e nel tessuto intestinale. Dopo il sacrificio una parte di tessuto ileale è stata prelevata, lavata in PBS 1X, al fine di allontanare il contenuto luminale e con esso l'eventuale tripsina pancreatica presente, ed infine omogenata in 1 ml di PBS 1X pH=7.2, arricchito con 1% NP-40, 0,5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, utilizzando un "Precellys 24 homogeniser" (Bertin Technologies, Zyme, France). L'omogeneizzazione corrispondeva a 2 cicli di 30 secondi a 6500 rpm alla temperatura di 4°C. L'omogenato tissutale ottenuto è stato centrifugato a 5000 rpm per 5 minuti. L'attività proteolitica veniva misurata utilizzando il substrato tosyl-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilide (150 µM Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) in 100 mM di Tris/HCl, 1 mM CaCl₂ buffer a pH 8. Il grado di idrolisi del composto è stato misurato a 37°C per 30 minuti. Il valore di assorbanza del surnatante è stato letto a 405 nm da uno spettrofotometro "microplate reader NOVOstar™" (BMG Labtech, France). L'attività è stata comparata con una diluizione nota di tripsina derivata da pancreas suino (Sigma) ed espressa come unità di tripsina su milligrammi di

proteine contenuti nel campione ileale (U/mg) o su millilitri di plasma (U/ml). La concentrazione di proteine è stata determinata utilizzando un dosaggio colorimetrico (BCA kit[®], Pierce, Thermo Scientific, Courtaboeuf, France). Quando richiesto alcuni inibitori specifici di proteasi sono stati incubati per 20 minuti a temperatura ambiente insieme con il supernatante di omogenato tissutale o campioni di plasma: E-64 10 µM (in H₂O, Tebu-bio, Le Perray en Yvelines Cedex, France), Pepstaintin A 1 µM (in DMSO, Sigma), AESBF 1 mM (in H₂O, Tebu-bio), FUT-175 50 µM (in H₂O, Tebu-bio).

Attività Mieloperossidasi (MPO)

L'attività dell'enzima MPO, indicatore dell'accumulo tissutale di neutrofilo, è stata misurata in tessuti ileali raccolti al momento del sacrificio secondo il metodo Krawisz⁶⁶ modificato. Una parte di tessuto ileale è stata omogenata in 1400 µl di buffer PBS pH 6 contenenti esadeciltrimetilammonio (HTAB, Sigma) allo 0.5% utilizzando un "Precellys 24 homogeniser". L'omogeneizzazione consisteva in 3 cicli da 30 secondi at 6800 rpm a 4°C. L'omogenato tissutale è stato centrifugato a 13000 rpm per 5 minuti e un'aliquota del surnatante veniva fatta reagire con un soluzione di reazione contenente H₂O₂ 0.0005% e O-dianisidina (Sigma) 0.167 mg/ml in PBS 50mM pH 6. I dati sono stati letti da uno spettrofotometro "microplate reader NOVOstarTM" a 450 nm. L'attività è stata espressa come milliunità di MPO su milligrammi di proteine contenuti nel AMPcione (mU/mg). La concentrazione di proteine è stata determinata utilizzando un dosaggio colorimetrico BCA kit[®].

Curva di sopravvivenza

Il grado di sopravvivenza di ogni gruppo è stata ottenuto osservando gli animali dall'inizio dell'ischemia nel corso della riperfusione.

Espressione proteica delle chemochine KC e MCP-1

Campioni di tessuto ileale raccolti al momento del sacrificio degli animali sottoposti a 90 minuti di ischemia seguiti da 2 ore di riperfusione sono stati omogenati in 700 µl di buffer di lisi tissutale (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM pirofosfato di sodio, 1 mM beta-glicerofosfato, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml leupeptina; Sigma) arricchito con un cocktail di inibitori di proteasi (Sigma-fast, Sigma) utilizzando un "Precellys 24 homogeniser". L'omogeneizzazione consisteva in 2

cicli di 30 secondi a 6.500 X g a 4°C. Dopo centrifugazione (10.000X g 10 min a 4°C), i supernatanti venivano filtrati attraverso delle colonne QIAshredder. Cinquanta microlitri di questo omogenato sono stati usati per simultanei dosaggi di KC (keratinocyte chemoattractant) e MCP-1 (monocyte chemoattractant proteins) secondo la tecnica del cytometric bead array (CBA) servendosi di un citofluorimetro a flusso FAC SCalibur secondo le istruzioni del fornitore (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). La concentrazione di chemochine è stata estrapolata da curve standard attraverso l'utilizzo del software *FCAP Array*[®]. I dati sono stati espressi come picogrammi di chemochine su milligrammi di proteine contenuti nel campione (pg/mg). La concentrazione di proteine è stata determinata utilizzando un dosaggio colorimetrico BCA kit[®].

Western blot

La tecnica del Western blot è stata applicata a campioni di tessuto ileale raccolti dopo il sacrificio di animali sottoposti a 90 minuti di ischemia seguiti da 2 ore di riperfusione. Le proteine sono state estratte omogenando il tessuto in 1000 µl di buffer PBS 1X pH 7.2 con NP-40 1%, sodio deossicolato 0,5%, SDS 0.1%; Sigma) arricchito con un cocktail di inibitori di proteasi (Sigma-fast, Sigma) attraverso un "Precellys 24 homogeniser". L'omogeneizzazione consisteva in 2 cicli di 30 secondi a 6500 rpm a 4°C. L'omogenato tissutale è stato omogenato a 5000 rpm per 5 minuti. La concentrazione di proteine è stata normalizzata a 60 mg di proteine per 30 µl di e risospese in Laemmli buffer (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). La concentrazione di proteine è stata determinata utilizzando un dosaggio colorimetrico BCA kit[®]. Le proteine sono state in seguito separate su SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) (7.5-10% di poliacrilammide) e trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad). Le membrane sono state sondate con anticorpi contro l'actina (ab1801 Abcam, Paris, France, 1:1000), la tripsina (sc-67388, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany, 1:200), la trombina (ab83981 Abcam, 1:1000), la plasmina (sc-15036, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany, 1:200) o la chimotripsina (sc-69255, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany, 1:200). Per rivelare la presenza delle bande proteiche le membrane sono state sondate con anticorpi secondari coniugati a IRdye 680 o 800 (LI-COR[®], Cergy-Pontoise-Cedex, Francia, 1:1000). La rilevazione e la quantificazione è stata eseguita attraverso l'utilizzo del sistema *Odyssey infrared imaging system* (LI-COR[®]).

Analisi statistica

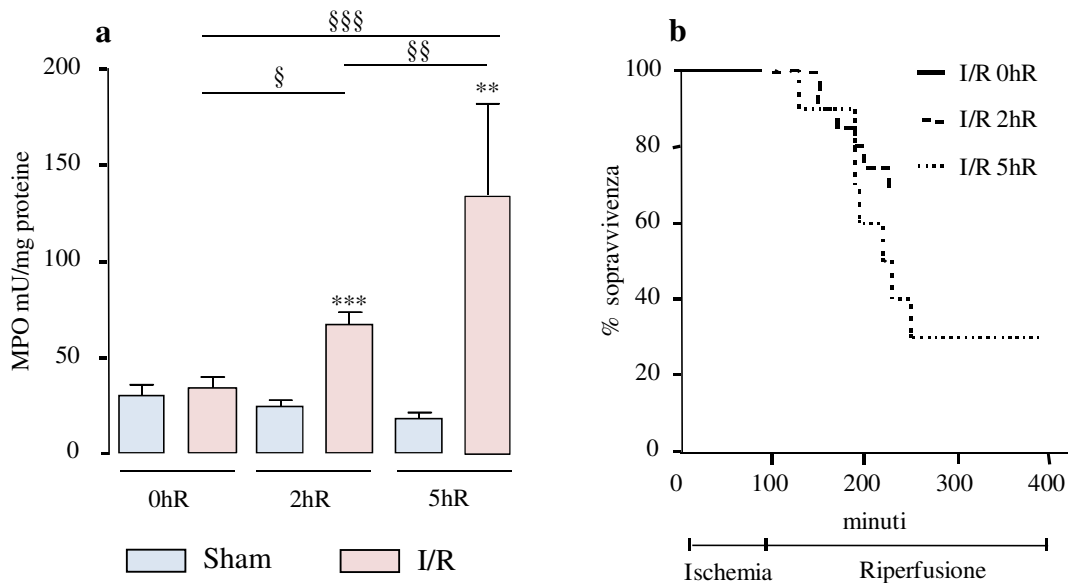
I dati sono espressi come medie \pm errore standard e analizzati statisticamente utilizzando il software GraphPad Prism 5. Tutti i dati erano distribuiti normalmente. L'analisi statistica tra i gruppi IR e Sham è stata eseguita utilizzando il t-test di Student per i dati non appaiati. Le differenze tra i trattamenti nelle stesse condizioni sperimentali (I/R o Sham) è stata eseguita attraverso l'analisi della varianza 1-way ANOVA seguita dal post-test di Tukey. Le differenze sono state considerate significative per valori di $*P \leq 0.05$, molto significative per valori di $**P \leq 0.01$ ed estremamente significative per valori di $***P \leq 0.001$.

3.4. Risultati

L'ischemia e riperfusione intestinale è associata a un'aumentata attività proteolitica plasmatica e tissutale.

La determinazione dell'attività della mieloperossidasi (MPO) intestinale viene considerata come utile indicatore dell'infiltrazione tissutale di granulociti neutrofili in risposta ad un processo infiammatorio acuto. Come atteso, l'applicazione del clip all'origine dell'arteria mesenterica superiore non produce al termine dei 90 minuti di ischemia alcun aumento significativo dell'attività mieloperossidasi rispetto a quanto osservato con la semplice manipolazione dell'intestino realizzata nei topini falsi operati (Sham). I dati riguardanti l'applicazione di un successivo periodo di riperfusione dimostrano che il ritorno dell'ossigeno ai tessuti è l'evento fondamentale ai fini dello sviluppo del danno tissutale che si esprime innanzitutto in una massiccia chemiotassi tissutale di leucociti polimorfonucleati.

Figura 16 – Attività mieloperossidasi nei tessuti intestinali prelevati da topolini I/R e Sham (a) e curve di sopravvivenza dei gruppi I/R ai diversi tempi di riperfusione (b).

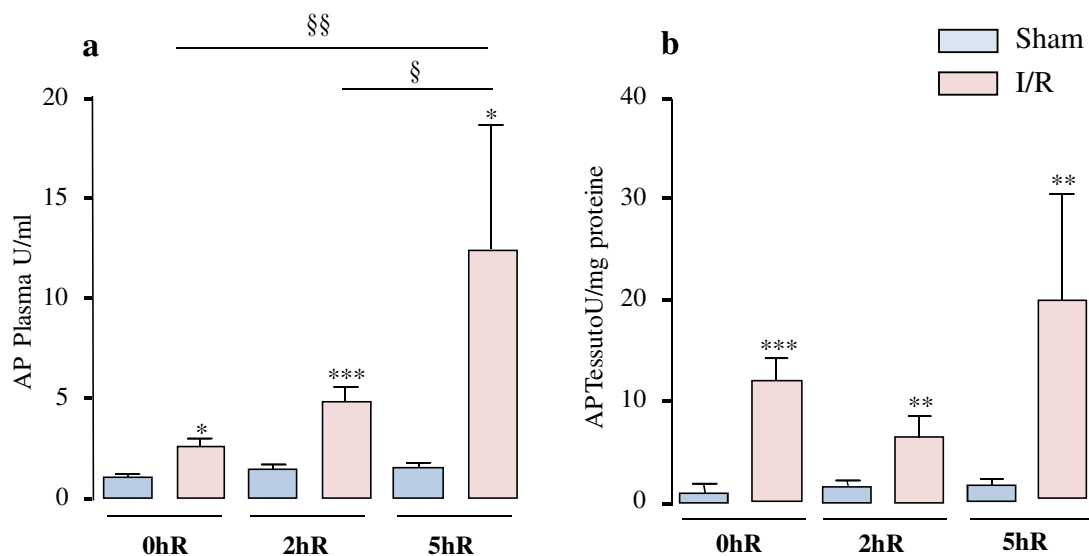


Infatti, l'attività mieloperossidasi intestinale aumenta significativamente negli animali che hanno subito i 90 minuti di occlusione arteriosa seguiti da 2 ore di riperfusione rispetto al corrispondente gruppo di animali Sham (67.1 ± 5.0 I/R 2hR vs 24.4 ± 2.3 Sham,

$P \leq 0.001$). Il prolungamento del tempo di riperfusione a 5 ore incrementa ulteriormente l'attività dell'MPO (134.1 ± 48.1 I/R 5hR vs 18.0 ± 2.7 Sham, $P \leq 0.01$) (Fig. 16a).

Il danno da ischemia e riperfusione intestinale è associato a conseguenze sistemiche che compromettono le funzioni vitali dell'animale. La figura 16b dimostra che la sola condizione ischemica non determina alcun incremento di mortalità, mentre il tasso di sopravvivenza diminuisce all'aumentare della lunghezza del periodo di riperfusione (75% per il gruppo I/R 2hR e 30% per il gruppo I/R 5hR).

Figura 17 – Attività proteolitica nel plasma (a) e nel tessuto intestinale (b) provenienti da topolini I/R e Sham.



Allo scopo di rintracciare la presenza di un'attività proteolitica associata al danno da ischemia e riperfusione è stata misurata nel plasma e nell'omogenato di tessuto intestinale la presenza di proteasi capaci di idrolizzare il substrato tosyl-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilide. L'attività proteolitica rilevata nel plasma a seguito dell'applicazione del clip all'origine dell'arteria mesenterica superiore raddoppia in maniera significativa rispetto all'animale falso operato (2.6 ± 0.4 I/R 0hR vs 1.1 ± 0.18 Sham, $P \leq 0.05$). Non solo, questo incremento aumenta alle 2 ore 4.9 ± 0.69 (I/R 2hR vs. 1.5 ± 0.25 Sham, $P \leq 0.001$) ed si amplifica ulteriormente alle 5 ore di riperfusione (12.5 ± 6.2 I/R 5hR vs 1.5 ± 0.24 Sham, $P \leq 0.05$) (Fig. 17a). Anche nel tessuto intestinale l'ischemia è sufficiente a determinare in modo altamente significativo l'aumento dell'attività proteolitica (12.1 ± 2.1 I/R 0hR vs 0.9 ± 0.8 Sham, $P \leq 0.001$). La presenza di questa aumentata attività proteolitica è mantenuta dopo le

2 e le 5 ore di riperfusione nel gruppo I/R rispetto al gruppo Sham (6.5 ± 2 vs I/R 2hR 1.5 ± 0.7 Sham, $P \leq 0.01$ e 19.9 ± 10.6 I/R 5hR vs 1.4 ± 0.7 Sham, $P \leq 0.01$) (Fig 17b).

Questi dati dimostrano che il danno da riperfusione, abitualmente associato al reclutamento intestinale granulocitario e a conseguenze sistemiche che determinano un rilevante tasso di mortalità, è associato all'attivazione di proteasi, ad attività arginino diretta, sia nel plasma che nel tessuto intestinale. Inoltre, l'aumento nel gruppo I/R di attività proteolitica già rintracciabile alla fine del periodo ischemico suggerisce il ruolo importante di queste proteasi già durante il periodo ipossico.

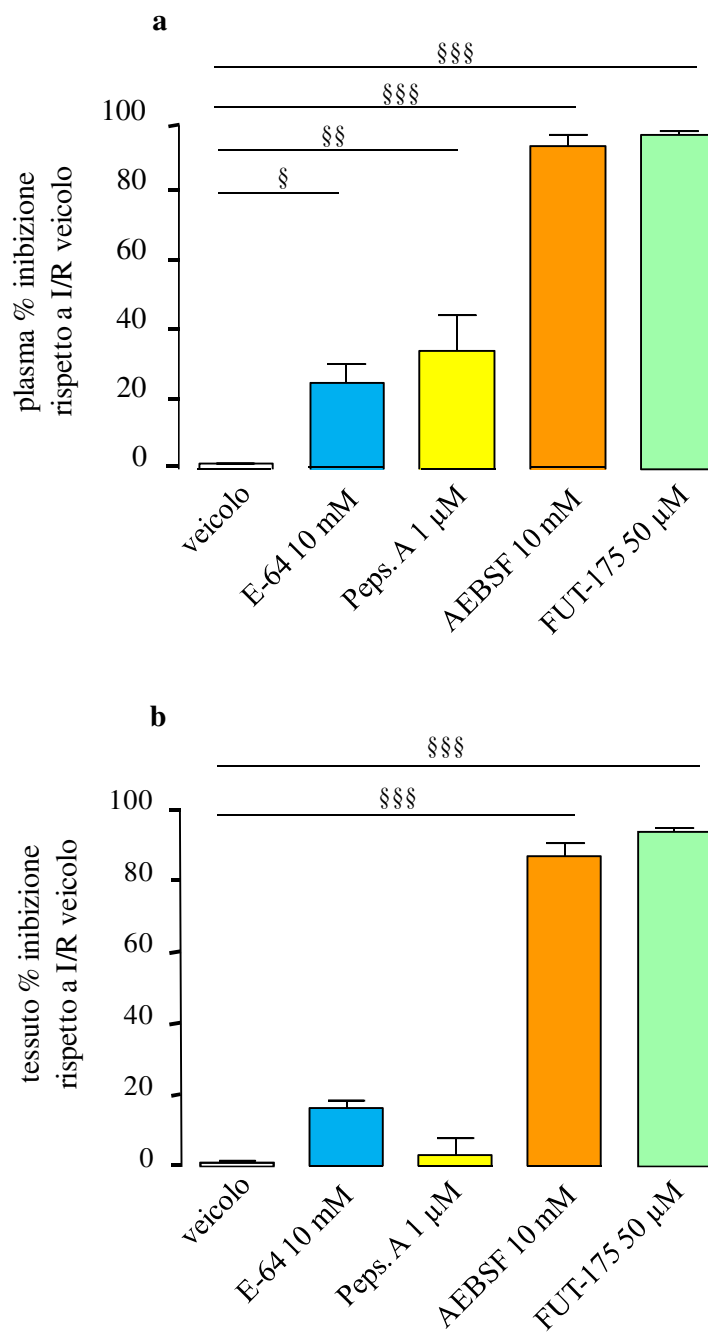
Le proteasi seriniche sono all'origine dell'attività proteolitica associata al danno da ischemia e riperfusione intestinale.

Al fine di chiarire quale classe di proteasi è responsabile dell'aumento dell'attività proteolitica associato al danno da ischemia e riperfusione intestinale nel topo, diversi inibitori specifici per ciascuna classe di proteasi sono stati incubati in vitro (20 minuti a temperature ambiente) insieme con campioni di plasma e omogenato di tessuti intestinali raccolti da animali sottoposti a 90 minuti di ischemia seguiti da 2 ore di riperfusione. In seguito, ne è stata testata l'attività proteolitica residua.

L'utilizzo dell'inibitore di cisteine proteasi, il composto E-64 ($10 \mu\text{M}$) e dell'inibitore di aspartato proteasi il composto Pepstatin A ($1 \mu\text{M}$) ha ridotto in maniera significativa rispettivamente del 23 e del 34% l'attività proteolitica presente nel plasma. Al contrario, l'incubazione degli stessi con l'omogenato tissutale non ha determinato alcuna variazione dei livelli di attività presenti nei campioni. Quando i campioni raccolti dagli animali appartenenti al gruppo I/R sono stati incubati con due differenti inibitori di proteasi seriniche, il composto FUT-175 ($50 \mu\text{M}$) e AEBSF (10mM), l'attività proteolitica misurata è stata totalmente abolita sia nel plasma, (rispettivamente del 93 and 96%) sia nel tessuto intestinale (rispettivamente del 94% e dell'87%) rispetto all'incubazione con il solo veicolo (Fig. 18a e b).

Presi nell'insieme questi dati dimostrano che l'attività proteolitica arginino-diretta associata all'ischemia e riperfusione intestinale è essenzialmente dovuta all'attività di proteasi seriniche. E-64 and Pepstatin A sono stati testati rispettivamente a concentrazioni 1000 e 100 volte superiori ma hanno esibito la stessa capacità inibitoria sui campioni in esame (dati non mostrati).

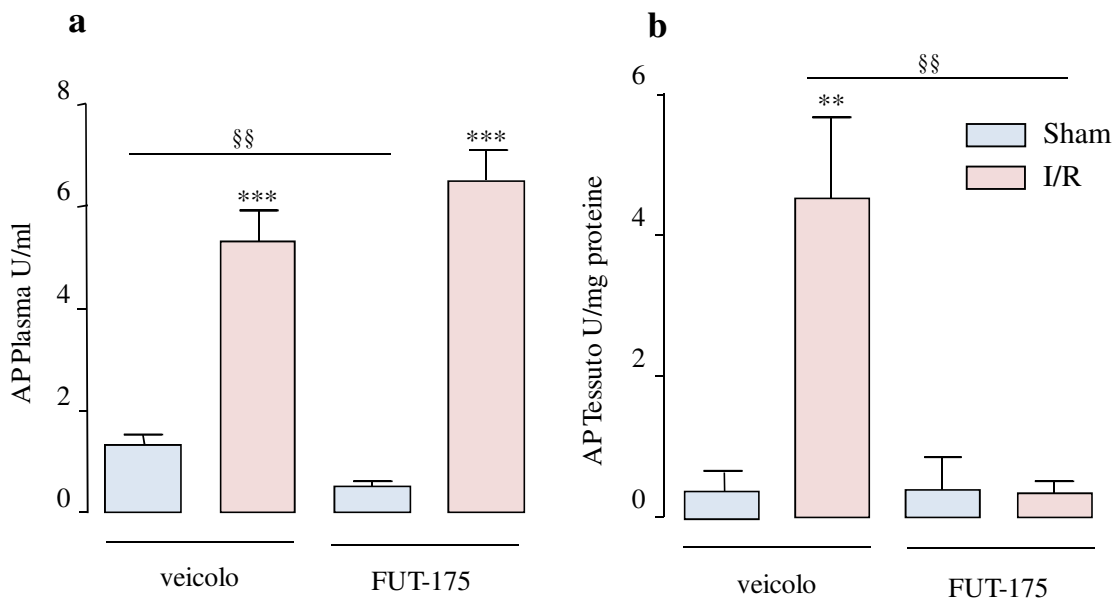
Figura 18 – Inibizione *in vitro* dell'attività proteolitica presente nel plasma (a) e nel tessuto intestinale (b) di topolini I/R sottoposti a 90 minuti di ischemia seguiti da 2 ore di ri-perfusione.



Le proteasi seriniche partecipano al reclutamento granulocitario post-ischemico intestinale

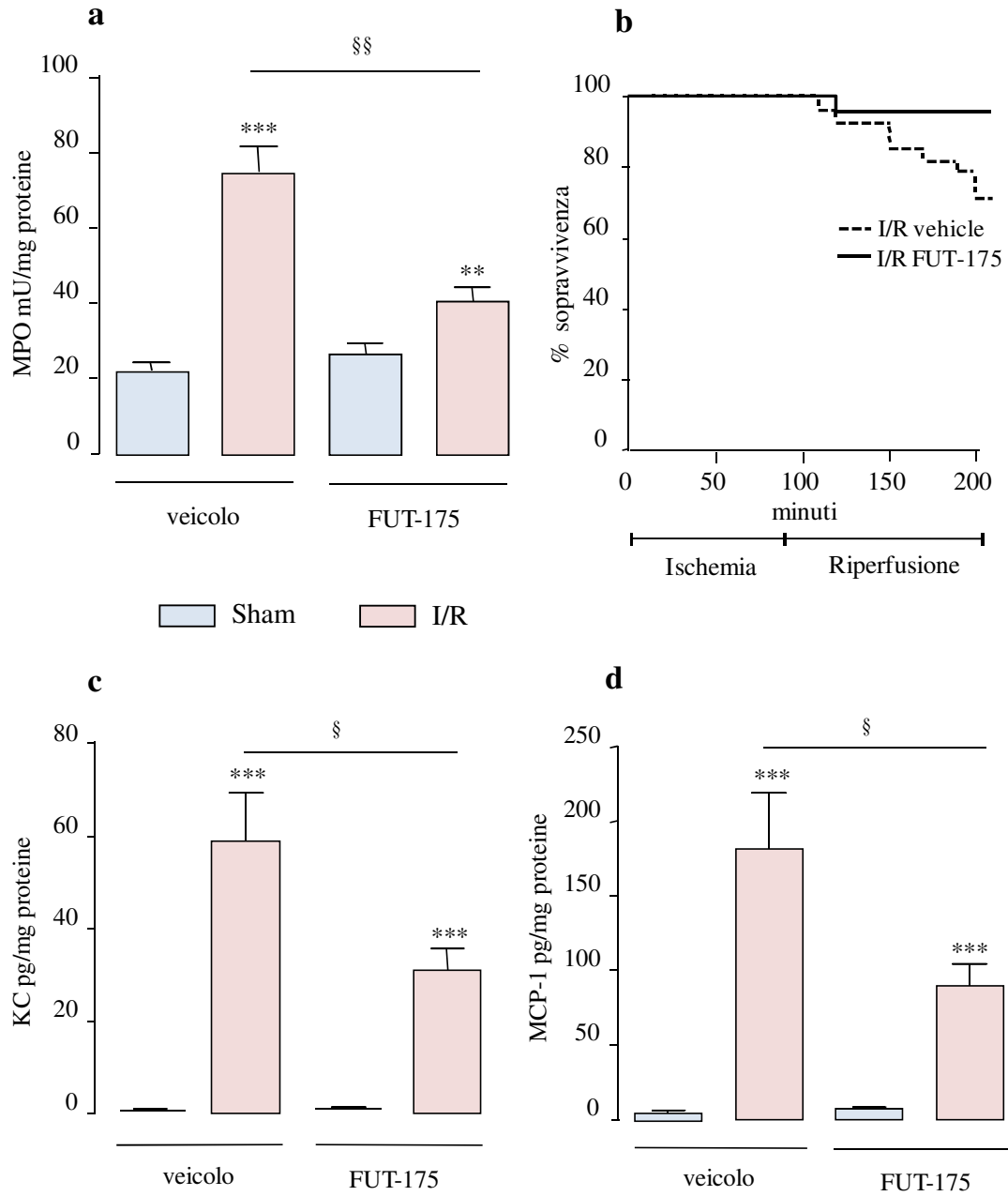
Allo scopo di investigare il ruolo fisiopatologico svolto dalle proteasi seriniche associate all'ischemia e riperfusione intestinale, un gruppo di animali è stato trattato in vivo con un inibitore delle proteasi seriniche il composto FUT-175. Già testato con efficacia *in vitro*, questo composto si contraddistingue per il suo ampio spettro d'azione. Il FUT-175 (10 mg/kg e.v. in fisiologica) è stato somministrato al momento dell'ischemia e ripetuto all'inizio delle due ore di riperfusione.

Figura 19 – Effetto della somministrazione del FUT-175 sull'attività proteolitica nel plasma (a) e nel tessuto intestinale (b) di topolini I/R e Sham.



Come mostrato nella figura 19a la somministrazione endovenosa del FUT-175 non ha modificato il livello di attività proteolitica presente nel plasma associato al danno da ischemia e riperfusione intestinale. Tuttavia, la stessa somministrazione è stata sufficiente a diminuire del 61% l'attività proteolitica plasmatica negli animali Sham (1.3 ± 0.2 Sham veicolo vs 0.4 ± 0.1 Sham FUT-175, $P \leq 0.05$). In modo simile a quanto rilevato *in vitro* la somministrazione del FUT-175 ha completamente abolito l'attività proteolitica tissutale associata alle 2 ore di riperfusione abbassandone l'attività ai livelli del corrispondente gruppo Sham (4.5 ± 1.2 I/R veicolo vs 0.35 ± 0.1 I/R FUT-175, $P \leq 0.01$) (Fig. 19b).

Figura 20 – Effetto della somministrazione del FUT-175 (10 mg/kg e.v.) sull'attività mieloperossidasi intestinale (a), sul grado di sopravvivenza nei topi I/R (b) e sull'espressione proteica di KC (c) e MCP-1 (d).



Anche in questo gruppo di animali la condizione di ischemia e riperfusione determina un rilevante incremento dell'infiltrazione granulocitaria, come indicato dall'attività mieloperossidasi intestinale negli animali I/R trattati con il veicolo rispetto ai corrispondenti animali Sham (74.6 ± 6.9 I/R vs 22.8 ± 2.1 Sham, $P \leq 0.001$). Dall'esame della figura 20a emerge in modo chiaro che il FUT-175 ha ridotto in maniera molto significativa l'attività mieloperossidasi negli animali I/R rispetto al gruppo trattato con solo fisiologica (74.6 ± 6.9 I/R veicolo vs. 40.6 ± 3.7 I/R FUT-175, Sham, $P \leq 0.01$). Le condizioni sperimentali chirurgiche applicate al gruppo di topolini I/R trattati con solo veicolo hanno permesso la sopravvivenza di circa il 71% degli animali utilizzati, mentre il trattamento con FUT-175 ha permesso al 95% dei topi I/R di sopravvivere fino al termine delle 2 ore di riperfusione ($P \leq 0.05$) (Fig. 20b).

La valutazione, attraverso la tecnica del cytometric bead array (CBA), dell'espressione proteica nel tessuto intestinale di due importanti chemochine, KC (keratinocyte chemoattractant) e MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), ha sottolineato il ruolo protettivo svolto dall'inibitore delle proteasi seriniche nei riguardi dell'infiltrazione leucocitaria post-ischemica. Gli effetti dell'ischemia e riperfusione intestinale determinano un aumento significativo dell'espressione tissutale di KC, chemochina coinvolta nella chemiotassi e attivazione dei granulociti neutrofili, e di MCP-1, coinvolta nella chemiotassi dei monociti, rispetto al corrispondente gruppo Sham. La somministrazione intravenosa del FUT-175 ne ha ridotto significativamente l'espressione tissutale intestinale (KC 59.3 ± 10.1 I/R veicolo vs 31.1 ± 4.7 I/R FUT-175, $P \leq 0.05$ e MCP-1 181.3 ± 37.9 I/R veicolo vs 89.4 ± 15.3 I/R FUT-175, $P \leq 0.05$) (Fig. 20c e 20d).

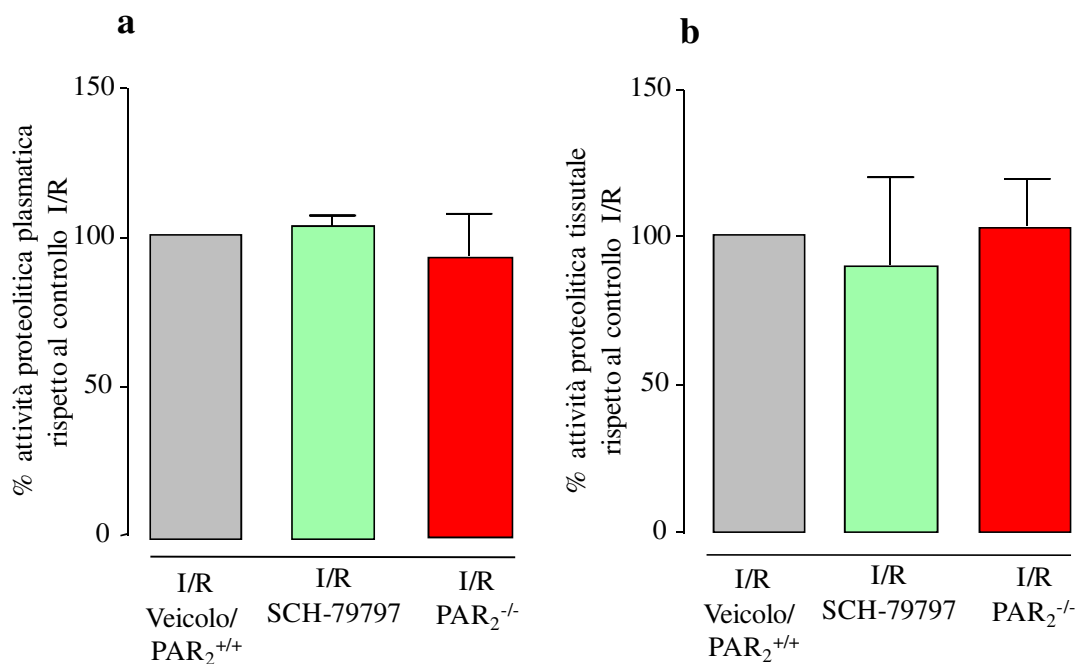
Questi dati suggeriscono che la somministrazione di un inibitore di proteasi seriniche a largo spettro al momento dell'ipossia e ripetuta al momento della reossigenazione tissutale protegge dalle conseguenze locali e sistemiche associate ad una condizione sperimentale di ischemia e riperfusione intestinale nel topolino.

L'attivazione del recettore PAR₁ o PAR₂ contribuisce al reclutamento granulocitario intestinale post-ischemico.

Il trattamento di animali I/R sottoposti a 90 minuti di ischemia seguiti da 2 ore di riperfusione, con l'antagonista recettoriale PAR₁, il composto SCH-79797 (5 mg/kg i.p. in carbossimetilcellulosa) non ha modificato i livelli di attività proteolitica misurati nel plasma e nell'omogenato tissutale di intestino associati all'ischemia e riperfusione rispetto al gruppo I/R sottoposto alle stesse condizioni chirurgiche a cui è stato somministrato il solo veicolo. Tra i gruppi Sham trattati con il veicolo o l'antagonista recettoriale PAR₁ non è stata rilevata nessuna differenza significativa (dati non mostrati).

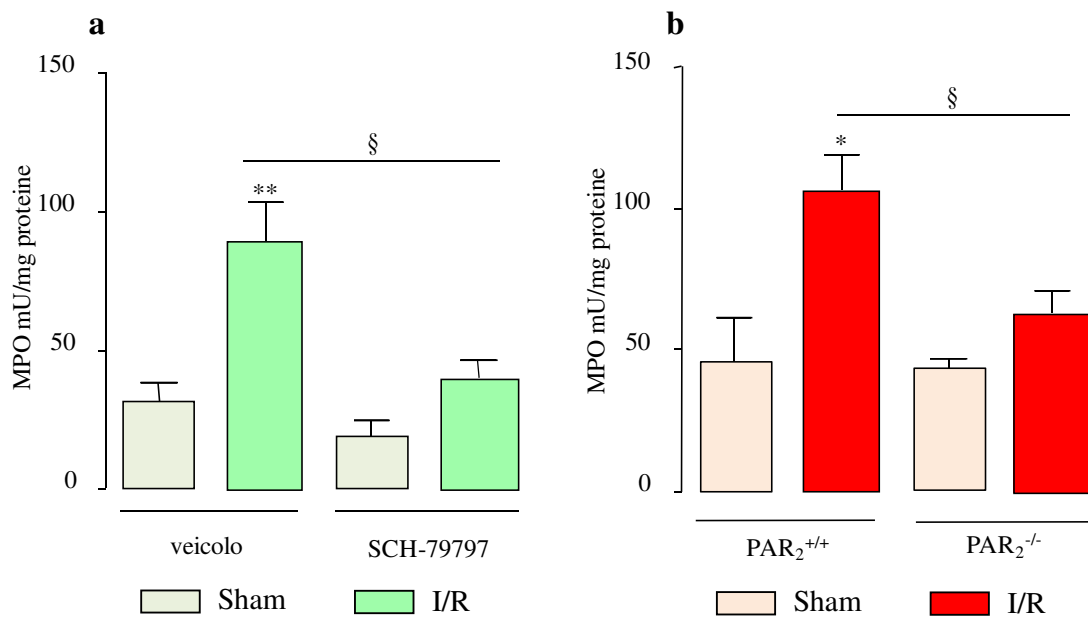
Applicando le stesse condizioni sperimentali, in topi I/R privi geneticamente del recettore PAR₂ (PAR₂^{-/-}) è stato misurato un aumento di attività proteolitica associata all'ischemia e riperfusione del tutto simile all'aumento di attività registrato nel gruppo I/R formato da topi wild type (PAR₂^{+/+}). Tra i gruppi Sham PAR₂^{-/-} e PAR₂^{+/+} non è stata rilevata nessuna differenza significativa (dati non mostrati) (Fig. 21a e 21b).

Figura 21 – Attività proteolitica plasmatica (a) e tissutale (b) nel gruppo I/R trattato con l'antagonista PAR₁, il composto SCH-79797, e nel gruppo I/R PAR₂^{-/-} rispetto al corrispondente trattamento con veicolo o ceppo wild type (PAR₂^{+/+}).



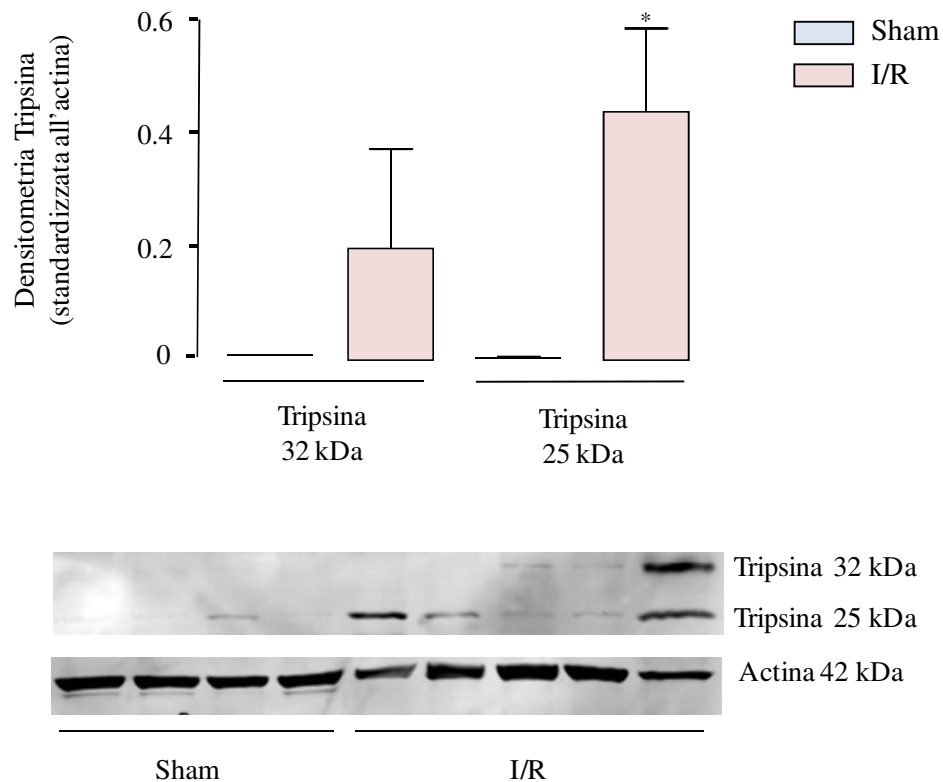
Dall'esame della figura 22a e 22b emerge che sia la somministrazione dell'antagonista SCH-79797 sia l'assenza genetica del recettore PAR₂ ha garantito una diminuzione significativa dei valori di MPO registrati negli animali I/R rispetto ai corrispondenti topolini trattati con il veicolo (89.5 ± 13.8 I/R veicolo vs 40.58 ± 6.4 I/R SCH-79797 P≤0.05) o wild type (106.8 ± 12.7 I/R PAR₂^{+/+} vs 65.0 ± 8.0 I/R PAR₂^{-/-}, P≤0.05). Nel complesso i risultati ottenuti dimostrano che l'antagonismo del recettore PAR₁ e la mancanza del recettore PAR₂ non influisce sul rilascio di proteasi indotto dall'ischemia e riperfusione intestinale. Tuttavia, l'assenza funzionale del singolo recettore PAR₁ o PAR₂ è in grado di inibire la chemiotassi post-ischemica dei granulociti neutrofili a livello intestinale.

Figura 22 – Attività mieloperoxidasica in tessuti intestinali prelevati da topolini I/R e Sham trattati con il composto SCH-79797 o con il solo veicolo (a) e in tessuti intestinali prelevati da topolini I/R o Sham PAR₂^{-/-} o PAR₂^{+/+} (b).



L'ischemia e riperfusione intestinale si associa alla presenza di tripsina nel tessuto ileale.

Figura 23 – Analisi Western blot della tripsina nel tessuto intestinale.



L'espressione proteica di alcune proteasi seriniche come plasmina, chimotripsina, trombina e tripsina è stata determinata in campioni di tessuto ileale raccolti da topolini I/R (90' ischemia + 2 ore riperfusione) e Sham attraverso la tecnica del Western blot.

Nel gruppo I/R e Sham la presenza tissutale di plasmina e chimotripsina non è stata osservata. La trombina è stata rilevata, ma senza alcuna differenza significativa tra i due gruppi (dati non mostrati). L'analisi della figura 23 mostra che la condizione di ischemia e riperfusione intestinale determina un significativo aumento dell'espressione di tripsina, nella sua isoforma a 25 kDa, nel gruppo I/R rispetto al gruppo Sham. In qualche campione I/R è stata evidenziata anche la presenza di un'isoforma di tripsina a 32 kDa, benché in maniera non significativa rispetto al controllo Sham. La presenza di tripsina nel tessuto intestinale degli animali sottoposti a ischemia e riperfusione giustifica l'aumento di attività proteolitica che è stata riscontrata nei campioni tissutali raccolti da topolini I/R.

3.5. Discussione

Attraverso le evidenze sperimentali raccolte in questo studio è stato dimostrato per la prima volta l'aumento significativo dell'attività di proteasi seriniche associato al danno da ischemia e riperfusione intestinale, tanto nel plasma quanto nel tessuto ileale. L'ipoperfusione intestinale, indotta sperimentalmente in topolini attraverso l'occlusione dell'arteria mesenterica superiore (SMA), e la successiva riperfusione hanno determinato una risposta infiammatoria locale, evidenziabile attraverso la chemiotassi di granulociti neutrofili nella regione interessata, ma anche sistemica che ha seriamente compromesso il grado di sopravvivenza degli animali sottoposti a chirurgia. I risultati raccolti sottolineano che già al termine del periodo ischemico (90 minuti), rispetto al controllo Sham, i livelli misurati di attività proteolitica "arginina diretta" aumentano significativamente, sia nel plasma che nel tessuto intestinale. La riperfusione (2 o 5 ore) mantiene elevata questa attività nel tessuto ileale e l'incrementa ulteriormente nel plasma. L'incubazione *in vitro* dei campioni raccolti da animali I/R (90' ischemia + 2 ore riperfusione) con due diversi inibitori selettivi per le proteasi seriniche, il composto AESBF (10mM) e il composto FUT-175 (50µM), ha chiaramente individuato in questa classe di proteasi la fonte dell'attività misurata nel plasma e nell'omogenato di tessuto ileale associata al danno da ischemia e riperfusione. Solo nel plasma, debolmente, l'attività proteolitica rilevata era da riferirsi ad aspartato o cisteine proteasi.

È risaputo che tra tutti gli apparati dell'organismo, il tratto gastrointestinale è esposto alla più cospicua concentrazione di proteasi sia in circostanze fisiologiche (proteasi digestive e batteriche) sia nella patogenesi di malattie gastrointestinali nelle quali ulteriori proteasi sono generate o rilasciate.⁸⁹ Le proteasi sono enzimi che catalizzano la rottura del legame peptidico degli amminoacidi che formano le proteine. Tuttavia, da anni, la comunità scientifica le considera come veri e propri trasmettitori implicati in numerosi processi infiammatori intestinali. È stato dimostrato che l'attivazione delle proteasi seriniche in un modello di colite nel topo contribuisce alla patogenesi della malattia attraverso la perdita della funzione della barriera epiteliale.^{129,130} Recentemente Cenac e collaboratori hanno dimostrato che biopsie tessutali prelevate da pazienti affetti da patologie croniche intestinali come IBS e IBD rilasciano una notevole attività proteolitica "trypsin like".¹³¹ L'esatto ruolo di queste proteasi nell'ambito di fenomeni acuti associati al danno da ischemia e riperfusione intestinale non è ancora del tutto conosciuto. I risultati ottenuti in questo progetto sono in accordo con alcuni precedenti studi che dimostrano

come una condizione di ischemia e riperfusione intestinale si associ a una diminuzione dei livelli sierici di inibitori di proteasi ¹³², alla degranolazione dei mastociti mucosali (cellule ricche di granuli contenenti triptasi), ^{76,77} all'attivazione della cascata della coagulazione (trombina, plasmina, FVIIa e FXa) ^{133,134} e al reclutamento di granulociti neutrofili nel sito infiammatorio con il possibile rilascio di elastasi e catepsina G. ^{135,136} Non da ultimo l'alterazione patologica della funzione protettiva della barriera mucosale permetterebbe agli enzimi digestivi, come la tripsina, di invadere la parete intestinale. ^{137,138} Al fine di indagare il ruolo svolto da questa attività proteolitica nella patogenesi del danno da ischemia e riperfusione intestinale, un gruppo di topolini è stato trattato *in vivo* con un inibitore a largo spettro delle proteasi seriniche, il composto FUT-175 (10 mg/kg), al momento dell'occlusione arteriosa (90 minuti) e la somministrazione è stata ripetuta all'inizio della riperfusione (2 ore). Il FUT-175 (emivita nel plasma circa 20 minuti) è un inibitore enzimatico sintetico di proteasi ad attività tripsino-simile come il fattore VIIa e Xa, la callicreina, la trombina, la plasmina, la tripsina, la triptasi e la chimotripsina già terapeuticamente utilizzato nel trattamento di pancreatiti e coagulazione intravasale disseminata (CID). ¹³⁹⁻¹⁴²

Il risultato ottenuto dal presente studio dimostra che il FUT-175 ha ridotto totalmente l'attività proteolitica nei campioni di tessuto intestinale e allo stesso tempo l'inibizione delle proteasi seriniche ha protetto l'intestino dal reclutamento granulocitario locale post-ischemico. Infatti, rispetto alla somministrazione del solo veicolo, i dati evidenziano chiaramente una significativa diminuzione dei livelli di MPO e la riduzione dell'espressione proteica di chemochine come KC and MIP-2, note per essere coinvolte nella chemiotassi tissutale dei leucociti.

Una singola somministrazione di FUT-175 eseguita al momento dell'ischemia o al momento della riperfusione non ha protetto l'intestino dal reclutamento granulocitario post-ischemico (dati non mostrati), protezione che invece è stata garantita dalla duplice somministrazione in corso di ischemia e riperfusione. Quindi, presi nell'insieme, questi dati suggeriscono che un determinante ruolo proinfiammatorio è giocato dalle proteasi durante la riperfusione, ma che già durante il periodo ischemico esse svolgono un ruolo non trascurabile nella patogenesi del danno tissutale.

La risposta infiammatoria successiva ad uno stato di ipoperfusione intestinale non è necessariamente ristretta al sito iniziale del danno, ma spesso si propaga a organi remoti; da molti anni all'intestino ischemico è stata riconosciuta la possibilità di generare attivatori umorali come endotossine, prodotti di provenienza lipidica e citochine ¹⁴³ che posseggono

un ruolo chiave nella patogenesi di importanti conseguenze sistemiche: dallo shock alla MOF (*multiple organ failure*).¹⁴⁴

Inoltre, è stato dimostrato che durante uno stato di shock indotto da una condizione di ischemia e riperfusione splancnica alcuni mediatori tossici con effetti depressori il miocardio (MDF, *myocardial depressant factors*) possono essere riversati nel plasma.^{145,146,147} Gli enzimi pancreatici, oltrepassando l'alterata barriera mucosale e riversandosi negli spazi extracellulari della sottomucosa, determinano la produzione di molteplici mediatori infiammatori.¹⁴⁸ Infatti, numerosi studi dimostrano che l'inibizione o l'allontanamento intraluminale degli enzimi pancreatici nel tratto gastrointestinale, attraverso la diminuita produzione di mediatori dell'infiammazione, è in grado di attenuare le conseguenze cliniche di uno stato di shock legato all'ipoperfusione tissutale: dal mantenimento di una fisiologica pressione arteriosa al miglioramento del grado di sopravvivenza.^{149,150}

Applicato alle nostre condizioni sperimentali, il trattamento con FUT-175 ha garantito agli animali I/R un grado di sopravvivenza significativamente maggiore (5% di mortalità) rispetto agli animali trattati con solo veicolo (29% di mortalità). Anche se ulteriori indagini saranno necessarie per avvalorare la nostra tesi, questi dati si allineano con le evidenze scientifiche formulate precedentemente: l'inibizione dell'attività proteolitica a livello tissutale, impedisce la produzione di mediatori umorali e infiammatori che possono determinare gravi conseguenze sistemiche.

Alla luce delle recenti evidenze scientifiche che riconoscono alle proteasi il ruolo di mediatori in grado di attivare specifici recettori (PARs), abbiamo ipotizzato che l'effetto proinfiammatorio associato alle proteasi seriniche presenti durante l'ischemia e riperfusione intestinale non fosse diretto ma mediato dalla capacità delle proteasi di attivare i PARs, nello specifico il recettore PAR₁ e PAR₂. Infatti, la presenza del recettore PAR₁ e PAR₂ è stata dimostrata nelle cellule della lamina propria, sottomucosa, cellule endoteliali, epiteliali e nervose del tratto gastrointestinale.¹⁵¹

Nel nostro modello sperimentale, la somministrazione di un antagonista selettivo del recettore PAR₁, il composto SCH-79797 (5 mg/kg), ha prodotto un chiaro risultato. Senza modificare i livelli di attività proteolitica associata al danno da ipoperfusione tissutale, il trattamento ha protetto l'intestino dal reclutamento granulocitario post-ischemico come dimostrato da una significativa diminuzione dei livelli intestinali di MPO rispetto al gruppo I/R trattato col solo veicolo.

Questi dati si allineano con i risultati ottenuti da altri autori in diversi studi. Recenti osservazioni suggeriscono un ruolo proinfiammatorio del recettore PAR₁ negli stati infiammatori intestinali. Infatti, la somministrazione intra-colica di agonista PAR₁ determina infiammazione intestinale e distruzione dell'integrità della barriera mucosale.¹¹¹

In un simile modello di ischemia e riperfusione intestinale nel ratto Tsuboi e collaboratori hanno dimostrato aumentati livelli di "TAT complexes", un indice di attivazione trombinica, e di mRNA del recettore PAR₁ dopo occlusione splancnica. La trombina è conosciuta dagli inizi degli anni 90 come proteasi serinica altamente specifica del recettore PAR₁. Il trattamento con AT, un inibitore sintetico per la trombina, ha marcatamente protetto dal danno intestinale a seguito dell'ischemia e riperfusione.¹⁵²

In modelli di ischemia e riperfusione riguardanti altri distretti Strandle e collaboratori hanno dimostrato che il trattamento con SCH-79797 immediatamente prima o durante l'ischemia riduce la necrosi miocardica dovuta all'ischemia e riperfusione nel cuore di ratto suggerendo un potenziale effetto terapeutico dell'antagonismo PAR₁ nel danno da ischemia e riperfusione miocardica.¹⁵³ Sevastos e collaboratori hanno recentemente provato che topolini PAR₁^{-/-} sono protetti dalle conseguenze dell'ischemia e riperfusione renale con un ridotto tasso di mortalità e di danno tubulare, diminuita chemiotassi granulocitaria e minori livelli di chemochine liberate.¹⁵⁴

Le stesse condizioni sperimentali di ischemia e riperfusione applicate al gruppo di topi privi geneticamente del recettore PAR₂ (PAR₂^{-/-}), pur senza modificare l'attività delle proteasi seriniche associate alla condizione chirurgica, hanno determinato una diminuzione significativa del reclutamento granulocitario rispetto al gruppo di animali WT (PAR₂^{+/+}). Questi dati si allineano con chi associa all'attivazione del recettore PAR₂ un ruolo proinfiammatorio. Tuttavia, le opinioni della comunità scientifica non sono univoche: infatti, l'attivazione del recettore PAR₂, a seconda del tipo di infiammazione, può giocare un ruolo pro o antiinfiammatorio.^{117,155}

È stato stabilito che l'attivazione intestinale del recettore PAR₂,¹⁵⁶ ma non PAR₁¹⁵⁷ causa colite attraverso un meccanismo neurogenico che coinvolge l'attivazione di neurorecettori peptidici come la sostanza P o il CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide). Al contrario, un altro studio suggerisce che in una condizione infiammatoria già instaurata (colite da TNBS) l'ulteriore attivazione del recettore PAR₂ dei neuroni enterici risulta prevenire il danno infiammatorio attraverso la diminuzione del contenuto mucosale di citochine di tipo T-helper 1 o il rilascio di prostaglandine epiteliali attraverso il rilascio di CGRP dai neuroni enterici afferenti.¹¹⁷ In un altro studio l'attivazione PAR₂ in caso di

pancreatiti acute permette una protezione locale, ma allo stesso tempo, consente l'aggravarsi delle condizioni sistemiche.¹⁵⁸ Nella nostra condizione sperimentale l'assenza del recettore PAR₂ ha garantito una protezione intestinale: infatti, il reclutamento granulocitario post-ischemico è significativamente ridotto negli animali PAR₂^{-/-} rispetto ai topi PAR₂^{+/+} sottoposti a 90 minuti di ischemia seguiti da 2 ore di riperfusione. Cattaruzza e collaboratori nel 2006 hanno pubblicato uno studio riguardante gli effetti protettivi dell'attivazione del recettore PAR₂ sull'alterazione della motilità e sul danno tissutale indotto dall'ischemia e riperfusione mesenterica nei roditori. In quello studio il peptide SLIGRL-NH₂, capace di attivare specificatamente PAR₂, ha ridotto il danno mucosale anche se non ha modificato il reclutamento granulocitario post-ischemico nel ratto sottoposto a 1 ora di ischemia e seguita da 6 ore di riperfusione anche se in animali Sham l'attivazione locale del recettore PAR₂ ha determinato un significativo aumento dell'infiltrazione granulocitaria tissutale.¹¹⁸ Questi dati non sono in contraddizione: nel corso di una condizione infiammatoria già avviata dallo stimolo ischemico l'ulteriore stimolazione PAR₂ potrebbe, come riportato da Fiorucci in un modello di colite,¹¹⁷ esercitare un effetto protettivo.

In ogni modo, l'attivazione PAR₂ gioca un ruolo importante nel reclutamento granulocitario: Hyun ha recentemente dimostrato che l'attività mieloperossidasi era significativamente più bassa in animali PAR₂ knock-out in tre differenti modelli di colite. L'analisi al Western Blot ha dimostrato che PAR₂ partecipa alla chemiotassi neutrofilica up-regolando l'espressione di molecole di adesione ICAM-1 e V-CAM-1 durante uno stato infiammatorio.¹⁵⁵

Alla luce di tutti questi dati, lo sviluppo di PAR₂ antagonisti è auspicabile per chiarire definitivamente effetti, a volte opposti, della stimolazione PAR₂.

È rilevante sottolineare che i dati raccolti in questo studio riconoscono all'assenza funzionale del recettore PAR₁ e PAR₂ un ruolo protettivo nei confronti del reclutamento granulocitario senza alterare i livelli di attività proteolitica associati al danno da ischemia e riperfusione intestinale. Ciò permette di ipotizzare che l'attività proinfiammatoria svolta dalle proteasi seriniche intestinali non è diretta ma mediata dall'attivazione di specifici recettori quali PAR₁ e PAR₂.

PAR₁ e PAR₂ non sono necessariamente attivati dalle stesse proteasi seriniche. Per esempio, PAR₁ ma non PAR₂ è attivato dalla trombina, mentre PAR₂ e non PAR₁ è attivato dalla tripsina. Al contrario, la tripsina che abbiamo dimostrato essere presente nei campioni tissutali raccolti da animali I/R (90 minuti ischemia + 2 ore riperfusione) li può attivare

entrambi. La presenza di tripsina a livello intraparietale deriva presumibilmente da un'alterata permeabilità mucosale che favorisce l'ingresso e l'assorbimento di sostanze (tra cui gli enzimi pancreatici) presenti nel lume intestinale. Tuttavia non è da escludere la sintesi di tripsina da parte di cellule epiteliali o endoteliali sottoposte ad uno stimolo patologico come già riportato in diversi studi.¹²⁴⁻¹²⁶ Ulteriori indagini saranno necessarie per chiarire questo aspetto e dimostrare la presenza di eventuali altre proteasi associate al danno da ipoperfusione.

In conclusione, nel presente lavoro è stata dimostrata un'aumentata attività proteolitica di proteasi seriniche biologicamente attive nel plasma e nel tessuto associata al danno da ischemia e riperfusione intestinale. L'inibizione di questa attività protegge l'intestino dall'infiltrazione granulocitaria post-ischemica ed aumenta il grado di sopravvivenza degli animali. Inoltre, abbiamo dimostrato che l'effetto proinfiammatorio delle proteasi seriniche associate al danno tissutale dipende dall'attivazione del recettore PAR₁ e PAR₂. Lo sviluppo di terapie complementari in grado di inibire l'attività delle proteasi seriniche può rappresentare un ulteriore approccio terapeutico nella prevenzione dal danno locale e sistemico determinato da una condizione di ischemia e riperfusione intestinale.

BIBLIOGRAFIA

1. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, and Seifalian AM: Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci* 2004, 49: 1359-1377
2. Reilly PM, Wilkins KB, Fuh KC, Haglund U, and Bulkley GB: The mesenteric hemodynamic response to circulatory shock: an overview. *Shock* 2001, 15: 329-343
3. Yasuhara H: Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. *Surg Today* 2005, 35: 185-195
4. Oldenburg WA, Lau LL, Rodenberg TJ, Edmonds HJ, and Burger CD: Acute mesenteric ischemia: a clinical review. *Arch Intern Med* 2004, 164: 1054-1062
5. Guan Y, Worrell RT, Pritts TA, and Montrose MH: Intestinal ischemia-reperfusion injury: reversible and irreversible damage imaged in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009, 297: G187-G196
6. Cerqueira NF, Hussni CA, and Yoshida WB: Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras* 2005, 20: 336-343
7. Kubes P: Ischemia-reperfusion in feline small intestine: a role for nitric oxide. *Am J Physiol* 1993, 264: G143-G149
8. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, and van Goor H: Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003, 199: 8-17
9. Moncada S, Palmer RM, and Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991, 43: 109-142
10. Suzuki Y, Deitch EA, Mishima S, Lu Q, and Xu D: Inducible nitric oxide synthase gene knockout mice have increased resistance to gut injury and bacterial translocation after an intestinal ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med* 2000, 28: 3692-3696
11. Naito Y, Takagi T, Ichikawa H, Tomatsuri N, Kuroda M, Isozaki Y, Katada K, Uchiyama K, Kokura S, Yoshida N, Okanoue T, and Yoshikawa T: A novel potent inhibitor of inducible nitric oxide inhibitor, ONO-1714, reduces intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Nitric Oxide* 2004, 10: 170-177
12. Pham CT: Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2006, 6: 541-550
13. Linfert D, Chowdhry T, and Rabb H: Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplant Rev (Orlando)* 2009, 23: 1-10

14. Spehlmann ME and Eckmann L: Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol* 2009, 25: 92-99
15. Zou L, Attuwaybi B, and Kone BC: Effects of NF-kappa B inhibition on mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003, 284: G713-G721
16. Chen LW, Egan L, Li ZW, Greten FR, Kagnoff MF, and Karin M: The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nat Med* 2003, 9: 575-581
17. Diepenhorst GM, van Gulik TM, and Hack CE: Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies. *Ann Surg* 2009, 249: 889-899
18. Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, and Taylor SM: The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. *Shock* 2004, 21: 401-409
19. Wada K, Montalto MC, and Stahl GL: Inhibition of complement C5 reduces local and remote organ injury after intestinal ischemia/reperfusion in the rat. *Gastroenterology* 2001, 120: 126-133
20. Massberg S and Messmer K: The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 1998, 30: 4217-4223
21. Edgerton C, Crispin JC, Moratz CM, Bettelli E, Oukka M, Simovic M, Zacharia A, Egan R, Chen J, Dalle Lucca JJ, Juang YT, and Tsokos GC: IL-17 producing CD4+ T cells mediate accelerated ischemia/reperfusion-induced injury in autoimmunity-prone mice. *Clin Immunol* 2009, 130: 313-321
22. Chen J, Crispin JC, Tedder TF, Dalle LJ, and Tsokos GC: B cells contribute to ischemia/reperfusion-mediated tissue injury. *J Autoimmun* 2009, 32: 195-200
23. Bertoni S, Ghizzardi P, Cattaruzza F, Ballabeni V, Impicciatore M, Tognolini M, Lagrasta CA, and Barocelli E: Evidence for the involvement of 5-HT2A receptors in mild mesenteric ischemia/reperfusion dysfunctions in mice. *Pharmacol Res* 2007, 56: 550-555
24. Zingarelli B, Yang Z, Hake PW, Denenberg A, and Wong HR: Absence of endogenous interleukin 10 enhances early stress response during post-ischaemic injury in mice intestine. *Gut* 2001, 48: 610-622
25. Lane JS, Todd KE, Lewis MP, Gloor B, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW, and Chandler CF: Interleukin-10 reduces the systemic inflammatory response in a murine model of intestinal ischemia/reperfusion. *Surgery* 1997, 122: 288-294
26. Stallion A, Kou TD, Miller KA, Dahms BB, Dudgeon DL, and Levine AD: IL-10 is not protective in intestinal ischemia reperfusion injury. *J Surg Res* 2002, 105: 145-152

27. Nussler NC, Muller AR, Weidenbach H, Vergopoulos A, Platz KP, Volk HD, Neuhaus P, and Nussler AK: IL-10 increases tissue injury after selective intestinal ischemia/reperfusion. *Ann Surg* 2003, 238: 49-58
28. Murry CE, Jennings RB, and Reimer KA: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986, 74: 1124-1136
29. Hotter G, Closa D, Prados M, Fernandez-Cruz L, Prats N, Gelpi E, and Rosello-Catafau J: Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 222: 27-32
30. Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Reid RC, Fairlie DP, and Taylor SM: Protective effect of a new C5a receptor antagonist against ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. *J Surg Res* 2002, 103: 260-267
31. Williams JP, Pechet TT, Weiser MR, Reid R, Kobzik L, Moore FD, Jr., Carroll MC, and Hechtman HB: Intestinal reperfusion injury is mediated by IgM and complement. *J Appl Physiol* 1999, 86: 938-942
32. Souza DG, Cassali GD, Poole S, and Teixeira MM: Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 2001, 134: 985-994
33. Souza DG, Pinho V, Cassali GD, Poole S, and Teixeira MM: Effect of a BLT receptor antagonist in a model of severe ischemia and reperfusion injury in the rat. *Eur J Pharmacol* 2002, 440: 61-69
34. Carmody IC, Meng L, Shen XD, Anselmo D, Gao F, Ke B, Ma JP, Kupiec-Weglinski JW, McDiarmid SV, Busuttill RW, Shaw G, and Farmer DG: P-selectin knockout mice have improved outcomes with both warm ischemia and small bowel transplantation. *Transplant Proc* 2004, 36: 263-264
35. Hassoun HT, Kozar RA, Kone BC, Safi HJ, and Moore FA: Intraischemic hypothermia differentially modulates oxidative stress proteins during mesenteric ischemia/reperfusion. *Surgery* 2002, 132: 369-376
36. O'Donnell KA, Caty MG, Zheng S, Rossman JE, and Azizkhan RG: Oxygenated intraluminal perfluorocarbon protects intestinal mucosa from ischemia/reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 1997, 32: 361-365
37. Ohara M, Unno N, Mitsuoka H, Kaneko H, and Nakamura S: Peritoneal lavage with oxygenated perfluorochemical preserves intestinal mucosal barrier function after ischemia-reperfusion and ameliorates lung injury. *Crit Care Med* 2001, 29: 782-788
38. Fung-Leung WP, Thurmond RL, Ling P, and Karlsson L: Histamine H4 receptor antagonists: the new antihistamines? *Curr Opin Investig Drugs* 2004, 5: 1174-1183
39. Schneider E, Rolli-Derkinderen M, Arock M, and Dy M: Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends Immunol* 2002, 23: 255-263

40. Jutel M, Akdis M, and Akdis CA: Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy* 2009, 39: 1786-1800
41. Jutel M, Watanabe T, Akdis M, Blaser K, and Akdis CA: Immune regulation by histamine. *Curr Opin Immunol* 2002, 14: 735-740
42. Jutel M, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OA, Malolepszy J, Zak-Nejmark T, Koga R, Kobayashi T, Blaser K, and Akdis CA: Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 2001, 413: 420-425
43. Hirata N, Takeuchi K, Ukai K, Jin C, Yoshida T, and Sakakura Y: Expression and localization of histamine H2 receptor messenger RNA in human nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 1999, 103: 944-949
44. Takagishi T, Sasaguri Y, Nakano R, Arima N, Tanimoto A, Fukui H, and Morimatsu M: Expression of the histamine H1 receptor gene in relation to atherosclerosis. *Am J Pathol* 1995, 146: 981-988
45. Akdis CA and Simons FE: Histamine receptors are hot in immunopharmacology. *Eur J Pharmacol* 2006, 533: 69-76
46. Bakker RA, Schoonus SB, Smit MJ, Timmerman H, and Leurs R: Histamine H(1)-receptor activation of nuclear factor-kappa B: roles for G beta gamma- and G alpha(q/11)-subunits in constitutive and agonist-mediated signaling. *Mol Pharmacol* 2001, 60: 1133-1142
47. Del Valle J and Gantz I: Novel insights into histamine H2 receptor biology. *Am J Physiol* 1997, 273: G987-G996
48. Clark RA, Sandler JA, Gallin JI, and Kaplan AP: Histamine modulation of eosinophil migration. *J Immunol* 1977, 118: 137-145
49. Morisset S, Rouleau A, Ligneau X, Gbahou F, Tardivel-Lacombe J, Stark H, Schunack W, Ganellin CR, Schwartz JC, and Arrang JM: High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature* 2000, 408: 860-864
50. de Esch IJ, Thurmond RL, Jongejan A, and Leurs R: The histamine H4 receptor as a new therapeutic target for inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 2005, 26: 462-469
51. Hofstra CL, Desai PJ, Thurmond RL, and Fung-Leung WP: Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2003, 305: 1212-1221
52. Hei ZQ, Gan XL, Luo GJ, Li SR, and Cai J: Pretreatment of cromolyn sodium prior to reperfusion attenuates early reperfusion injury after the small intestine ischemia in rats. *World J Gastroenterol* 2007, 13: 5139-5146
53. Hiraga N, Adachi N, Liu K, Nagaro T, and Arai T: Suppression of inflammatory cell recruitment by histamine receptor stimulation in ischemic rat brains. *Eur J Pharmacol* 2007, 557: 236-244

54. Okajima K, Harada N, and Uchiba M: Ranitidine reduces ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats by inhibiting neutrophil activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2002, 301: 1157-1165
55. Adachi N, Liu K, Motoki A, Nishibori M, and Arai T: Suppression of ischemia/reperfusion liver injury by histamine H4 receptor stimulation in rats. *Eur J Pharmacol* 2006, 544: 181-187
56. Gurish MF and Boyce JA: Mast cell growth, differentiation, and death. *Clin Rev Allergy Immunol* 2002, 22: 107-118
57. Toth T, Toth-Jakatics R, Jimi S, Ihara M, Urata H, and Takebayashi S: Mast cells in rapidly progressive glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999, 10: 1498-1505
58. Flint KC, Leung KB, Hudspeth BN, Brostoff J, Pearce FL, Geraint-James D, and Johnson NM: Bronchoalveolar mast cells in sarcoidosis: increased numbers and accentuation of mediator release. *Thorax* 1986, 41: 94-99
59. Godfrey HP, Iardi C, Engber W, and Graziano FM: Quantitation of human synovial mast cells in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1984, 27: 852-856
60. Hunt LW, Colby TV, Weiler DA, Sur S, and Butterfield JH: Immunofluorescent staining for mast cells in idiopathic pulmonary fibrosis: quantification and evidence for extracellular release of mast cell tryptase. *Mayo Clin Proc* 1992, 67: 941-948
61. Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, and Corinaldesi R: Functional gastrointestinal disorders and mast cells: implications for therapy. *Neurogastroenterol Motil* 2006, 18: 6-17
62. Boros M, Takaichi S, Masuda J, Newlands GF, and Hatanaka K: Response of mucosal mast cells to intestinal ischemia-reperfusion injury in the rat. *Shock* 1995, 3: 125-131
63. Kalia N, Brown NJ, Wood RF, and Pockley AG: Ketotifen abrogates local and systemic consequences of rat intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2005, 20: 1032-1038
64. Santen S, Wang Y, Menger MD, Jeppsson B, and Thorlacius H: Mast-cell-dependent secretion of CXC chemokines regulates ischemia-reperfusion-induced leukocyte recruitment in the colon. *Int J Colorectal Dis* 2008, 23: 527-534
65. Sand E, Themner-Persson A, and Ekblad E: Infiltration of mast cells in rat colon is a consequence of ischemia/reperfusion. *Dig Dis Sci* 2008, 53: 3158-3169
66. Krawisz JE, Sharon P, and Stenson WF: Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984, 87: 1344-1350
67. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, and Rothstein G: Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982, 78: 206-209

68. Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979, 95: 351-358
69. Moore-Olufemi SD, Kozar RA, Moore FA, Sato N, Hassoun HT, Cox CS, Jr., and Kone BC: Ischemic preconditioning protects against gut dysfunction and mucosal injury after ischemia/reperfusion injury. *Shock* 2005, 23: 258-263
70. Raffa RB, Mathiasen JR, and Jacoby HI: Colonic bead expulsion time in normal and mu-opioid receptor deficient (CXBK) mice following central (ICV) administration of mu- and delta-opioid agonists. *Life Sci* 1987, 41: 2229-2234
71. Barocelli E, Ballabeni V, Ghizzardi P, Cattaruzza F, Bertoni S, Lagrasta CA, and Impicciatore M: The selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents intestinal ischemia-reperfusion injury in mice. *Nitric Oxide* 2006, 14: 212-218
72. Kanwar S and Kubes P: Mast cells contribute to ischemia-reperfusion-induced granulocyte infiltration and intestinal dysfunction. *Am J Physiol* 1994, 267: G316-G321
73. Theoharides TC and Kalogeromitros D: The critical role of mast cells in allergy and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1088: 78-99
74. Penissi AB, Rudolph MI, and Piezzi RS: Role of mast cells in gastrointestinal mucosal defense. *Biocell* 2003, 27: 163-172
75. Steiner DR, Gonzalez NC, and Wood JG: Mast cells mediate the microvascular inflammatory response to systemic hypoxia. *J Appl Physiol* 2003, 94: 325-334
76. Boros M, Ordogh B, Kaszaki J, and Nagy S: The role of mast cell degranulation in ischaemia-reperfusion-induced mucosal injury in the small intestine. *Ann Acad Med Singapore* 1999, 28: 79-84
77. Andoh A, Fujiyama Y, Araki Y, Kimura T, Tsujikawa T, and Bamba T: Role of complement activation and mast cell degranulation in the pathogenesis of rapid intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Digestion* 2001, 63 Suppl 1: 103-107
78. Kalia N, Brown NJ, Wood RF, and Pockley AG: Ketotifen abrogates local and systemic consequences of rat intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2005, 20: 1032-1038
79. Gaboury JP, Johnston B, Niu XF, and Kubes P: Mechanisms underlying acute mast cell-induced leukocyte rolling and adhesion in vivo. *J Immunol* 1995, 154: 804-813
80. Takeshita K, Sakai K, Bacon KB, and Gantner F: Critical role of histamine H4 receptor in leukotriene B4 production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2003, 307: 1072-1078
81. Motoki A, Adachi N, Liu K, Takahashi HK, Nishibori M, Yorozuya T, Arai T, and Nagaro T: Suppression of ischaemia-induced cytokine release by dimaprit and amelioration of liver injury in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008, 102: 394-398

82. Irisawa Y, Adachi N, Liu K, Arai T, and Nagaro T: Alleviation of ischemia-induced brain edema by activation of the central histaminergic system in rats. *J Pharmacol Sci* 2008, 108: 112-123
83. Tsunada S, Fujimoto K, Gotoh Y, Sakai T, Kang M, Sakata T, Granger DN, and Tso P: Role of histamine receptors in intestinal repair after ischemia-reperfusion in rats. *Gastroenterology* 1994, 107: 1297-1304
84. Okajima K, Harada N, and Uchiba M: Ranitidine reduces ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats by inhibiting neutrophil activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2002, 301: 1157-1165
85. Masini E, Cuzzocrea S, Bani D, Mazzon E, Muja C, Mastroianni R, Fabrizi F, Pietrangeli P, Marcocci L, Mondovi B, Mannaioni PF, and Federico R: Beneficial effects of a plant histaminase in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Shock* 2007, 27: 409-415
86. Nosal'ova V, Drabikova K, Jancinova V, Pecivova J, Macickova T, Petrikova M, Sotnikova R, and Nosal' R: Effect of H1 antihistamines in a model of mesenteric ischaemia/reperfusion. *Inflamm Res* 2008, 57 Suppl 1: S55-S56
87. Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, and Haas HL: International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev* 1997, 49: 253-278
88. Southan C: A genomic perspective on human proteases. *FEBS Lett* 2001, 498: 214-218
89. Ossovskaya VS and Bunnett NW: Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 2004, 84: 579-621
90. Vergnolle N: Protease-activated receptors as drug targets in inflammation and pain. *Pharmacol Ther* 2009, 123: 292-309
91. Renesto P, Si-Tahar M, Moniatte M, Balloy V, Van Dorsselaer A, Pidard D, and Chignard M: Specific inhibition of thrombin-induced cell activation by the neutrophil proteinases elastase, cathepsin G, and proteinase 3: evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the thrombin receptor. *Blood* 1997, 89: 1944-1953
92. Hoxie JA, Ahuja M, Belmonte E, Pizarro S, Parton R, and Brass LF: Internalization and recycling of activated thrombin receptors. *J Biol Chem* 1993, 268: 13756-13763
93. Dery O, Thoma MS, Wong H, Grady EF, and Bunnett NW: Trafficking of proteinase-activated receptor-2 and beta-arrestin-1 tagged with green fluorescent protein. beta-Arrestin-dependent endocytosis of a proteinase receptor. *J Biol Chem* 1999, 274: 18524-18535
94. Jacob C, Cottrell GS, Gehringer D, Schmidlin F, Grady EF, and Bunnett NW: c-Cbl mediates ubiquitination, degradation, and down-regulation of human protease-activated receptor 2. *J Biol Chem* 2005, 280: 16076-16087

95. Zania P, Gourni D, Aplin AC, Nicosia RF, Flordellis CS, Maragoudakis ME, and Tsopanoglou NE: Parstatin, the cleaved peptide on proteinase-activated receptor 1 activation, is a potent inhibitor of angiogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* 2009, 328: 378-389
96. Furman MI, Nurden P, Berndt MC, Nurden AT, Benoit SE, Barnard MR, Ofosu FA, and Michelson AD: The cleaved peptide of PAR1 results in a redistribution of the platelet surface GPIIb-IIIa complex to the surface-connected canalicular system. *Thromb Haemost* 2000, 84: 897-903
97. Vergnolle N: Modulation of visceral pain and inflammation by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol* 2004, 141: 1264-1274
98. Buresi MC, Schleihauf E, Vergnolle N, Buret A, Wallace JL, Hollenberg MD, and MacNaughton WK: Protease-activated receptor-1 stimulates Ca²⁺-dependent Cl⁻ secretion in human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001, 281: G323-G332
99. Cuffe JE, Bertog M, Velazquez-Rocha S, Dery O, Bunnett N, and Korbmayer C: Basolateral PAR-2 receptors mediate KCl secretion and inhibition of Na⁺ absorption in the mouse distal colon. *J Physiol* 2002, 539: 209-222
100. Mall M, Gonska T, Thomas J, Hirtz S, Schreiber R, and Kunzelmann K: Activation of ion secretion via proteinase-activated receptor-2 in human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002, 282: G200-G210
101. Cocks TM, Sozzi V, Moffatt JD, and Selemidis S: Protease-activated receptors mediate apamin-sensitive relaxation of mouse and guinea pig gastrointestinal smooth muscle. *Gastroenterology* 1999, 116: 586-592
102. Corvera CU, Dery O, McConalogue K, Bohm SK, Khitin LM, Caughey GH, Payan DG, and Bunnett NW: Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. *J Clin Invest* 1997, 100: 1383-1393
103. Mule F, Baffi MC, and Cerra MC: Dual effect mediated by protease-activated receptors on the mechanical activity of rat colon. *Br J Pharmacol* 2002, 136: 367-374
104. Mule F, Pizzuti R, Capparelli A, and Vergnolle N: Evidence for the presence of functional protease activated receptor 4 (PAR4) in the rat colon. *Gut* 2004, 53: 229-234
105. Kawabata A, Kuroda R, Nagata N, Kawao N, Masuko T, Nishikawa H, and Kawai K: In vivo evidence that protease-activated receptors 1 and 2 modulate gastrointestinal transit in the mouse. *Br J Pharmacol* 2001, 133: 1213-1218
106. Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Lehy T, and Laburthe M: Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. *Am J Pathol* 2003, 162: 1503-1513

107. Shi X, Gangadharan B, Brass LF, Ruf W, and Mueller BM: Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol Cancer Res* 2004, 2: 395-402
108. Cenac N, Coelho AM, Nguyen C, Compton S, Andrade-Gordon P, MacNaughton WK, Wallace JL, Hollenberg MD, Bunnett NW, Garcia-Villar R, Bueno L, and Vergnolle N: Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. *Am J Pathol* 2002, 161: 1903-1915
109. Chin AC, Vergnolle N, MacNaughton WK, Wallace JL, Hollenberg MD, and Buret AG: Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100: 11104-11109
110. Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, Chapman K, Cottrell G, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Barbara G, Beck P, Bunnett NW, Sharkey KA, Ferraz JG, Shaffer E, and Vergnolle N: Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J Clin Invest* 2007, 117: 636-647
111. Vergnolle N, Hollenberg MD, and Wallace JL: Pro- and anti-inflammatory actions of thrombin: a distinct role for proteinase-activated receptor-1 (PAR1). *Br J Pharmacol* 1999, 126: 1262-1268
112. Cenac N, Coelho AM, Nguyen C, Compton S, Andrade-Gordon P, MacNaughton WK, Wallace JL, Hollenberg MD, Bunnett NW, Garcia-Villar R, Bueno L, and Vergnolle N: Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. *Am J Pathol* 2002, 161: 1903-1915
113. Dabek M, Ferrier L, Roka R, Gecse K, Annahazi A, Moreau J, Escourrou J, Cartier C, Chaumaz G, Leveque M, Ait-Belgnaoui A, Wittmann T, Theodorou V, and Bueno L: Luminal cathepsin g and protease-activated receptor 4: a duet involved in alterations of the colonic epithelial barrier in ulcerative colitis. *Am J Pathol* 2009, 175: 207-214
114. Vergnolle, N. and Cellars, L. Hollemburg M. D. Wallace J. L. Andrade-Gordon P. Proteinase-activated receptors-1 (PAR1) is implicated in the pathogenesis of TNBS colitis. *Gastroenterology* A-83. 2004.
115. Cenac N, Cellars L, Steinhoff M, Andrade-Gordon P, Hollenberg MD, Wallace JL, Fiorucci S, and Vergnolle N: Proteinase-activated receptor-1 is an anti-inflammatory signal for colitis mediated by a type 2 immune response. *Inflamm Bowel Dis* 2005, 11: 792-798
116. Hyun E, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Beck PL, and Vergnolle N: Contribution of bone marrow-derived cells to the pro-inflammatory effects of protease-activated receptor-2 in colitis. *Inflamm Res* 2010, 59: 699-709
117. Fiorucci S, Mencarelli A, Palazzetti B, Distrutti E, Vergnolle N, Hollenberg MD, Wallace JL, Morelli A, and Cirino G: Proteinase-activated receptor 2 is an anti-inflammatory signal for colonic lamina propria lymphocytes in a mouse model of colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98: 13936-13941

118. Cattaruzza F, Cenac N, Barocelli E, Impicciatore M, Hyun E, Vergnolle N, and Sternini C: Protective effect of proteinase-activated receptor 2 activation on motility impairment and tissue damage induced by intestinal ischemia/reperfusion in rodents. *Am J Pathol* 2006, 169: 177-188
119. Kong W, McConalogue K, Khitin LM, Hollenberg MD, Payan DG, Bohm SK, and Bunnett NW: Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94: 8884-8889
120. Bustos D, Negri G, De Paula JA, Di Carlo M, Yapur V, Facente A, and De Paula A: Colonic proteinases: increased activity in patients with ulcerative colitis. *Medicina (B Aires)* 1998, 58: 262-264
121. Raithel M, Winterkamp S, Pacurar A, Ulrich P, Hochberger J, and Hahn EG: Release of mast cell tryptase from human colorectal mucosa in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001, 36: 174-179
122. Santos J, Bayarri C, Saperas E, Nogueiras C, Antolin M, Mourelle M, Cadahia A, and Malagelada JR: Characterisation of immune mediator release during the immediate response to segmental mucosal challenge in the jejunum of patients with food allergy. *Gut* 1999, 45: 553-558
123. Scudamore CL, Thornton EM, McMillan L, Newlands GF, and Miller HR: Release of the mucosal mast cell granule chymase, rat mast cell protease-II, during anaphylaxis is associated with the rapid development of paracellular permeability to macromolecules in rat jejunum. *J Exp Med* 1995, 182: 1871-1881
124. Cottrell GS, Amadesi S, Grady EF, and Bunnett NW: Trypsin IV, a novel agonist of protease-activated receptors 2 and 4. *J Biol Chem* 2004, 279: 13532-13539
125. Koshikawa N, Nagashima Y, Miyagi Y, Mizushima H, Yanoma S, Yasumitsu H, and Miyazaki K: Expression of trypsin in vascular endothelial cells. *FEBS Lett* 1997, 409: 442-448
126. Koshikawa N, Hasegawa S, Nagashima Y, Mitsuhashi K, Tsubota Y, Miyata S, Miyagi Y, Yasumitsu H, and Miyazaki K: Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse. *Am J Pathol* 1998, 153: 937-944
127. Yang PC, Berin MC, Yu L, and Perdue MH: Mucosal pathophysiology and inflammatory changes in the late phase of the intestinal allergic reaction in the rat. *Am J Pathol* 2001, 158: 681-690
128. McHugh KJ, Svensjo E, and Persson CG: Exudative and absorptive permeability in different phases of an experimental colitis condition. *Scand J Gastroenterol* 1996, 31: 900-905
129. Hawkins JV, Emmel EL, Feuer JJ, Nedelman MA, Harvey CJ, Klein HJ, Rozmiarek H, Kennedy AR, Lichtenstein GR, and Billings PC: Protease activity in a hapten-induced model of ulcerative colitis in rats. *Dig Dis Sci* 1997, 42: 1969-1980

130. Tarlton JF, Whiting CV, Tunmore D, Bregenholt S, Reimann J, Claesson MH, and Bland PW: The role of up-regulated serine proteases and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of a murine model of colitis. *Am J Pathol* 2000, 157: 1927-1935
131. Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, Chapman K, Cottrell G, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Barbara G, Beck P, Bunnett NW, Sharkey KA, Ferraz JG, Shaffer E, and Vergnolle N: Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J Clin Invest* 2007, 117: 636-647
132. Olanders K, Sun Z, Borjesson A, Dib M, Andersson E, Lason A, Ohlsson T, and Andersson R: The effect of intestinal ischemia and reperfusion injury on ICAM-1 expression, endothelial barrier function, neutrophil tissue influx, and protease inhibitor levels in rats. *Shock* 2002, 18: 86-92
133. Olanders K, Borjesson A, Zhao X, and Andersson R: Effects of anticoagulant treatment on intestinal ischaemia and reperfusion injury in rats. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005, 49: 517-524
134. Loubele ST, ten Cate H, and Spronk HM: Anticoagulant therapy in critical organ ischaemia/reperfusion injury. *Thromb Haemost* 2010, 104: 136-142
135. Kotake Y, Yamamoto M, Matsumoto M, Morisaki H, and Takeda J: Sivelestat, a neutrophil elastase inhibitor, attenuates neutrophil priming after hepatoenteric ischemia in rabbits. *Shock* 2005, 23: 156-160
136. Takayama M, Ishibashi M, Ishii H, Kuraki T, Nishida T, and Yoshida M: Effects of neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) on lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol* 2001, 91: 1800-1807
137. Mitsuoka H, Kistler EB, and Schmid-Schonbein GW: Generation of in vivo activating factors in the ischemic intestine by pancreatic enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97: 1772-1777
138. Rosario HS, Waldo SW, Becker SA, and Schmid-Schonbein GW: Pancreatic trypsin increases matrix metalloproteinase-9 accumulation and activation during acute intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Pathol* 2004, 164: 1707-1716
139. Fujii S and Hitomi Y: New synthetic inhibitors of C1r, C1 esterase, thrombin, plasmin, kallikrein and trypsin. *Biochim Biophys Acta* 1981, 661: 342-345
140. Aoyama T, Ino Y, Ozeki M, Oda M, Sato T, Koshiyama Y, Suzuki S, and Fujita M: Pharmacological studies of FUT-175, nafamstat mesilate. I. Inhibition of protease activity in in vitro and in vivo experiments. *Jpn J Pharmacol* 1984, 35: 203-227
141. Iwaki M, Ozeki M, Sato T, Suzuki K, Motoyoshi A, Suzuki S, Fujita M, and Aoyama T: [Pharmacological studies of FUT-175, nafamstat mesilate. II. Effects on experimental acute pancreatitis]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1984, 84: 363-372
142. Yoshikawa T, Murakami M, Furukawa Y, Kato H, Takemura S, and Kondo M: Effects of FUT-175, a new synthetic protease inhibitor on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rats. *Haemostasis* 1983, 13: 374-378

143. Mitsuoka H and Schmid-Schonbein GW: Mechanisms for blockade of in vivo activator production in the ischemic intestine and multi-organ failure. *Shock* 2000, 14: 522-527
144. Schoenberg MH and Beger HG: Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993, 21: 1376-1386
145. Lefer AM and Barenholz Y: Pancreatic hydrolases and the formation of a myocardial depressant factor in shock. *Am J Physiol* 1972, 223: 1103-1109
146. Mitsuoka H and Schmid-Schonbein GW: Mechanisms for blockade of in vivo activator production in the ischemic intestine and multi-organ failure. *Shock* 2000, 14: 522-527
147. Mitsuoka H, Kistler EB, and Schmid-Schonbein GW: Protease inhibition in the intestinal lumen: attenuation of systemic inflammation and early indicators of multiple organ failure in shock. *Shock* 2002, 17: 205-209
148. Schmid-Schonbein GW, Hugli TE, Kistler EB, Sofianos A, and Mitsuoka H: Pancreatic enzymes and microvascular cell activation in multiorgan failure. *Microcirculation* 2001, 8: 5-14
149. Acosta JA, Hoyt DB, Schmid-Schonbein GW, Hugli TE, Anjaria DJ, Frankel DA, and Coimbra R: Intraluminal pancreatic serine protease activity, mucosal permeability, and shock: a review. *Shock* 2006, 26: 3-9
150. Calcina F., Stenini C. Ghizzardi P. Cattaruzza F. Bertoni S. Ballabeni V. Impicciatore M. Barocelli E. Protective effects of a protease inhibitor (gabexate mesilate) on intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. 2010.
151. Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, Luger TA, and Hollenberg MD: Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev* 2005, 26: 1-43
152. Tsuboi H, Naito Y, Katada K, Takagi T, Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Yoshida N, Tsukada M, and Yoshikawa T: Role of the thrombin/protease-activated receptor 1 pathway in intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, 292: G678-G683
153. Strande JL, Hsu A, Su J, Fu X, Gross GJ, and Baker JE: SCH 79797, a selective PAR1 antagonist, limits myocardial ischemia/reperfusion injury in rat hearts. *Basic Res Cardiol* 2007, 102: 350-358
154. Sevastos J, Kennedy SE, Davis DR, Sam M, Peake PW, Charlesworth JA, Mackman N, and Erlich JH: Tissue factor deficiency and PAR-1 deficiency are protective against renal ischemia reperfusion injury. *Blood* 2007, 109: 577-583
155. Hyun E, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, and Vergnolle N: Protease-activated receptor-2 activation: a major actor in intestinal inflammation. *Gut* 2008, 57: 1222-1229

156. Nguyen C, Coelho AM, Grady E, Compton SJ, Wallace JL, Hollenberg MD, Cenac N, Garcia-Villar R, Bueno L, Steinhoff M, Bunnett NW, and Vergnolle N: Colitis induced by proteinase-activated receptor-2 agonists is mediated by a neurogenic mechanism. *Can J Physiol Pharmacol* 2003, 81: 920-927
157. Vergnolle N, Cellars L, Mencarelli A, Rizzo G, Swaminathan S, Beck P, Steinhoff M, Andrade-Gordon P, Bunnett NW, Hollenberg MD, Wallace JL, Cirino G, and Fiorucci S: A role for proteinase-activated receptor-1 in inflammatory bowel diseases. *J Clin Invest* 2004, 114: 1444-1456
158. Laukkarinen JM, Weiss ER, van Acker GJ, Steer ML, and Perides G: Protease-activated receptor-2 exerts contrasting model-specific effects on acute experimental pancreatitis. *J Biol Chem* 2008, 283: 20703-20712

Ringraziamenti

Ringrazio di cuore la Prof.ssa Elisabetta Barocelli, il cui supporto non è mai venuto meno in questi tre anni, per avermi dato la possibilità di affrontare, presso la Facoltà di Farmacia, un'esperienza professionale e umana quale è il Dottorato di Ricerca.

Ringrazio tutti i colleghi del Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Biologiche e Chimiche Applicate che hanno contribuito alla mia formazione.

Ringrazio, inoltre, la Dott.ssa Nathalie Vergnolle per avermi ospitato durante la seconda parte de mio dottorato presso il suo laboratorio in Francia. La ringrazio per avermi concesso l'occasione di affrontare nuove sfide scientifiche e per avermi garantito i mezzi per affrontarle e superarle. Non dimentico tutti i colleghi della "mia" équipe tolosana, in primis Nicola Cenac, per avermi dato la possibilità di integrarmi in una realtà nuova e per aver condiviso insieme numerose esperienze professionali e umane.

Thomas