

IL SISTEMA NERVOSO ENTERICO (SNE)

Il sistema nervoso enterico (SNE) rappresenta una divisione anatomica del sistema nervoso autonomo ed è costituito da neuroni i cui corpi cellulari sono localizzati nei plessi intramurali della parete intestinale. Anche se strettamente connesso con i sistemi simpatico e parasimpatico, possiede capacità integrative sufficienti da consentire il proprio funzionamento in assenza di informazioni provenienti dal sistema nervoso centrale. Il SNE è organizzato in due principali plessi neuronali: il plesso mienterico (o di Auerbach), e il plesso sottomucosale (o di Meissner). Il plesso mienterico è localizzato tra lo strato muscolare longitudinale più esterno e quello circolare ed interessa il tratto gastrointestinale in tutta la sua lunghezza, mentre il plesso sottomucosale, che interessa solo il tratto intestinale, è localizzato tra lo strato muscolare circolare e la sottomucosa.

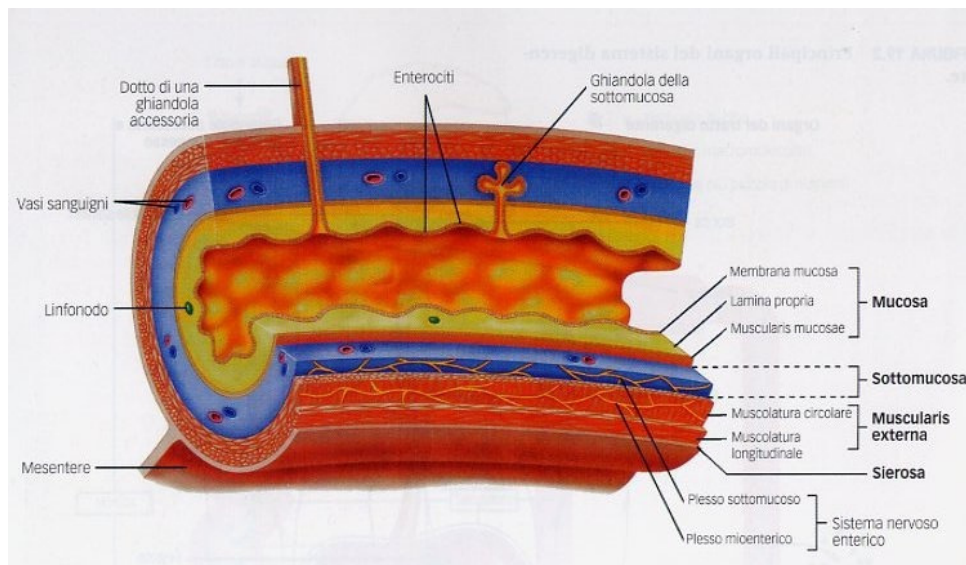


Figura 1. Struttura e organizzazione della parete intestinale (Germann-Stanfield, 2003).

I due plessi mienterico e sottomucosale sono organizzati a formare un complesso circuito neuronale comprendente neuroni sensoriali, interneuroni, motoneuroni, neuroni secretori e vasomotori.

I neuroni sensoriali si dividono in neuroni afferenti primari intrinseci (IPANs) ed estrinseci; gli IPANs hanno corpi cellulari all'interno della parete intestinale, il soma localizzato nel plesso mienterico (IPANs mienterici) o sottomucosale (IPANs sottomucosali) e assoni che raggiungono la muscolatura liscia. I neuroni di tipo estrinseco sono suddivisi invece in afferenze vagali e spinali ed i loro corpi cellulari sono esterni alla parete intestinale. Mentre gli IPANs sono essenziali per il controllo fisiologico dei processi digestivi, le afferenze estrinseche trasmettono al sistema nervoso centrale (SNC) informazioni che concorrono al controllo di eventi legati all'omeostasi tissutale (afferenza vagali) e segnali associati a stimoli patologici (afferenze spinali) di tipo motorio come contrazione o distensione eccessive o di tipo sensoriale come il dolore viscerale (*Holzer 2002*).

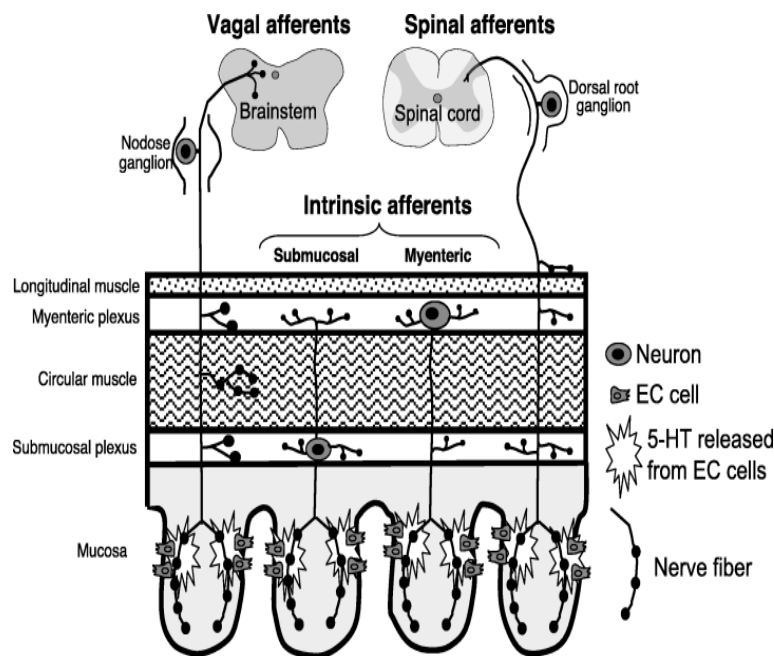


Figura 2. Schema dell'innervazione intrinseca ed estrinseca della mucosa intestinale (*Mawe et al., 2006*).

Gli interneuroni si dividono in ascendenti, principalmente di tipo colinergico, e discendenti, interessati da un complesso sistema di mediatori e neurotrasmettitori tra i quali principalmente: acetilcolina (Ach), ossido d'azoto (NO), peptide vasoattivo intestinale (VIP), serotonina (5-HT) e somatostatina. Tra questi, Ach, NO, VIP e somatostatina entrano in gioco nel controllo dei riflessi motori locali, mentre Ach e 5-HT sono implicati nei riflessi secretomotori. La trasmissione interneuronale è invece di tipo non colinergico, basata su potenziali postsinaptici eccitatori mediati da ATP e 5-HT.

I motoneuroni innervano i tratti muscolari longitudinale e circolare e lo strato mucosale; sono classificati in motoneuroni eccitatori, che mediano la contrazione tramite rilascio di Ach, sostanza P (SP) e neurochinina A (NKA), e motoneuroni inibitori che, attraverso rilascio di NO, VIP e ATP, inducono il rilasciamento muscolare (*Hansen 2003*).

Il controllo delle secrezioni e del flusso ematico è affidato a particolari tipologie di neuroni motori, rispettivamente i neuroni secretomotori e vasomotori. Gli IPANs, attivati a livello della mucosa da stimoli luminari, esercitano anche un diretto controllo della trasmissione secreto- e vasomotoria in seguito al rilascio di mediatori quali Ach e VIP. La maggior parte dei neuroni secretomotori sono caratterizzati da corpi cellulari localizzati nel plesso sottomucosale, alcuni invece presentano proiezioni che dalla mucosa raggiungono il plesso mienterico. I neuroni secretomotori si suddividono in neuroni colinergici, rilascianti Ach che agisce su specifici recettori muscarinici dello strato mucosale epiteliale; e neuroni non colinergici, che mediano risposte locali utilizzando il VIP come principale mediatore. I corpi cellulari dei neuroni vasomotori che mediano la vasodilatazione sono invece localizzati nello strato sottomucosale. Il delicato equilibrio tra processi secretori epiteliali e controllo dell'apporto ematico risente anche di un complesso sistema di riflessi di modulazione estrinseca, principalmente di natura simpatica (*Furness 2000*).

Oltre all'attivazione neuronale enterica, specifici stimoli provenienti dal lume intestinale (iperosmolarità, distorsioni meccaniche e presenza di batteri o carboidrati) possono attivare cellule specializzate, le cellule entero-endocrine, localizzate nella mucosa, specialmente a livello duodenale, che possono fungere da "sensori" e rispondere a specifiche modifiche del contenuto luminale rilasciando diversi mediatori

(5-HT, somatostatina, colecistochinina). Questi modulatori attivano così gli IPANs e le afferenze spinali e vagali e intervengono nel controllo di differenti funzioni intestinali: le cellule enterocromaffini (EC), principali cellule entero-endocrine, attraverso il rilascio di 5-HT, attivano i riflessi secretori, peristaltici e sensoriali.

Nonostante il sistema nervoso enterico possa elaborare le informazioni sensoriali in modo indipendente, l'attività enterica è comunque sottoposta ad un controllo da parte del sistema nervoso centrale. Come già descritto, infatti, fibre afferenti sensoriali vagali provenienti dal tratto GI attivano il nucleo dorsale motore del vago e il nucleo del tratto solitario, trasmettendo a livello centrale le sensazioni fisiologiche non dolorose. Il nucleo dorsale motorio del vago e il nucleo del tratto solitario, insieme all'area postrema formano il complesso dorsale vagale, che integra le informazioni enteriche ricevute, permettendo la coordinazione dei vari processi intestinali (*Hansen 2003*).

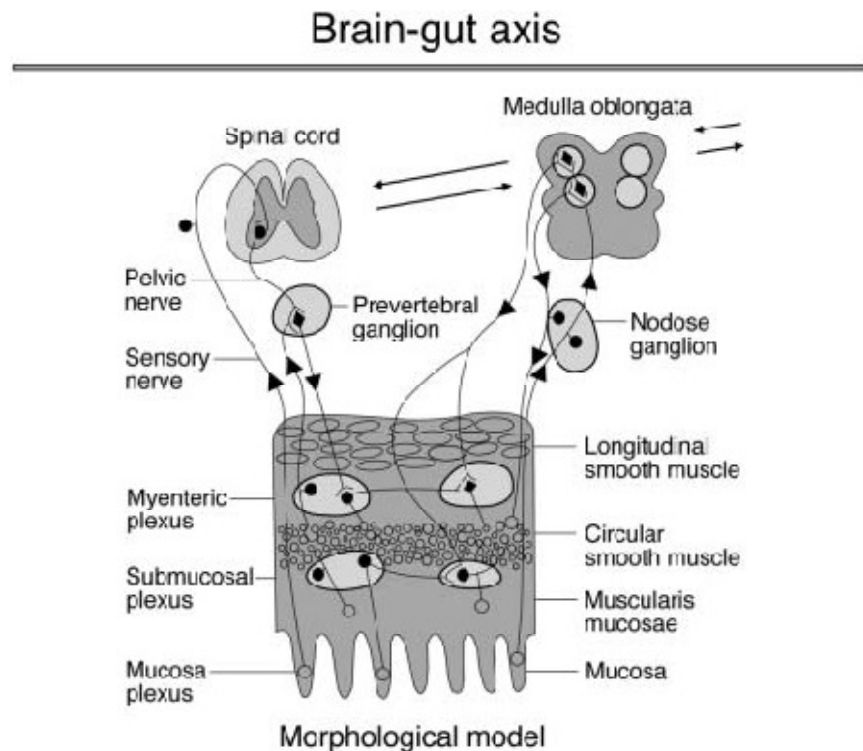


Figura 3. Schema dell'interazione tra sistema nervoso centrale ed enterico (*Hansen 2003*).

Tramite efferenze vagali pregangliari di tipo parasimpatico il SNC innerva le cellule gangliari dei plessi mienterico e sottomucosale, modulando così i processi peristaltici e secretori. Le fibre simpatiche che entrano nel tratto gastroenterico sono invece prevalentemente di natura postgangliare ed innervano direttamente i vasi sanguigni, la muscolatura liscia e le cellule ghiandolari (*Rang et al., 2007*).

L'ISCHEMIA/RIPERFUSIONE MESENTERICA

EZIOLOGIA

L'ischemia/riperfusion (I/R) mesenterica rappresenta una condizione patologica di emergenza caratterizzata dalla riduzione o interruzione dell'apporto sanguigno al distretto intestinale. L'ipossia che ne consegue compromette il metabolismo energetico, con alterazioni dell'omeostasi cellulare e necrosi intestinale.

Paradossalmente, la successiva fase di ripristino del circolo ematico sostiene la complessa cascata di eventi responsabili dei danni vascolari e tissutali, già in atto nel corso della fase ischemica (*Mallick et al., 2004*).

L'occlusione responsabile dell'insulto ischemico intestinale può interessare l'arteria celiaca, che irroro stomaco, duodeno, pancreas, milza e fegato; l'arteria mesenterica superiore o craniale (SMA), deputata alla vascolarizzazione di digiuno e ileo, fino al colon ascendente, e l'arteria mesenterica inferiore o caudale (IMA), che irroro colon trasverso e discendente e retto.

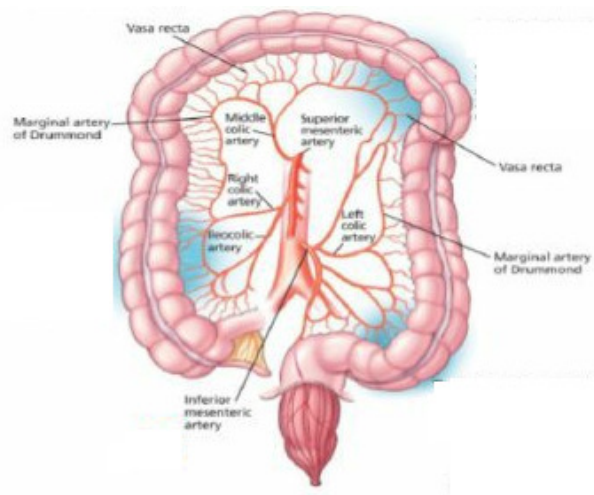


Figura 4. *Principali vasi sensibili al danno da I/R* (www.vascularweb.org).

L'I/R mesenterica non è un'entità clinica isolata, ma spesso si manifesta in associazione ad altre patologie come trombosi venosa o embolia arteriosa, disordini della coagulazione e aterosclerosi. Inoltre, l'evento ischemico può rappresentare il risultato di procedure chirurgiche cardiovascolari correlate ad aneurisma aortico addominale o bypass cardiopolmonare, oppure l'inevitabile conseguenza di un trapianto intestinale. Infine una condizione ischemica può manifestarsi in diverse patologie gastroenteriche come l'enterocolite neonatale necrotizzante, l'infarto intestinale e la sindrome dell'intestino irritabile (IBS) (*Vollmar and Menger, 2011*).

L'ischemia mesenterica acuta è caratterizzata da un'elevata mortalità (60-80%) e da una sempre più crescente incidenza; purtroppo la percentuale di sopravvivenza dei pazienti non è migliorata nel corso degli ultimi 70 anni, a causa di una difficile identificazione della condizione. La diagnosi precoce di ischemia intestinale è infatti limitata da un quadro clinico non specifico: il dolore addominale, spesso il sintomo principale dell'esordio ischemico, può nelle prime fasi essere erroneamente attribuito a stati infiammatori a carico di ileo e pancreas o a un generico sanguinamento gastrointestinale, legato a fenomeni ulcerativi. Anche i risultati biologici e i tests radiologici, spesso non precisi, ritardano la corretta diagnosi dell'evento ischemico che, in molti pazienti, viene riconosciuto quando ormai i processi necrotici del tessuto sono in fase avanzata.

L'embolia arteriosa è la causa più frequente di ischemia mesenterica acuta (40-50% dei casi) e spesso risulta correlata ad un problema cardiaco. Ischemia miocardica, endocarditi e disturbi valvolari rappresentano importanti fattori di rischio per la formazione di un trombo murale che può conseguentemente embolizzare nelle arterie mesenteriche. Il 15% degli emboli arteriosi origina nell'arteria mesenterica superiore, mentre il 50% si manifesta a livello dell'arteria celiaca mediana, principale diramazione della SMA.

Il 25-30% di tutti gli eventi ischemici intestinali è determinato dalla formazione di trombi arteriosi mesenterici, correlata principalmente all'aterosclerosi.

Circa il 20% delle ischemie mesenteriche ha invece una causa non occlusiva, in questo caso l'evento ischemico è favorito da un deficit della pompa cardiaca e da una massiccia vasocostrizione mesenterica, che riducono il flusso sanguigno all'intestino. Ancora poco

conosciuta, la causa non occlusiva risulta associata anche a procedure chirurgiche o traumi, infarto del miocardio e insufficienza aortica.

Infine la trombosi venosa mesenterica è responsabile solo del 10% degli insulti ischemici intestinali. L'occlusione venosa che ne deriva produce una stasi ematica che induce la formazione di edema e di emorragie mucosali. La formazione di trombi venosi rappresenta anche la conseguenza di altre condizioni infiammatorie sistemiche e locali, ad esempio la sepsi intra addominale e la pancreatite (**Tab.1**) (*Oldenburg et al., 2004*).

CAUSA	INCIDENZA	FATTORI DI RISCHIO
Embolo arterioso	40-50%	Aritmia, infarto, endocardite, cardo miopatie, aneurisma ventricolare
Trombo arterioso	25%	Aterosclerosi, ipercoagulabilità, ipotensione
Non occlusiva	20%	Insufficienza cardiaca, ipovolemia, digossina, agonisti alfa adrenergici, beta bloccanti
Trombo venoso	10%	Epatite, pancreatite, chirurgia addominale, trauma

Tabella 1. Schematizzazione delle principali cause di ischemia mesenterica (*Oldenburg et al., 2004*).

FISIOPATOGENESI

Durante la condizione ischemica la carenza di O₂ determina il blocco del metabolismo aerobio, in particolare della fosforilazione ossidativa, con conseguente deplezione intracellulare di ATP. La riduzione di ATP disponibile compromette il funzionamento delle pompe e dei canali ionici di membrana ATP-dipendenti, come la

pompa Na^+/K^+ ATPasi, ne consegue accumulo intracellulare di ioni Na^+ e di acqua e rigonfiamento cellulare. L'alterazione dell'equilibrio idrosalino determina inoltre l'aumento intracellulare di ioni Ca^{++} e successiva attivazione di numerosi enzimi proteolitici: fosfolipasi, endonucleasi e proteasi, che danneggiano le membrane cellulari e gli organelli intracellulari. L'attivazione dell'enzima fosfolipasi A_2 (PLA_2) permette la degradazione dei lipidi di membrana con formazione di acido arachidonico (AA). A partire dall'acido arachidonico, la via enzimatica attivata dall'enzima ciclo-ossigenasi (COX_1 forma costitutiva e COX_2 forma indotta) determina la produzione di prostaglandine (PG), prostaciline (PGI_2) e trombossani (TX); mentre la via lipossigenasica (LOX) rilascia leucotrieni (LB). Gli effetti di questi mediatori dell'infiammazione comprendono vasodilatazione, ma anche vasocostrizione, aumento della permeabilità vascolare e stimolazione della chemiotassi dei polimorfonucleati (PMNs) (*Massberg and Messmer, 1998*).

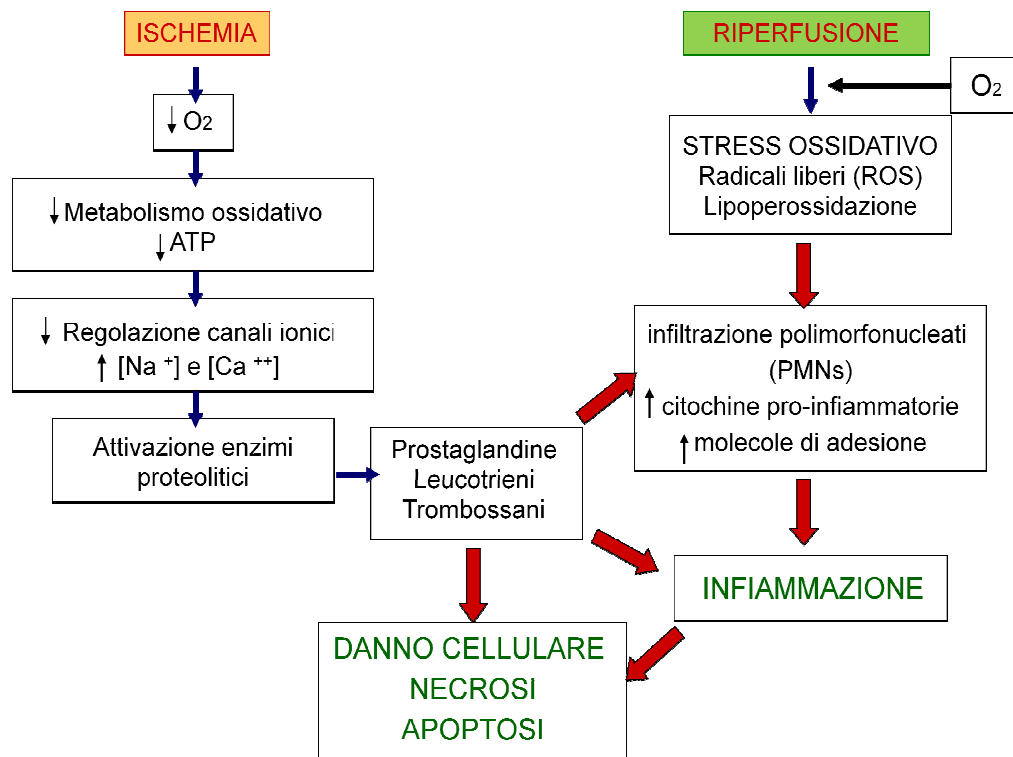


Figura 5. Fisiopatogenesi del danno da I/R.

La successiva fase di riperfusione, pur favorendo il recupero delle normali funzioni metaboliche, scatena una serie di processi che possono rivelarsi paradossalmente ancora più lesivi degli eventi caratterizzanti la prima fase ischemica. Il principale evento dannoso attivato dalla fase riperfusiva è la sintesi di numerose specie radicaliche derivanti dall'ossigeno (ROS), molto reattive nei confronti di proteine, carboidrati e acidi grassi. Inoltre il ripristino dell'apporto ematico è associato a processi di reclutamento e adesione dei leucociti, che, attivandosi in sede endoteliale, ne inducono la perdita di integrità, favorendo la formazione di edema. Non solo i leucociti, ma gran parte delle cellule infiammatorie attivate rilasciano a loro volta ROS, mediatori pro-infiammatori e chemiotattici nel sito danneggiato, sostenendo e amplificando le alterazioni tissutali e la morte cellulare per necrosi e apoptosi (*Carden and Granger, 2000*).

CONSEGUENZE DELL'I/R MESENTERICA

Oltre alle locali alterazioni cellulari ed endoteliali e alla massiccia produzione di essudato precedentemente descritte, l'evento ischemico a carico del distretto intestinale, danneggiando l'integrità della barriera mucosale enterica, determina traslocazione batterica, ossia il passaggio dei batteri della fisiologica flora intestinale attraverso l'epitelio verso siti extraintestinali come linfonodi mesenterici, fegato e milza. In seguito i batteri, tramite circolazione sistemica, possono disseminarsi in tutto l'organismo con pericolo di sepsi, shock che sfociano nella compromissione delle funzioni vitali della "multiple organ failure" (MOF) (*Van Leeuwen et al., 1994*).

L'alterata permeabilità mucosale può determinare anche la perdita della normale funzione assorbente dell'intestino, con riduzione dell'assimilazione dei nutrienti necessari all'organismo.

Oltre alle alterazioni sistemiche generate per disseminazione batterica, anche molecole radicaliche (perossido di idrogeno e anione superossido) e citochine, ampiamente rilasciate nella sede primaria dell'insulto ischemico, possono diffondere ad organi distanti, sviluppando la sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS) che può

facilmente progredire in MOF o addirittura nella morte del soggetto per coagulazione intravascolare disseminata e generale immuno-compromissione (*Bulkley et al., 1997*).

L'I/R di origine intestinale è anche responsabile di alterazioni a carico polmonare: l'intensa infiltrazione dei neutrofili può interessare organi distanti dalla sede primaria di I/R, tra cui il distretto alveolare, contribuendo all'instaurarsi della grave sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), che, manifestandosi nelle successive 24-72h dall'ischemia iniziale, spesso rappresenta il primo stadio della MOF (*Carden and Granger, 2000*).

MEDIATORI COINVOLTI NEL DANNO DA I/R MESENTERICA

Xantina ossidasi e radicali liberi dell'ossigeno.

Durante la fase ischemica, l'ATP cellulare è catabolizzata a ipoxantina mentre la carenza di O_2 induce la conversione dell'enzima xantina deidrogenasi (XDH) in xantina ossidasi (XO), enzima importante per il catabolismo delle purine e responsabile della produzione di ROS in presenza di ossigeno.

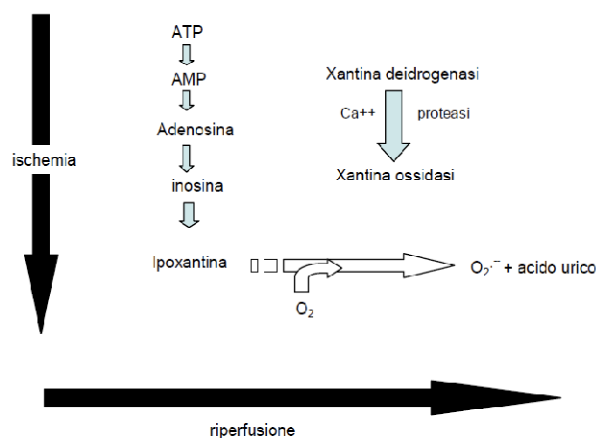
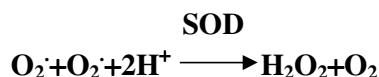


Figura 6. Meccanismo della conversione di ATP in ipoxantina e attivazione dell'enzima XO (*Mallick et al., 2004*).

L'aumento dei livelli intracellulari di Ca^{++} , conseguente la deplezione di ATP e la perdita di regolazione dei canali ionici di membrana, induce l'attivazione di una proteasi Ca-dipendente che, a sua volta, facilita la conversione di XDH a XO.

Durante la riperfusione, invece, l' O_2 reintrodotta nei tessuti reagisce con ipoxantina e XO rilasciando radicali liberi come l'anione superossido (O_2^-) e il perossido di idrogeno (H_2O_2) (Harrison, 2002).

In condizioni fisiologiche l'enzima superossido dismutasi (SOD) previene gran parte degli effetti dannosi del radicale O_2^- convertendolo in H_2O_2 , ma in fase ripervasiva questo meccanismo di difesa cellulare potrebbe risultare meno efficiente, favorendo l'accumulo radicalico.



Dal radicale O_2^- origina così il radicale idrossile ($\text{OH}^\cdot$), specie ancora più reattiva e lesiva, responsabile delle alterazioni biologiche delle membrane cellulari ad opera del processo di lipoperossidazione (Hallwell and Butteridge, 1999).

Le specie ossidanti prodotte dall'enzima XO possono infine indurre la produzione di fattori chemiotattici che richiamano i leucociti e le altre cellule immunitarie nel sito primario di insulto ischemico (Carden and Granger, 2000).

Danneggiando il metabolismo di tipo ossidativo, l'evento ischemico induce anche accumulo di acido lattico con riduzione del pH intracellulare. Tutto ciò riduce la stabilità delle membrane lisosomiali, porta ad attivazione degli enzimi litici e inibizione del legame dei metalli di transizione come il ferro alle loro proteine carrier (transferrina e ferritina). Si osserva così un aumento dei livelli intracellulari di ferro libero (Fe^{+2}), che partecipa alla formazione di radicali liberi attraverso le reazioni di Haber-Weiss e Fenton:



Neutrofili polimorfonucleati (PMNs)

Il tessuto intestinale, come quello di qualunque altro organo esposto ad un evento di I/R, mostra una risposta infiammatoria acuta, caratterizzata dalla migrazione leucocitaria di granulociti neutrofili (PMNs) dal circolo negli spazi interstiziali del tessuto. Tale infiltrazione viene quantificata come indice di danno ischemico attraverso la misurazione dell'attività dell'enzima Mieloperossidasi (MPO), rilasciato dai granuli intraleucocitari in seguito ad attivazione cellulare e responsabile di effetti microbicidi: l'MPO, infatti, catalizza la formazione di acido ipocloroso (HClO) ad azione ossidante a partire da H_2O_2 e ioni Cl^- (Naito *et al.* 2002).

La migrazione dei neutrofili polimorfonucleati al sito di danno infiammatorio avviene tramite un processo complesso e costituito da tre diverse fasi:

- rotolamento: il rilascio di citochine infiammatorie ($TNF\alpha$, IL-1) e chemochine da parte di cellule immunitarie attivate dell'evento ischemico (macrofagi, mastociti) porta all'aumentata espressione di molecole di adesione da parte della superficie endoteliale (E- e P-selectina). Il processo di rotolamento dei leucociti è favorito dalla formazione di interazioni a bassa affinità tra le molecole d'adesione endoteliale e le L-selectine espresse costitutivamente dai leucociti.
- adesione: le citochine $TNF\alpha$ e IL-1 inducono inoltre l'espressione di molecole d'adesione intercellulare (ICAM-1) e vascolari (VCAM-1) da parte dell'endotelio attivato. La debole interazione iniziale tra leucociti ed endotelio viene consolidata dalla presenza di sostanze chemotattiche (leucotriene B₄, C5a e PAF) che, legando specifici recettori sulla superficie leucocitaria, attivano le B2 integrine (CD11a, CD11b e CD18) (Granger *et al.*, 1988). Le integrine così attivate legano le molecole ICAM-1 e VCAM-1 creando legami saldi con l'endotelio vasale.
- diapedesi: in presenza di specifiche sostanze ad azione chemiotattica (CD31), l'interazione tra integrine e molecole d'adesione induce il processo di diapedesi, stravasamento delle cellule leucocitarie nel sito infiammatorio (Panes *et al.*, 1999).

I neutrofili attivati nel sito primario di ischemia possono indurre danni tissutali a seguito di rilascio di enzimi proteolitici come l'elastasi dai granuli citoplasmatici, secernono ulteriori citochine infiammatorie, rilasciano metaboliti dell'acido arachidonico e radicali

liberi, ostacolano il flusso ematico a livello della microcircolazione, effetto che può estendere le alterazioni ischemiche (*Mallick et al., 2004*).

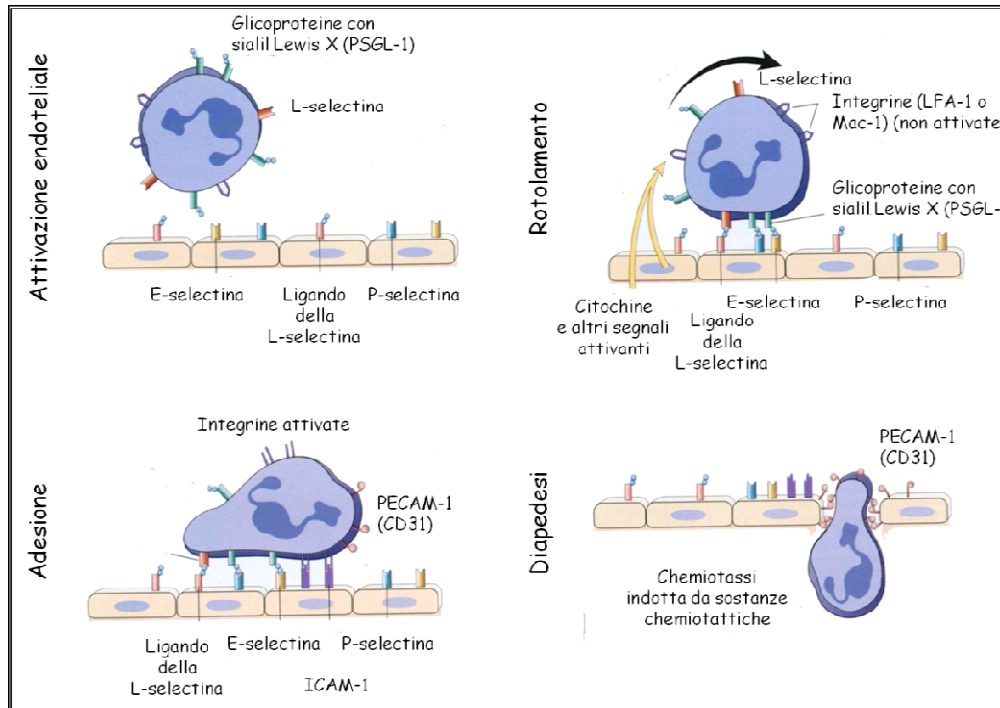
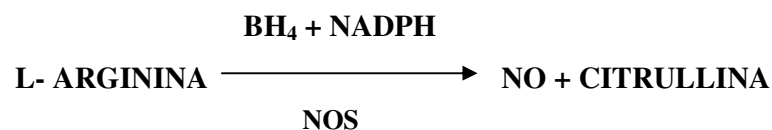


Figura 7. Fasi del processo di infiltrazione leucocitaria (www.unifi.it).

Ossido nitrico (NO)

L'ossido nitrico è sintetizzato ad opera di una famiglia di enzimi, le NO sintasi (NOS), a partire dall'amminoacido L-arginina in presenza di tetraidrobiopterina (BH₄) e nicotinammide- adenin- di nucleotide fosfato (NADPH) come cofattori (Seal 2005):



Sono state identificate tre diverse isoforme per l'NO sintasi: NO sintasi di tipo endoteliale (eNOS) e neuronale (nNOS), espresse costitutivamente; e la forma inducibile (iNOS), espressa in stati infiammatori in risposta a citochine o fattori di crescita (*Albrecht et al., 2003*). A livello intestinale, i tessuti epiteliali, il muscolo liscio, i plessi neuronali ed i PMNs rappresentano possibili fonti di NO (*Salzman 1995*).

Il ruolo di NO nel quadro delle variazioni provocate dal danno ischemico intestinale è tutt'ora controverso, in quanto la molecola sembra responsabile sia di effetti citotossici che citoprotettivi a seconda del diverso modello sperimentale considerato.

In condizioni fisiologiche l'NO rilasciato dalle due forme costitutive è predominante a livello della microcircolazione ed è responsabile di numerosi effetti protettivi: azione scavenger di radicali liberi dell'ossigeno, mantenimento della normale permeabilità a seguito di un effetto rilasciante sulla muscolatura liscia vasale, inibizione dei processi di adesione leucocitaria e aggregazione piastrinica a livello endoteliale (*Mallick et al., 2004*). La sintesi del radicale O_2^- in fase ischemica limita la presenza di NO; ne consegue la compromissione della vasodilatazione endotelio dipendente e l'esacerbazione dell'infiammazione per attivazione piastrinica e leucocitaria. Inoltre, in assenza di NO, il radicale O_2^- , dismutando a formare H_2O_2 , promuove la sintesi di mediatori infiammatori (PAF e LTB_4) e l'attivazione della trascrizione del fattore nucleare NF- κ B, il principale regolatore dell'espressione genica di citochine e molecole d'adesione.

Al contrario, durante la fase di riperfusione, si osserva l'induzione di iNOS, che, rilasciando grandi quantità di NO e permettendo la formazione di radicale perossinitrito, conduce a danno tissutale per aumento della sintesi di radicali responsabili di perossidazione lipidica e nitrosilazione dei residui tirosinici proteici, effetto confermato anche dall'uso di topi knock out per iNOS che si rivelano particolarmente resistenti alle disfunzioni mucosali e alla traslocazione batterica caratteristiche della patologia ischemica (*Kubes and McCafferty, 2000*).

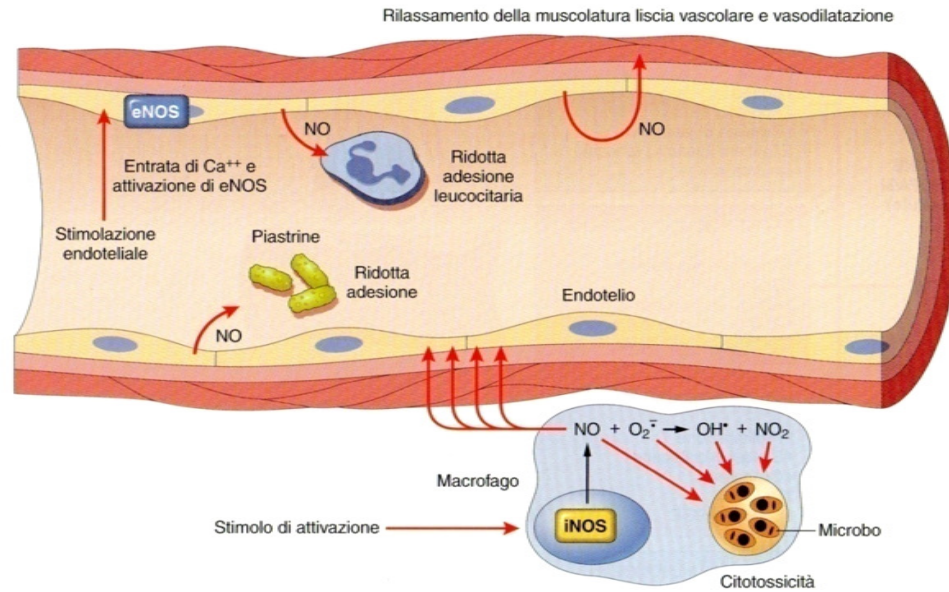


Figura 8. Effetti dell'ossido di azoto a livello vasale (Robbins 2006).

NF-kB

Il fattore nucleare kB (NF-kB) è un fattore di trascrizione che regola l'espressione di numerose proteine infiammatorie coinvolte nella patogenesi da I/R mesenterica.

L'NF-kB ha una struttura eterodimerica, costituita dalle subunità p50 e p65, e quando inattivo si trova localizzato nel citoplasma sotto forma di complesso con la proteina inibitoria I-kB α (p50/p65/I-kB α). L'attivazione cellulare indotta da citochine, molecole ossidanti o mediatori infiammatori durante la fase di riperfusione, determina la fosforilazione, per attivazione dell'enzima i-kB chinasi (IKK), e conseguente degradazione del fattore i-kB α , e la conseguente traslocazione nucleare di NF-kB (Moss *et al.*, 2008). L'attivazione di NF-kB promuove la trascrizione genica di molecole d'adesione (selectine, ICAM, VCAM), citochine, chemochine ed enzimi (iNOS e COX2) (Mallick *et al.*, 2004).

Studi precedenti suggeriscono che l'ossido d'azoto, specie carente durante la fase ischemica, in condizioni fisiologiche previene l'attivazione del fattore NF-kB, inducendo la sintesi de-novo o la stabilizzazione dell'inibitore I-kB α (Peng *et al.*, 1995).

Il sistema del complemento

Il sistema del complemento, fattore importante del sistema immunitario nella difesa di tipo umorale contro agenti infettivi, è costituito da 20 componenti proteiche sieriche (C1-C9) che si trovano in forma inattiva nel plasma o nei liquidi biologici. La loro attivazione in presenza di antigeni, ma anche durante la fase di riperfusione, è mediata dal taglio proteolitico dei primi componenti, che, comportandosi a loro volta da enzimi proteolitici, attivano a cascata le altre proteine, amplificando così la risposta. Una volta attivati, i fattori del complemento, per azione del complesso litico C5b-C9 inducono lisi delle membrane cellulari e batteriche (*Del Gobbo, 2003*).

I frammenti proteici attivati possono depositarsi nel distretto micro vascolare e mucosale (*Gibbs et al., 1996*), attivando differenti risposte pro-infiammatorie, come aumento dell'espressione della molecola d'adesione ICAM, delle citochine TNF α e IL-1 e di iNOS e riduzione dei livelli dell'enzima protettivo SOD (*Montalto et al., 2003*).

In particolare i componenti C3, C4 e C5 attivati, oltre a rappresentare importanti fattori chemiotattici e promuoventi l'adesione linfocitaria, attraverso l'interazione con diverse cellule infiammatorie (neutrofili, mastociti), inducono la liberazione di fattori vasoattivi, l'incremento della permeabilità vasale e il processo di fagocitosi (*Robbins, 2006*).

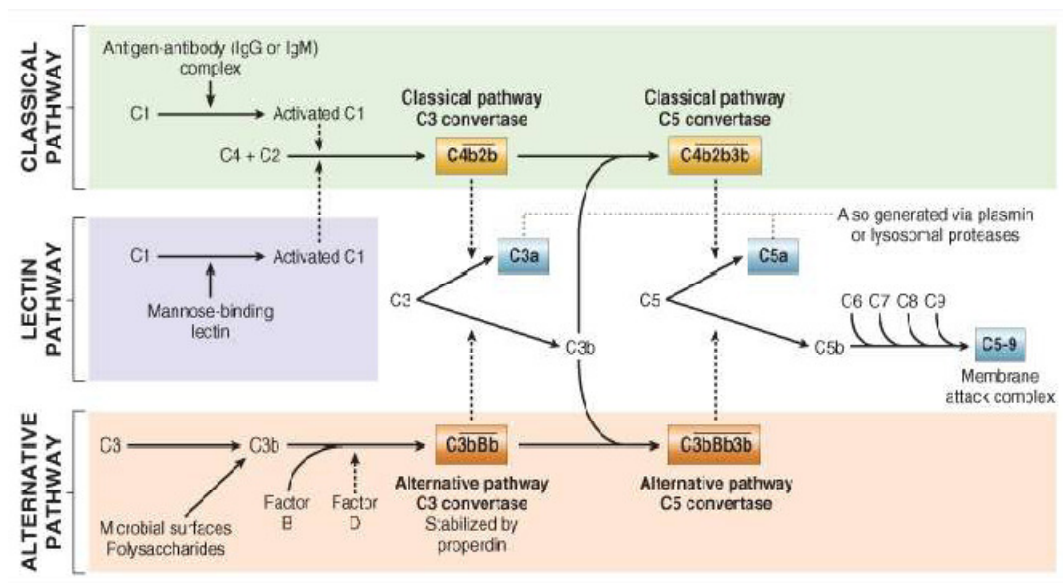


Figura 9. *Differenti vie di attivazione del sistema del complemento (Abbas and Lichtman, 2005).*

Fattore attivante le piastrine (PAF)

Il fattore attivante delle piastrine (PAF) è un mediatore lipidico attivo su un'ampia varietà di cellule importanti nella fase acuta di un evento infiammatorio. Il PAF deriva dal precursore acil-PAF per azione della fosfolipasi A₂, con formazione di liso-PAF che viene poi acetilato dando origine al PAF (*Rang et al., 2007*).

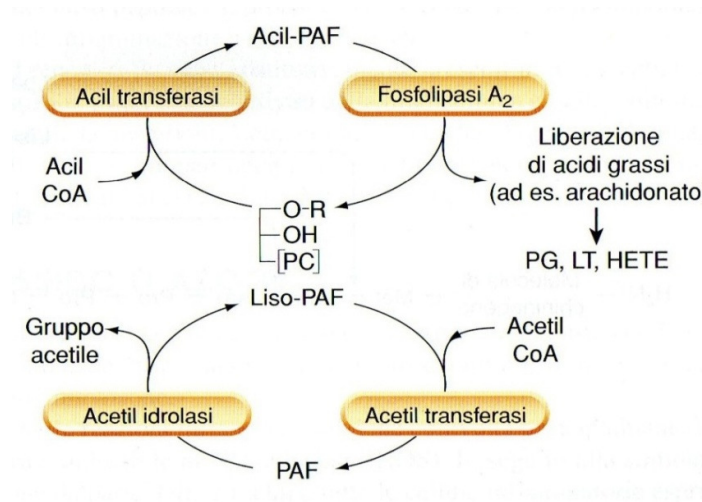


Figura 10. Sintesi e degradazione del PAF (*Rang et al., 2007*).

Il PAF, rilasciato dalle cellule infiammatorie stimulate e dalle piastrine attivate dalla trombina, determina vasodilatazione locale con formazione di edema, chemiotassi di monociti e PMNs, aggregazione piastrinica, attivazione dell'infiltrazione leucocitaria, sia a livello locale nel tessuto ischemizzato che polmonare, aggravando la sindrome respiratoria acuta (ARDS) (*Kubes et al., 1990*). Studi clinici suggeriscono così per il PAF un ruolo importante nelle disfunzioni caratteristiche nella MOF, complicazione sistemica dell'I/R, dal momento che i suoi livelli plasmatici aumentano dopo l'evento ischemico (*Ayala et al., 1996*).

Macrofagi

I macrofagi appartengono alla famiglia dei fagociti mononucleati e svolgono molteplici funzioni nell'ambito dell'immunità naturale e acquisita. Innanzitutto i macrofagi hanno un ruolo importante nella difesa contro i microorganismi, grazie alla loro capacità fagocitante verso agenti patogeni (batteri, virus, funghi). Raggiunto l'agente lesivo tramite il processo di chemiotassi, sono in grado di legarlo utilizzando specifici recettori posti sulla membrana. Dopo il legame, i macrofagi internalizzano il microorganismo costituendo un fagosoma. I lisosomi primari si fondono con il fagosoma, formando un fagolisosoma, in cui avviene la degradazione.

In modo analogo ai PMNs, anche i macrofagi producono numerosi metaboliti reattivi dell'ossigeno e dell'azoto. Infatti, in seguito a ingestione di un microorganismo o contatto con cellula alterata, tramite formazione di NADPH, viene attivata un'ossidasi di membrana che riduce l' O_2 ad anione O_2^- , utilizzato dalla cellula per produrre H_2O_2 e OH^- ad azione battericida. Oltre a questa degradazione ossigeno dipendente, i lisosomi dei macrofagi contengono numerosi enzimi o sostanze antimicrobiche come il lisozima, le difensine e le proteine cationiche, deputate alla processazione degli agenti inglobati. I macrofagi inoltre appartengono alla classe di cellule presentanti l'antigene, indispensabili per l'attivazione ed il reclutamento linfocitario: in seguito a fagocitosi, infatti, l'antigene degradato viene successivamente presentato ai linfociti T, inducendone proliferazione e differenziamento.

A livello intestinale i macrofagi sono prevalentemente localizzati, nel loro stato quiescente, negli strati mucosale e muscolare. Attivati dall'evento ischemico acuto, i macrofagi residenti rilasciano citochine pro infiammatorie tra cui $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$, modulatori della risposta immunitaria e dell'attività di altre cellule come i linfociti T e B, a livello locale, e responsabili delle principali manifestazioni sistemiche dell'infiammazione acuta (**Fig. 10**) (*Del Gobbo, 2003*).

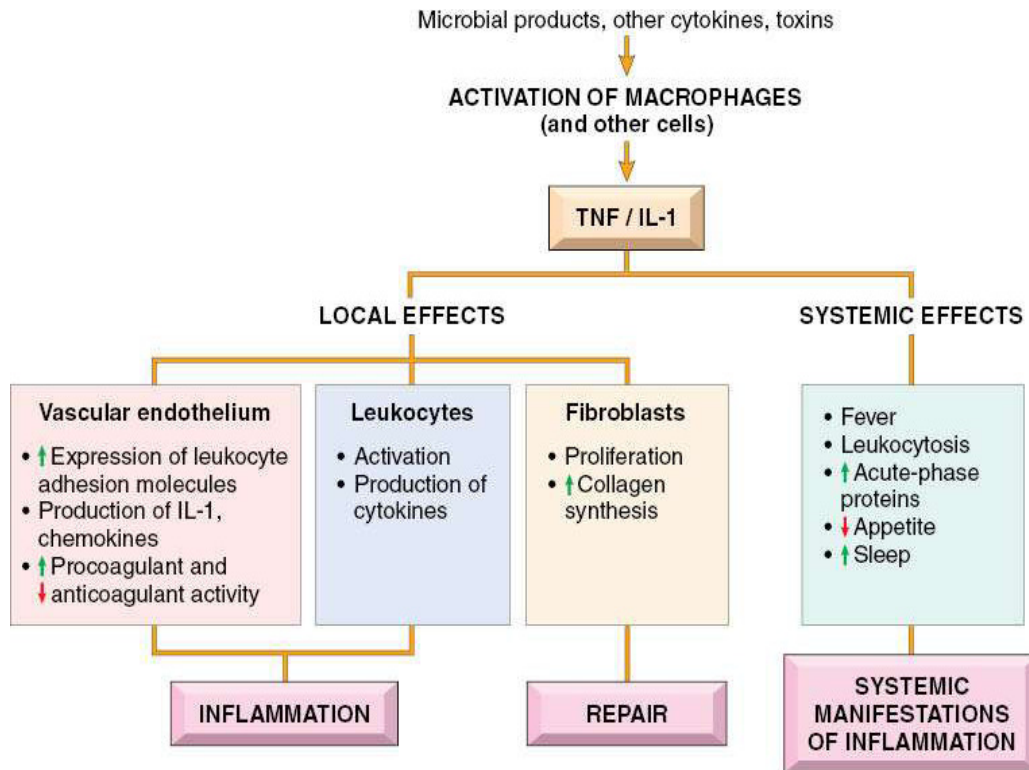


Figura 11. Effetti locali e sistemici delle citochine TNF e IL- 1 (Silvestri 2010).

Oltre a rilasciare citochine infiammatorie e a fagocitare componenti antigeniche e detriti cellulari, dopo l'evento ischemico, i macrofagi residenti attivati esprimono, come i PMNs, elevati livelli di enzima mieloperossidasi, che facilita la produzione di ROS e del fattore Egr-1 (early grown response factor 1), deputato alla trascrizione di geni codificanti per numerose proteine infiammatorie come la citochina $TNF\alpha$, la molecola d'adesione ICAM-1, il fattore di crescita derivante dalle piastrine CD44 e la molecola chemiotassica per i monociti MCP-1 (Yan *et al.*, 2000).

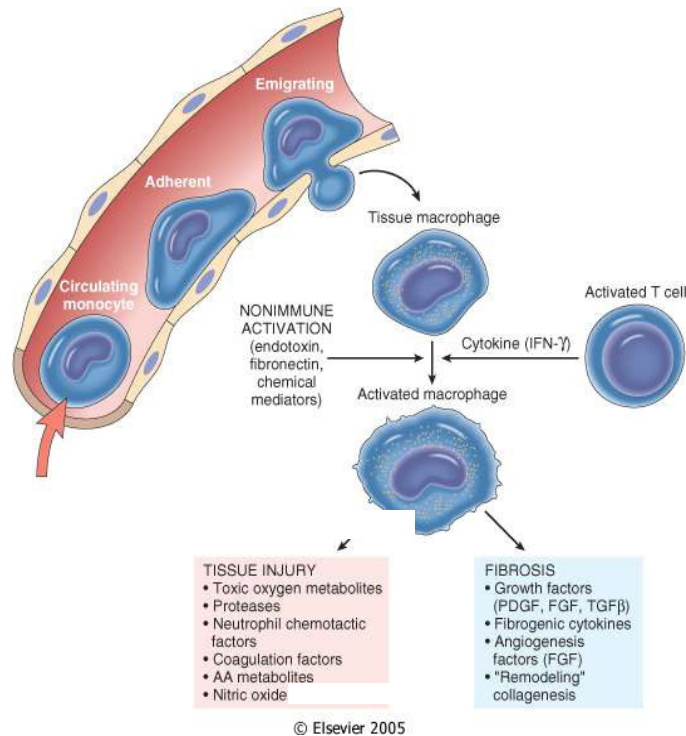


Figura 12. Principali effetti mediati dai macrofagi (Abbas and Lichman 2005).

Nonostante il loro ruolo nella patologia ischemica sia ancora in fase investigativa, sembra che i macrofagi potrebbero essere responsabili dell'insorgenza di molte alterazioni tissutali descritte nelle prime fasi che seguono l'evento ischemico mesenterico. Alcuni studi infatti dimostrano il ruolo dei macrofagi nelle alterazioni motorie intestinali in un modello di I/R nei ratti, in seguito al rilascio di IL-6 (Hierholzer *et al.*, 1999). Inoltre la deplezione selettiva dei macrofagi residenti con diclorometilene bifosfonato in ratti sottoposti a I/R mesenterica limita il danno mucosale iniziale, per riduzione dei livelli tissutali di Egr-1, ed ostacola, durante la ri-perfusione, il reclutamento dei PMNs (Chen *et al.*, 2004).

Serotonina

La serotonina (5-HT), ampiamente localizzata nel tratto gastrointestinale, modula i riflessi peristaltici e secretori tramite l'attivazione di differenti sottotipi recettoriali di tipo neuronale, muscolare o epiteliale. Evidenze sperimentali indicano il coinvolgimento della serotonina nella patologia ischemica mesenterica: l'insulto ischemico, infatti, induce il massiccio rilascio di questo mediatore da parte dell'intestino danneggiato, con conseguente aumento dei livelli plasmatici di 5-HT e attivazione dell'aggregazione piastrinica e fenomeni vaso costrittivi (*Teramoto et al., 1998*).

Il ruolo della 5-HT nel'I/R rimane comunque ancora contraddittorio poichè le evidenze sperimentali supportano sia un ruolo protettivo che lesivo di questo neurotrasmettitore, probabilmente correlato al coinvolgimento di diversi recettori. Se da un lato, infatti, la 5-HT riduce il rilascio della citochina infiammatoria TNF α da parte di cellule mononucleate isolate da sangue periferico umano (PBMC) e stimulate con LPS, attraverso l'attivazione del recettore 5-HT_{2A} (*Cloezy-Tayarani et al., 2003*), d'altra parte è invece il trattamento con l'antagonista 5-HT_{2A} ketanserina a prevenire l'infiltrazione, l'aggregazione piastrinica e l'aumentata permeabilità causate dalla condizione di ischemia mesenterica nei roditori (*Bertoni et al., 2007*). Infine, l'aumentata disponibilità di 5-HT, attraverso la stimolazione del recettore 5-HT₃ epiteliale, è stata messa in relazione all'aumentata permeabilità mucosale e alla traslocazione batterica, che conseguono l'evento ischemico in uno studio condotto sui ratti (*Yamada et al., 2003*).

LA SEROTONINA

LOCALIZZAZIONE E FUNZIONI

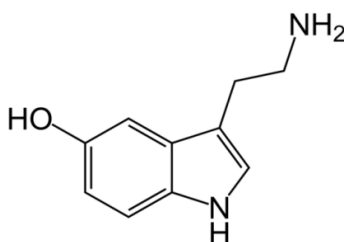


Figura 13. *Struttura chimica della serotonina.*

Identificata nel 1938 nella pelle di anfibi da parte del Prof. Vittorio Erspamer che ne riferì la presenza nell'intestino (*Erspamer et al., 1952*), venne descritta chimicamente nel 1948 come 5-idrossitriptamina (5-HT), isolata nelle piastrine e successivamente anche nel SNC e nel tratto gastrointestinale, quale importante neurotrasmettitore ed ormone locale.

Per il 90% si trova nel tratto GI in elevate concentrazioni nelle cellule enterocromaffini (EC) della mucosa e viene sintetizzata, in misura minore, dai neuroni del plesso mienterico, in cui svolge attività di neurotrasmettitore eccitatorio. Nel SNC la serotonina risulta così coinvolta nella modulazione della motilità intestinale, sia attraverso un effetto diretto sul muscolo liscio, che indiretto di tipo neuronale, nella stimolazione delle secrezioni e nell'induzione di nausea e vomito.

Nel sangue, invece, la serotonina è accumulata all'interno delle piastrine tramite un sistema di trasporto attivo, e viene rilasciata da granuli di deposito intrapiastrinici in seguito ad attivazione dell'aggregazione piastrinica. A livello dei vasi sanguigni, la

serotonina determina sia vasocostrizione, tramite azione diretta sulle cellule muscolari lisce vasali, che vasodilatazione, stimolando la secrezione di NO da parte dell'endotelio. Oltre che a livello enterico, la 5-HT è un neurotrasmettitore diffuso anche del SNC, la distribuzione dei neuroni serotonergici è infatti molto ampia: dai nuclei del rafe, contenenti aggregati di corpi cellulari localizzati nel ponte e midollo allungato, si diramano proiezioni ascendenti e discendenti diffuse alla corteccia, ippocampo, sistema limbico e ipotalamo. Le vie serotonergiche centrali sono associate alla regolazione di numerose funzioni fisiologiche e comportamentali: modulazione dell'umore, del sonno, regolazione dell'appetito, della temperatura corporea (proiezioni ascendenti) e modulazione del dolore (proiezioni discendenti) (*Rang et al., 2007*).

SINTESI E METABOLISMO

La serotonina viene sintetizzata a partire dall'aminoacido triptofano, convertito in 5-idrossitriptofano tramite l'azione dell'enzima triptofano idrossilasi (TpH), nelle cellule enterocromaffini, che esprimono l'isoforma triptofano idrossilasi-1 e nei neuroni enterici attraverso l'isoforma triptofano idrossilasi-2 (*Cote et al., 2003*). Le piastrine invece, essendo prive dell'enzima TpH, non possono sintetizzare 5-HT. In seguito il 5-idrossitriptofano subisce il processo di decarbossilazione a 5-HT ad opera della decarbossilasi, enzima anche coinvolto nella sintesi delle catecolamine e dell'istamina. La serotonina, così sintetizzata, è immagazzinata in granuli secretori. In seguito al rilascio, la sua azione fisiologica è rapidamente bloccata tramite reuptake nei terminali neuronali, negli enterociti mucosali e nelle cellule endoteliali vasali, all'interno del citoplasma avverrà poi la sua degradazione (*Rang et al., 2007*).

Poiché la serotonina è una molecola basica, carica a pH fisiologico, la sua ricaptazione richiede un sistema di trasporto attivo (SERT) che co-trasporta la 5-HT con lo ione Na^+ , utilizzando così lo stesso gradiente elettrochimico del Na^+ generato dalla pompa Na^+/K^+ ATPasica (*Spiller 2008*). L'attività funzionale di SERT può essere alterata regolandone l'espressione: la fosforilazione di SERT ad opera della proteina chinasi C (PKC) induce l'internalizzazione e così la riduzione della ricaptazione di 5-HT (*Quian et al., 1997*). Molti studi in vivo suggeriscono che anche lo stato infiammatorio compromette il

funzionamento di SERT: la presenza di mediatori pro-infiammatori quali prostaglandina E_2 (PGE_2), interferon- γ ($IFN\gamma$) e $TNF-\alpha$ determinano la riduzione dell'espressione del trasportatore (Foley et al., 2007).

La degradazione intracellulare della serotonina avviene attraverso deaminazione ossidativa catalizzata dalla monoaminoossidasi (MAO), seguita dall'ossidazione ad acido 5-idrossiindolacetico (5-HIAA), principale metabolita serotoninergico, escreto con le urine (Rang et al., 2007).

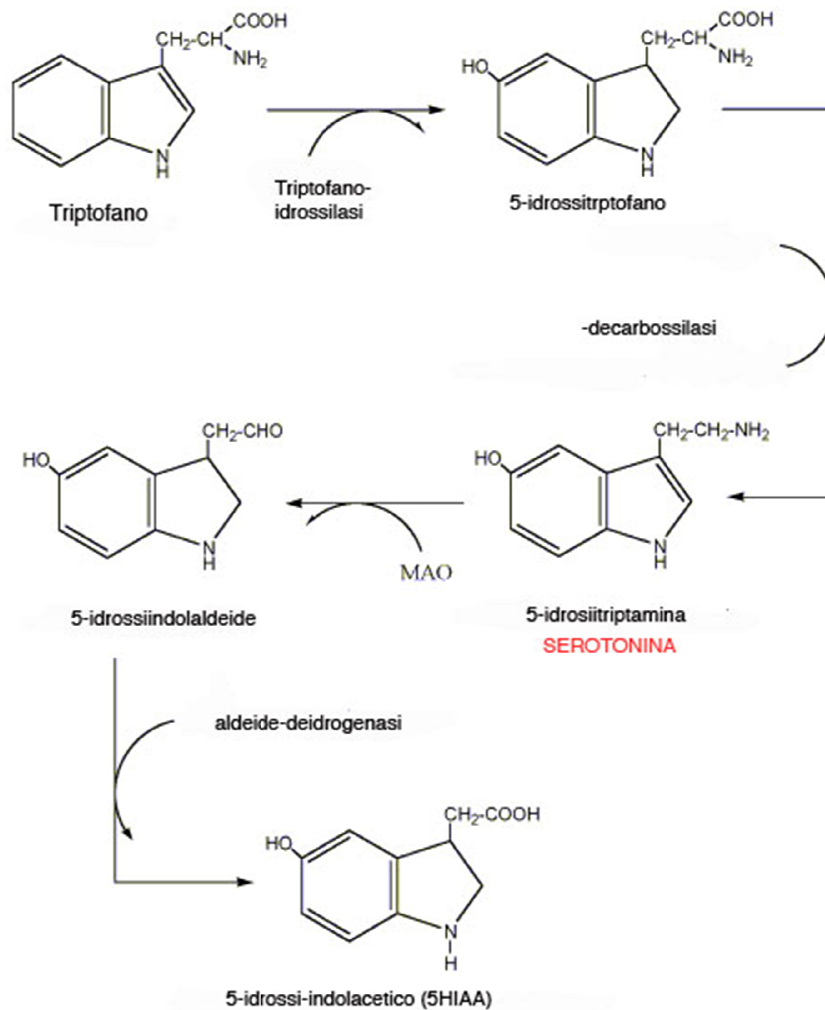


Figura 14. Sintesi e metabolismo della serotonina.

LA SEROTONINA NELL'INTESTINO

Diverse funzioni intestinali, come i riflessi peristaltici e secretori e la trasmissione sensoriale, sono legate al rilascio di serotonina, come mediatore locale e neurotrasmettitore. Gran parte della 5-HT presente nel tratto GI (95%) è immagazzinata nei granuli secretori delle cellule enterocromaffini (EC), distribuite prevalentemente alla base delle cripte epiteliali. In risposta a stimoli luminali legati alla presenza di cibo o batteri e allo stiramento meccanico, le cellule EC rispondono con il massiccio rilascio di 5-HT all'interno della lamina propria (*Gershon et al., 2004*). La 5-HT liberata stimola gli IPANs submucosali e mienterici, di conseguenza gli interneuroni ascendenti e discendenti ed i motoneuroni. Gli interneuroni ascendenti, a loro volta, attivano i motoneuroni eccitatori, che rilasciando Ach, Sostanza P e neurochinina A, portano a contrazione muscolare, mentre gli interneuroni discendenti, stimolando il rilascio di NO e VIP da parte dei motoneuroni inibitori sono responsabili del rilasciamento. Tale coordinata attività neuromuscolare regola così la motilità peristaltica lungo il tratto intestinale. Anche le cellule del Cajal, che regolano la ritmicità dell'attività elettrica del muscolo liscio e partecipano alla trasmissione neuromuscolare, sono influenzate dalla 5-HT (*Wouters et al., 2007*).

La risposta neuronale afferente estrinseca, attivata in parte dalla stimolazione degli IPANs e fondamentale per la trasmissione viscerale centrale, è direttamente modulata dalla 5-HT rilasciata dalle cellule EC (*Beattie and Smith, 2008*).

Oltre alla mediazione dei riflessi locali motori e secretori, la 5-HT nell'intestino svolge anche un ruolo di neurotrasmettitore, anche se i neuroni serotoninergici rappresentano solo una piccola percentuale dei neuroni totali enterici: rilasciata dai neuroni, essa media così la trasmissione sinaptica eccitatoria rapida e lenta negli IPANs, mentre la 5-HT contenuta negli interneuroni e motoneuroni partecipa ai riflessi discendenti del plesso mienterico (*Galligan 2002; Young and Furness 1995*).

RECETTORI SEROTONINERGICI NELL'INTESTINO

Sono noti attualmente 14 recettori serotoninergici organizzati in 7 tipi di recettori principali (5-HT₁₋₇R), di cui i recettori 5-HT₁ e 5-HT₂ ulteriormente suddivisi in sottotipi. Gran parte dei recettori serotoninergici sono accoppiati a proteina G stimolatoria o inibitoria (GPCR) e permettono la trasduzione del segnale intracellulare tramite aumento o riduzione dei livelli intracellulari di AMP ciclico (cAMP), produzione di inositolo trifosfato (IP₃) o diacilglicerolo (DAG). Il recettore 5-HT₃, invece, è l'unico recettore-canale, l'attivazione da parte del ligando induce così l'aumento della permeabilità ai cationi Na⁺ e K⁺ (**tab. 2**).

Nell'intestino sono presenti numerosi sottotipi recettoriali per la serotonina: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄ e 5-HT₇; suddivisi, a seconda della loro localizzazione, in recettori neuronali e muscolari. I recettori neuronali sono i sottotipi 5-HT_{1A}, 5-HT₃, 5-HT₄ e 5-HT_{1P}, mentre i recettori presenti principalmente sulla muscolatura liscia comprendono i sottotipi 5-HT_{2A}, 5-HT₄ e 5-HT₇.

Recettore	Localizzazione	Effetti principali	Secondo messaggero
1A	SNC, SNE	Inibizione neuronale, effetti comportamentali (modulazione sonno, alimentazione, ansia, termoregolazione)	Riduzione cAMP IPK
1B	SNC, muscolo liscio vasale	Inibizione neuronale, vasocostrizione polmonare	Riduzione cAMP
1D	SNC, vasi sanguigni	Vasocostrizione cerebrale, effetti comportamentali	Riduzione cAMP
1P	SNC, SNE, miocardio, derma ⁽¹⁾	Controllo peristalsi	ignoto
2A	SNC, SNP, muscolatura liscia, piastrine	Effetti comportamentali, contrazione muscolatura liscia, aggregazione piastrinica, vasocostrizione/vasodilatazione	Aumento IP ₃ /DAG
2B	Stomaco (fondo), muscolo liscio vasale	Contrazione, vasodilatazione	Aumento IP ₃ /DAG
2C	SNC, plesso coroidale	Secrezione nel CSF	Aumento IP ₃ /DAG
3	SNC, SNP	Eccitazione neuronale, nocicezione, emesi	Canale ionico
4	SNC, tratto GI	Eccitazione neuronale, motilità GI	Aumento cAMP
5	SNC	Percezione sensoriale, effetti comportamentali, funzioni neuroendocrine ⁽²⁾	Riduzione cAMP
6	SNC	Effetti comportamentali, modulazione ansia, memoria ⁽²⁾	Aumento cAMP
7	SNC, tratto GI, vasi sanguigni	Ignoti	Aumento cAMP

Tabella 2. Principali sottotipi recettoriali per la serotonina (*modificata da Rang et al., 2007*)

⁽¹⁾ (Branchek et al., 1988), ⁽²⁾ (Wesolowka 2002)

(Abbreviazioni: SNP sistema nervoso periferico, CSF fluido cerebrospinale).

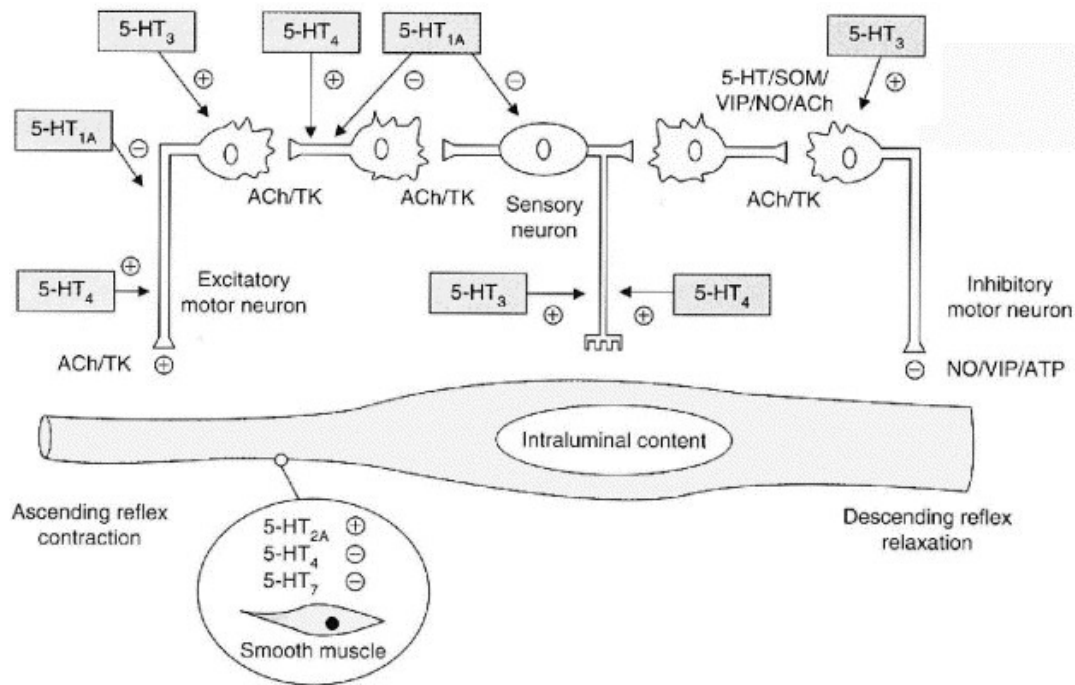


Figura 15. Modulazione delle funzioni intestinali da parte dei recettori serotoninergici (Agazzi *et al.*, 2003). (Abbreviazioni: SOM somatostatina, VIP peptide vasoattivo intestinale, TKs tachichinine, + stimolazione, - inibizione).

Il recettore 5HT₁

Per quanto riguarda il recettore 5-HT₁, nell'intestino sono presenti i due sottotipi 5-HT_{1A} e 5-HT_{1P}.

Il recettore 5-HT_{1A} è localizzato a livello presinaptico nei neuroni sottomucosali e mienterici, operando come auto- ed etero-recettore inibitorio sulla neurotrasmissione eccitatoria veloce e lenta, la sua attivazione riduce il rilascio di 5-HT e altri neurotrasmettitori (De Ponti 2004, Dickson *et al.*, 2010).

Il buspirone, agonista parziale 5-HT_{1A}, già in commercio come ansiolitico, promuove nel tratto GI il rilasciamento del fondo dello stomaco, riducendo la nausea e tutti gli altri sintomi associati a dispepsia (Chial *et al.*, 2003).

Questo sottotipo recettoriale risulta anche coinvolto nella modulazione delle funzioni immunitarie: la stimolazione del recettore 5-HT_{1A}, espresso dai macrofagi, linfociti T e B attivati da uno stato infiammatorio, potenzia la proliferazione cellulare, il rilascio di

citochine pro-infiammatorie (*Abdouh et al., 2004*) e la fagocitosi nei macrofagi (*Freire-Garabal et al., 2003*). Studi condotti in vitro su colture cellulari di linfociti T immortalizzati (Jurkat T cells) e di macrofagi peritoneali murini mostrano che l'attivazione della risposta immunitaria mediata da agonisti 5HT_{1A} come l'8-OH-DPAT è correlata all'aumentata trascrizione nucleare del fattore NF-kB, tramite stimolazione della via di trasduzione del segnale PI₃K/Akt (*Hsiung et al., 2005; Aune et al., 1993*).

La 5-HT rilasciata dalle cellule enterocromaffini, tramite stimolazione mucosale, attiva il recettore 5-HT_{1P}, localizzato sui terminali IPAN submucosali. L'attivazione recettoriale 5-HT_{1P}, tramite stimolazione dei neuroni afferenti contenenti VIP e CGRP, è responsabile dell'inizio e del mantenimento del riflesso peristaltico (*Pan and Gershon 2000*). Alcuni studi hanno identificato nel sumatriptan un agonista 5-HT_{1D-1P}: la somministrazione del composto induce rilasciamento dello stomaco e ne ritarda lo svuotamento tramite coinvolgimento della via nitrergica (*Coulie et al., 1999*).

Il recettore 5-HT_{2A}

Il recettore 5-HT_{2A} è stato prevalentemente identificato sulle cellule muscolari lisce circolari e longitudinali del tratto gastrointestinale, ma è anche presente su enterociti e neuroni mienterici e submucosali. L'attivazione 5-HT_{2A} media la risposta secretoria della mucosa isolata del tratto colico nell'uomo e nel ratto (*Bonaventure 2005*) e determina contrazione del muscolo liscio digiunale nell'uomo (*Kuemmerle 1995*).

Il recettore 5-HT_{2A} è espresso anche dalle piastrine; l'attivazione di questo recettore induce il processo di aggregazione e una vasocostrizione generalizzata che preclude l'impiego clinico di farmaci agonisti 5-HT_{2A} come pro-cinetici nel trattamento di patologie dell'intestino (sindrome dell'intestino irritabile, IBS) associate a costipazione (*Beattie and Smith, 2008*).

Evidenze sperimentali, come precedentemente descritto, riportano invece un effetto limitante la risposta infiammatoria derivante da I/R mesenterica in ratti trattati con

l'antagonista 5-HT_{2A} selettivo ketanserina, effetto protettivo attribuito all'inibizione delle funzioni piastriniche (*Bertoni et al., 2007*).

Come il recettore 5-HT_{1A}, anche il recettore 5-HT_{2A} è espresso dai macrofagi e i linfociti T, in cui regola rispettivamente il rilascio di sostanze chemotattiche e la proliferazione cellulare (*Ahern 2011*).

Il recettore 5-HT₃

Nel SNE il recettore 5-HT₃ è ampiamente espresso: localizzato sui neuroni dei plessi mienterico e sottomucosale, media la neurotrasmissione eccitatoria veloce (*Gershon 2004, 2005*) e partecipa alla regolazione dell'attività pacemaker delle cellule interstiziali del Cajal (*Wouters et al., 2007*).

Inoltre l'attivazione del recettore 5-HT₃, localizzato negli strati muscolari lisci longitudinale e circolare e sullo strato mucosale, è associata ad un effetto pro-cinetico e stimolante le secrezioni intestinali: studi preclinici hanno dimostrato infatti che gli antagonisti 5-HT₃, ondansetron, granisetron e alosetron, rallentano il transito intestinale in topi e ratti e che la somministrazione di ondansetron inibisce inoltre le secrezioni del tratto colico nel ratto (*Budhoo et al., 1996*) e migliora la diarrea indotta da 5-HT nel topo (*Pascual et al., 2002*).

Oltre all'impiego clinico legato al rallentamento del transito nell'IBS associata a diarrea (IBS-D), gli antagonisti 5-HT₃ si rivelano efficaci anche nel ridurre il dolore viscerale caratteristico di questo disordine funzionale e gli episodi emetici associati alla somministrazione di chemioterapici. Ondansetron, alosetron e cilasetron attenuano così le risposte nocicettive e la distensione meccanica eccessiva nel ratto (*Mori et al., 2004, Morteau et al., 1994*), attraverso l'azione antagonista 5-HT₃ a livello dei terminali dei neuroni afferenti estrinseci vagali e spinali, responsabili della trasmissione al SNC delle sensazioni viscerali intestinali.

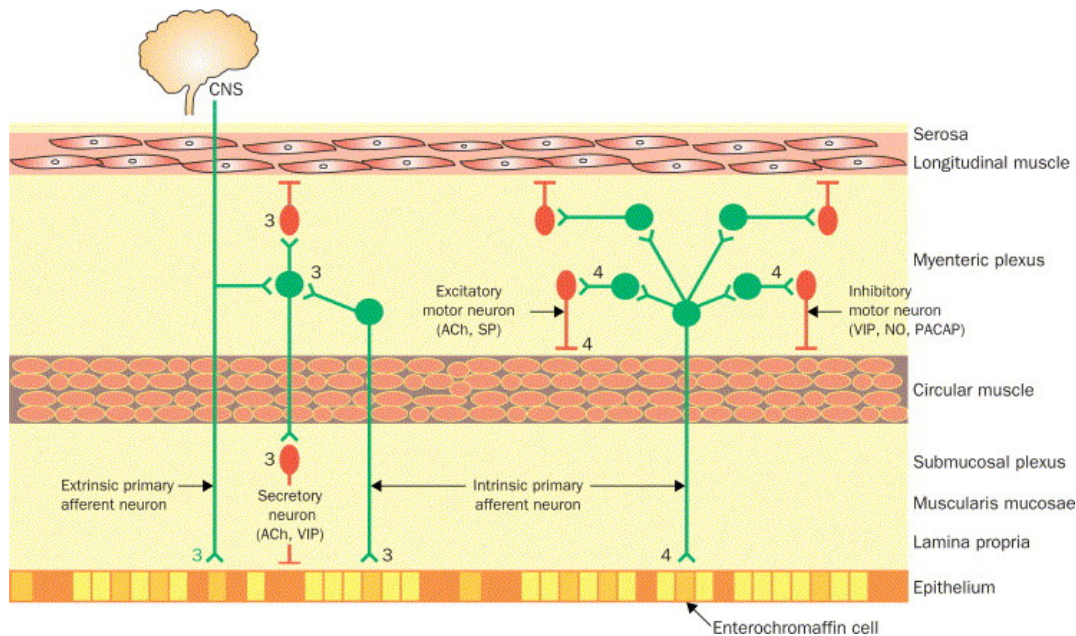


Figura 16. Localizzazione e neurotrasmissione dei recettori 5-HT₃ e 5-HT₄ nel SNE (Talley 2001).

Il recettore 5HT₄

L'attivazione del recettore 5HT₄ neuronale, localizzato come recettore presinaptico sugli IPANs submucosali, modula nel tratto GI il riflesso di propagazione peristaltico, tramite il rilascio di ACh e CGRP e stimolazione degli interneuroni ascendenti e discendenti. Gli interneuroni ascendenti attivano il rilascio di ACh e sostanza P da parte dei motoneuroni eccitatori, con conseguente contrazione muscolare; mentre gli interneuroni discendenti stimolano i motoneuroni inibitori che, rilasciando NO e VIP, inducono rilassamento: la coordinazione di questi differenti effetti muscolari permette il mantenimento del riflesso peristaltico, attivato da stimolazione 5-HT_{1P} (Gershon and Tack 2007).

Il recettore 5-HT₄ media anche un'azione pro-secretoria sui neuroni enterici submucosali ed enterociti, promuovendo la secrezione di cloruro e bicarbonato dalle cellule epiteliali di digiuno, ileo e colon (Budhoo et al., 1996). La stimolazione 5-HT₄, recettore espresso direttamente anche dalle cellule muscolari lisce, induce rilasciamento gastrico nel ratto e del colon nell'uomo (Komada and Yano 2007; Tam et al., 1994).

Agonisti 5HT₄, come tegaserod, cisapride e mosapride, trovano importante applicazione nei disturbi gastrointestinali legati a ipomotilità (IBS-C e dispepsia) poiché potenziano il riflesso peristaltico, favorendo il transito e le secrezioni intestinali, e riducono la sensibilità viscerale.

Il recettore 5-HT₇

Il recettore 5-HT₇ è presente nel SNE nell'uomo sia nello stomaco, che nell'intestino tenue e colon, sugli IPANs mienterici e submucosali, nei neuroni discendenti e direttamente sul muscolo liscio del tratto ileale (Tonini *et al.*, 2005). La stimolazione 5-HT₇ negli IPANs determina la trasmissione eccitatoria postsinaptica lenta, mentre l'attivazione del recettore sul muscolo liscio dell'ileo e del colon induce rilassamento (Carter *et al.*, 1995).

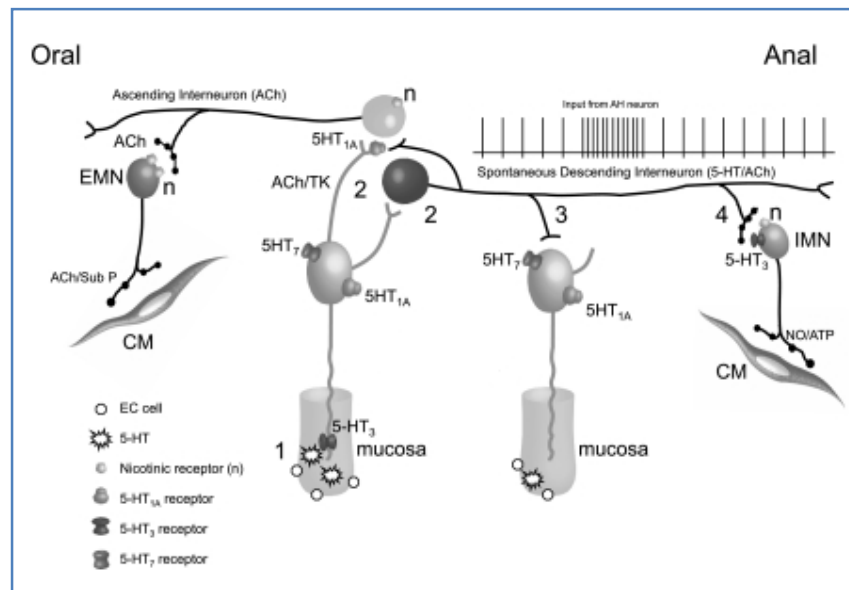


Figura 17. Localizzazione neuronale dei recettori 5-HT_{1A}, 5-HT₃ e 5-HT₇ (Dickson *et al.*, 2010).
(Abbreviazioni: EMN, motoneuroni eccitatori; IMN, motoneuroni inibitori; CM, cellula muscolare)

L'ACETILCOLINA

LOCALIZZAZIONE E FUNZIONI

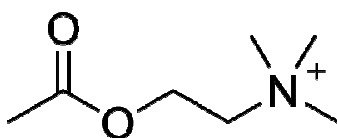


Figura 18. *Struttura chimica dell'Acetilcolina.*

L'acetilcolina (ACh) rappresenta, come la serotonina, un importante neurotrasmettitore nel SNC e SNP, rilasciata dalle giunzioni neuromuscolari, dalle fibre pregangliari simpatiche e parasimpatiche e dalle fibre postgangliari parasimpatiche è responsabile di effetti muscarinici e nicotinici, secondo la prima denominazione fornita nel 1914 da Dale e collaboratori.

Interagendo con specifici recettori nicotinici muscolari e gangliari, l'ACh modula sia la trasmissione neuromuscolare e la contrazione del muscolo scheletrico che la trasmissione gangliare autonoma. La stimolazione dei recettori muscarinici, distribuiti a livello ghiandolare, cardiaco e sul muscolo liscio comprendono invece la stimolazione delle secrezioni esogene e gastriche, contrazione muscolare (bronchi, vescica, tratto GI), inibizione dell'attività cardiaca e vasodilatazione generalizzata con conseguente riduzione della pressione arteriosa.

Anche nel cervello l'ACh presenta ampia distribuzione: i principali centri neuronali colinergici interessano le regioni striatali, sottoippocampali e i nuclei della base; attraverso un'azione prevalentemente eccitatoria (stimolazione nicotinic e

muscarinica) l'Ach regola lo stato di veglia, i processi legati all'apprendimento e alla memoria e il controllo motorio (*Rang et al., 2007*).

Ricerche sperimentali recenti hanno anche evidenziato per questo neurotrasmettitore un'attività modulatoria della risposta cellulare immunitaria in differenti eventi infiammatori locali e sistemici. L'Ach, infatti, interagendo con specifici sottotipi recettoriali espressi da macrofagi e linfociti, come il recettore nicotinico di tipo alfa7 ($\alpha 7nAChR$) o recante le subunità alfa4/beta2 e alfa5 ($\alpha 4/\beta 2nAChR$ e $\alpha 5nAChR$), riduce la sintesi e la liberazione di mediatori pro infiammatori e la proliferazione cellulare (*Lackan and Kirchgessner, 2011*).

SINTESI E METABOLISMO

L'Acetilcolina è sintetizzata all'interno delle terminazioni nervose a partire dalla colina, captata dalle terminazioni stesse attraverso un sistema di trasporto specifico. La colina è così acetilata dall'enzima citosolico colina acetiltransferasi che trasferisce alla colina un gruppo acetilico fornito dall'Acetil-CoA, principale prodotto di catabolismo del metabolismo aerobio cellulare. La tappa limitante della sintesi dell'Ach è il trasporto della colina, che viene regolato in funzione alla quantità di neurotrasmettitore liberato. L'Ach così sintetizzata è immagazzinata all'interno delle vescicole sinaptiche, utilizzando un trasporto attivo accoppiato al gradiente elettrochimico per H^+ tra organelli intracellulari e citoplasma. L'esocitosi delle vescicole colinergiche nello spazio sinaptico invece è regolata dall'aumento intracellulare dei livelli di ione Ca^{++} .

In seguito a rilascio, l'Ach interagisce con i propri recettori postsinaptici ed è velocemente idrolizzata a colina e acetato dall'enzima colinesterasi, presente a livello neuronale sinaptico, specialmente a livello delle sinapsi neuromuscolari o gangliari dove la trasmissione colinergica è più rapida. Gran parte della colina rilasciata è così normalmente ricaptata dalle terminazioni neuronali ed utilizzata per l'ulteriore sintesi di neurotrasmettitore (*Parsons et al., 1993*).

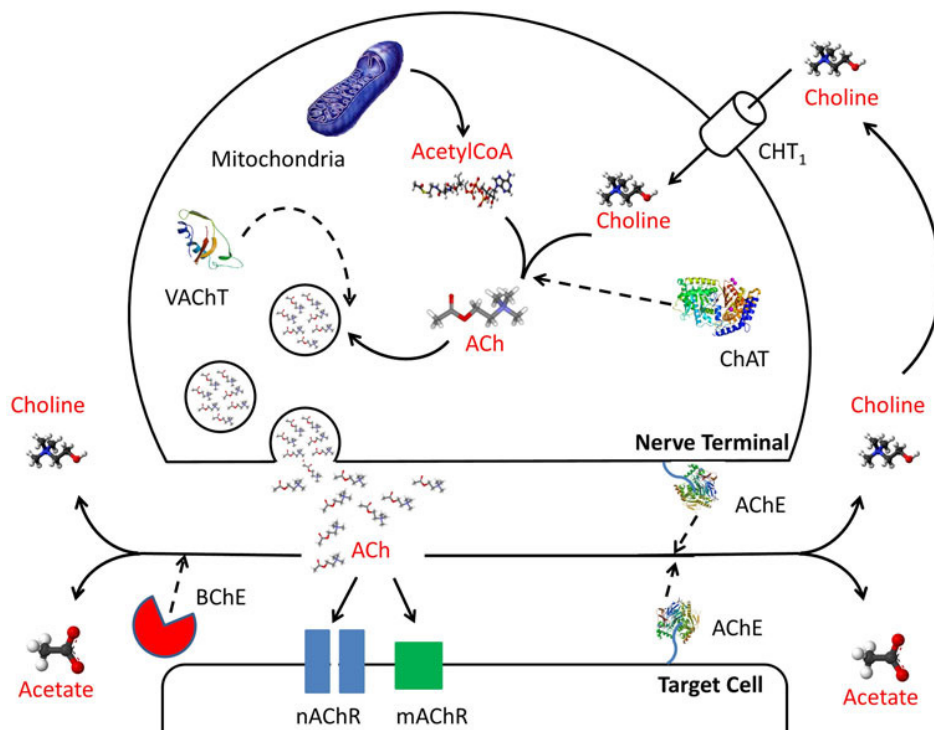


Figura 19. Rappresentazione di una sinapsi colinergica (Zoheir et al., 2012).

RECETTORI COLINERGICI

Recettori nicotinici

I recettori nicotinici sono canali ionici a struttura pentamerica attivati da ligando, derivanti dalla combinazione delle 16 differenti subunità identificate fino ad oggi; α 1-9, β 1-4, γ , δ e ϵ , si ottengono strutture omomeriche o eteromeriche. Tutti i sottotipi nicotinici contengono subunità α e β (eteromeri), ad eccezione del sottotipo $(\alpha 7)_5$ (omomero) presente nel cervello. Ogni subunità attraversa la membrana 4 volte, formando così un complesso sistema di eliche: tra tutte, l'elica M2 di ogni subunità costituisce la parete del poro centrale; piegata verso l'interno, determina un restringimento del poro nella porzione centrale della membrana cellulare.

Il recettore presenta due siti di legame per l'Ach, localizzati all'interfaccia tra il dominio extracellulare di ogni subunità α e la subunità adiacente: entrambi i siti devono essere occupati dal ligando per promuovere l'attivazione del canale.

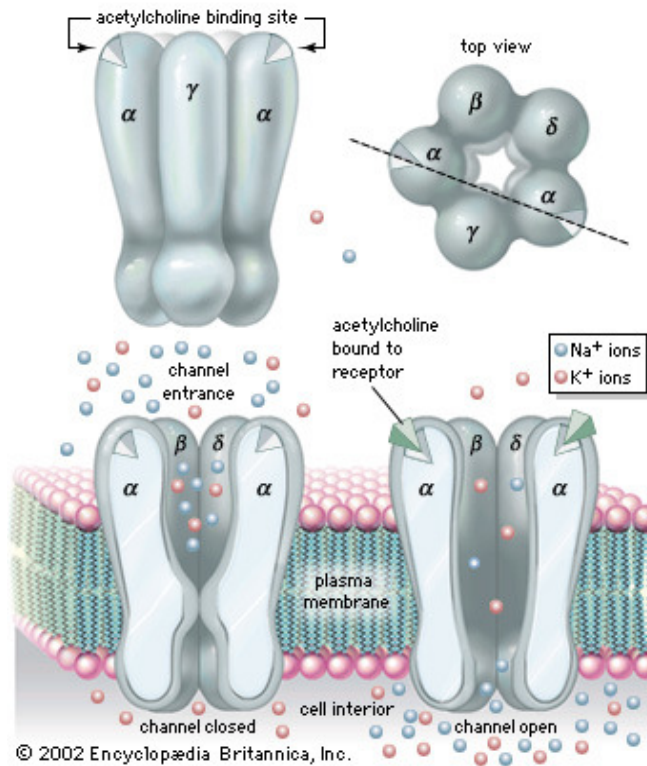


Figura 20. Struttura del recettore colinergico nicotinico (*Enciclopedia britannica on line*).

Esistono tre classi di recettori colinergici nicotinici: i recettori di tipo muscolare, localizzati a livello della giunzione neuromuscolare della muscolatura scheletrica, i recettori gangliari, responsabili della trasmissione sinaptica dei gangli del sistema nervoso autonomo e i recettori del SNC che mediano la trasmissione eccitatoria cerebrale.

La stimolazione dei recettori nicotinici induce l'apertura del poro centrale del canale ionico e aumentata permeabilità ai cationi, principalmente Na^+ e K^+ , per i tipi muscolare e gangliare, e ioni Ca^{2+} per i recettori nicotinici centrali. La conseguente

depolarizzazione della membrana postsinaptica genera un potenziale d'azione che si propaga così alle zone adiacenti determinando contrazione della fibra muscolare e potenziale eccitatorio veloce a livello sinaptico (*Karlin 1993*).

Recettori muscarinici

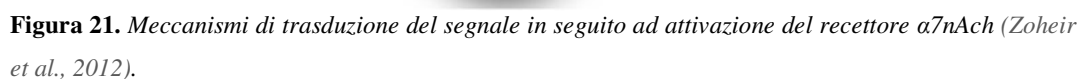
I recettori muscarinici, denominati M_{1-5} , appartengono alla famiglia dei recettori a 7 eliche transmembrana accoppiati a proteina G. la trasduzione del segnale nei sottotipi M_1 , M_3 e M_5 è legata all'aumento dei livelli intracellulari di inositolo trifosfato (IP_3) e diacilglicerolo (DAG), mentre la stimolazione M_2 e M_4 inibisce l'enzima adenilato ciclasi, riducendo i livelli intracellulari di cAMP.

Il recettore M_1 è localizzato nel SNC, SNP e cellule ECL gastriche, l'attivazione di tale recettore media così la trasmissione eccitatoria lenta gangliare e centrale e la stimolazione gastrica vagale. Il recettore M_2 è presente nel cuore, dove ne rallenta l'attività, e come recettore presinaptico inibitorio, sulle terminazioni neuronali centrali e periferiche, dove inibisce la trasmissione sinaptica riducendo il rilascio di neurotrasmettitore. La stimolazione M_3 , recettore espresso nelle ghiandole esocrine e sulla muscolatura liscia, induce invece secrezione e contrazione muscolare. I recettori M_4 e M_5 , ancora non ben caratterizzati, sono localizzati prevalentemente nel SNC, ma rimangono tutt'oggi sconosciute le loro implicazioni funzionali (*Wess 1996*).

IL RECETTORE $\alpha 7$ NICOTINICO ($\alpha 7nAChR$)

Il recettore nicotinico recante la subunità $\alpha 7$ è espresso come recettore canale a struttura omo-pentamerica nei neuroni, dove regola il rilascio di neurotrasmettitore a livello presinaptico ed induce eccitazione postsinaptica. La trasmissione sinaptica può essere così associata a differenti meccanismi di trasduzione del segnale, come la fosforilazione recettoriale da parte delle chinasi della famiglia Src, aumentata attività

Il recettore $\alpha 7$ nACh rappresenta anche un importante modulatore della risposta immunitaria innata e adattativa; l'attivazione del recettore localizzato su cellule immunitarie come macrofagi, linfociti T e B limita la sintesi ed il rilascio di citochine pro-infiammatorie, molecole d'adesione e sostanze chemiotattiche, con meccanismo legato all'inibizione della traslocazione e trascrizione del fattore NF-kB, mediatore chiave della risposta infiammatoria. Studi condotti su macrofagi peritoneali in coltura dimostrano che la stimolazione $\alpha 7$ attiva la chinasi Janus 2 (JAK2) che a sua volta fosforila il fattore di trascrizione STAT3. Dimeri di STAT3 fosforilati traslocano nel nucleo, agendo come regolatori negativi della trascrizione mediata da NF-kB. (*De Jonge et al., 2005*). D'altra parte, invece, il recettore $\alpha 7$ localizzato sui monociti umani sembra inibire la traslocazione di NF-kB attraverso un meccanismo legato all'inibizione della fosforilazione del fattore ikB ad opera della chinasi IKK (*Yoshikawa et al., 2006*).



Nei linfociti T, l'attivazione di questo particolare sottotipo di recettore nicotinico regola invece l'equilibrio dinamico tra la risposta th1/th2 verso la proliferazione cellulare di tipo th2: a seguito di stimolazione recettoriale $\alpha 7$ il rilascio di citochine proinfiammatorie th1 è ridotto, mentre aumenta l'espressione della citochina anti-infiammatoria IL-10 e la citochina th2 IL-4 (*Galitovskiy et al., 2011*). In particolare, nei linfociti T citotossici la stimolazione $\alpha 7$ nACh riduce la secrezione di IL-2 e induce l'espressione di CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocytes Antigen 4), importante regolatore inibitorio dell'omeostasi immunitaria (*Wang et al., 2012*).

Il ruolo del recettore nicotinico $\alpha 7$ nei linfociti B è ancora relativamente sconosciuto, anche se è stato dimostrato che la stimolazione del recettore in queste cellule ne riduce la proliferazione e l'attivazione inibendo l'interazione tra linfociti T e recettore CD40, espresso dalle cellule B (*Koval et al., 2011*).

Il recettore $\alpha 7$ nACh è stato anche individuato sulle cellule endoteliali umane (HuVECs), sull'epitelio bronchiale e sulle cellule muscolari lisce dei vasi. A livello endoteliale il recettore sembra modulare il reclutamento linfocitario regolando l'espressione delle molecole d'adesione necessarie al processo: la nicotina e l'agonista $\alpha 7$ selettivo CAP55 riducono così l'espressione di VCAM-1 e E-selectina, con meccanismo d'azione nuovamente legato all'inibizione di NF- κ B, limitando l'infiltrazione di PMNs in un modello di edema locale da carragenina. La riduzione della secrezione di chemochine e molecole d'adesione indotte da TNF si osserva anche in vitro, in cellule endoteliali umane, a seguito di trattamento con nicotina (*Saeed et al., 2005*).

A livello dell'endotelio vasale, il recettore $\alpha 7$ nicotinico sembra favorire l'angiogenesi, ossia il processo di neovascolarizzazione, in modelli murini di aterosclerosi e ischemia: nonostante l'effetto sembri principalmente mediato da attivazione della via IP₃K/akt, la stimolazione $\alpha 7$ è anche in grado di aumentare l'espressione di VEGF e del suo recettore (VEGF-receptor 2), probabilmente per traslocazione nucleare di NF- κ B (*Heeschen et al., 2002*).

L'attivazione farmacologica del recettore $\alpha 7$ nACh, tramite trattamento con nicotina o diversi agonisti selettivi (GTS-21, AR-R17779, CAP55), rappresenta un'innovativa strategia terapeutica nella modulazione della risposta immunitaria, specialmente da parte dei macrofagi, associata a stati infiammatori a carico intestinale o in modelli di I/R extraintestinale.

La somministrazione di AR-R17779 migliora la motilità intestinale e riduce l'infiltrato linfocitario della parete muscolare, alterazioni provocate dall'intensa manipolazione chirurgica in modelli murini di ileo postoperatorio. Inoltre il trattamento con l'agonista $\alpha 7$ riduce la concentrazione peritoneale di IL-6, citochina rilasciata dai macrofagi residenti nel plesso mienterico (*Boeckxstaens et al., 2007*).

Un ruolo anti-infiammatorio importante per questo sottotipo recettoriale colinergico è stato dimostrato anche in modelli di colite indotta da destrano sodio solfato (DSS): topi knock out per $\alpha 7$ nAChR sviluppano una risposta infiammatoria significativamente più severa rispetto ai topi wild type (WT) di riferimento, con perdita di peso più elevata, indicatore di sofferenza dell'animale, e livelli di citochine plasmatiche superiori nei primi tre giorni dall'induzione (*Ghia et al., 2009*).

Nell'ambito dell'ischemia renale, il trattamento con nicotina o GTS-21 migliora la funzionalità renale compromessa dall'insulto chirurgico, riducendo la necrosi tubulare ed i livelli tissutali di TNF, chemochine e HMGB1 (high motility box 1 protein), fattore pro-infiammatorio rilasciato dai macrofagi come induttore della trascrizione NF- κ B (*Sadis et al., 2007*).

La somministrazione di nicotina, precedentemente l'insulto occlusivo, si rivela efficace nel limitare anche il danno infiammatorio derivante da I/R epatica: i topolini ischemizzati, infatti, sottoposti a trattamento farmacologico per via intraperitoneale, presentano ridotti livelli di TNF e IL-6 plasmatici rispetto agli animali trattati con solo veicolo (*Crockett et al., 2006*).

Infine anche in modelli di ischemia cardiaca, simili effetti protettivi, riconducibili a riduzione della zona infartuata, livelli di citochine, infiltrato infiammatorio e numero di cellule apoptotiche, sono stati osservati in ratti sottoposti a procedura ischemica in seguito a stimolazione vagale del recettore $\alpha 7$ nicotinico (*Calvillo et al., 2011*).

SCOPO DELLA RICERCA (I)

Valutazione del coinvolgimento del sistema serotoninergico nella risposta infiammatoria determinata da ischemia/riperfusiones mesenterica.

Considerando l'importante ruolo della serotonina nella modulazione delle funzioni intestinali fisiologiche e in numerose alterazioni infiammatorie enteriche e i promettenti risultati ottenuti con la modulazione 5-HT_{2A} (*Bertoni et al., 2007*), la prima fase di questo lavoro di dottorato è stata incentrata sulla valutazione del coinvolgimento di questo mediatore nelle alterazioni motorie e mucosali indotte da I/R mesenterica. In particolare, in questa prima sezione, si è concentrata l'attenzione sui sottotipi recettoriali serotoninergici 5-HT₃ e 5-HT₄, già funzionalmente studiati nell'ambito di altri disordini infiammatori intestinali (IBS, IBD), sul sottotipo 5-HT_{1A}, recettore ancora non ben caratterizzato, e sul sistema di reuptake della serotonina SERT, la cui espressione risulta alterata dall'evento ischemico.

È stato così adottato un modello sperimentale di ischemia/riperfusiones intestinale nel topolino, messo a punto in precedenza nei laboratori del Dipartimento di Farmacia. Il modello prevede una fase ischemica di 45 minuti indotta chirurgicamente tramite occlusione temporanea dell'arteria mesenterica superiore (SMA). La fase di ischemia è poi seguita da un periodo di riperfusiones di 5 ore, al termine del quale il danno intestinale è quantificato attraverso la misura di diversi parametri correlati allo stato infiammatorio del tessuto. È stato così quantificato l'essudato infiammatorio come indice di permeabilità vasale, nei tratti di digiuno, ileo e colon; l'attività dell'enzima Mieloperossidasi (MPO) nel digiuno, come marker di infiltrazione dei PMNs e la produzione di specie radicaliche, tramite il dosaggio nell'ileo della Malondialdeide (MDA), prodotto finale di lipoperossidazione. Infine, allo scopo di determinare le eventuali alterazioni della motilità intestinale, è stato anche valutato il transito gastrointestinale.

Il contributo del sistema serotoninergico nel modello di I/R proposto è stato accertato tramite somministrazione endovenosa, prima dell'occlusione mesenterica, dei seguenti ligandi, a topolini sottoposti a procedura ischemica:

- BUSPIRONE, agonista parziale 5-HT_{1A}, (10 mg/kg)
- TEGASEROD, agonista parziale 5-HT₄, (0,1 mg/kg)
- ALOSETRON, antagonista 5-HT₃, (0,1mg/kg)
- FLUOXETINA, inibitore del trasportatore SERT, (10 mg/kg)

Infine sono stati anche considerati:

un gruppo di topolini controllo, animali ischemizzati (I45'/R5h) trattati con solo veicolo (soluzione fisiologica)

gruppi di topolini falsi operati (FO), sottoposti a laparotomia ed esposizione del tessuto intestinale senza occlusione mesenterica, trattati con soluzione fisiologica o ciascuno dei diversi composti in studio.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE (I)

Sono stati individuati i seguenti gruppi sperimentali:

- Topi sottoposti a ischemia di 45 minuti seguita da riperfusione di 5 ore (**gruppo I/R**),
- Topi falsi operati (**gruppo FO**).

A ciascun gruppo è stato somministrato uno dei seguenti trattamenti farmacologici:

- Soluzione fisiologica (1 ml/kg), i.v. 5 minuti prima dell'occlusione mesenterica (**gruppo CONTROLLO**),
- **Buspirone (10 mg/kg)**, i.v. 5 minuti prima dell'occlusione mesenterica,
- **Tegaserod (0.1 mg/kg)**, i.v. 5 minuti prima dell'occlusione mesenterica,
- **Alosetron (0.1 mg/kg)**, i.v. 5 minuti prima dell'occlusione mesenterica,
- **Fluoxetina (10 mg/kg)**, i.v. 5 minuti prima dell'occlusione mesenterica.

I dosaggi dei ligandi serotoninergici sono stati identificati sulla base di dati riportati in letteratura, che documentassero efficacia nella specie animale utilizzata.

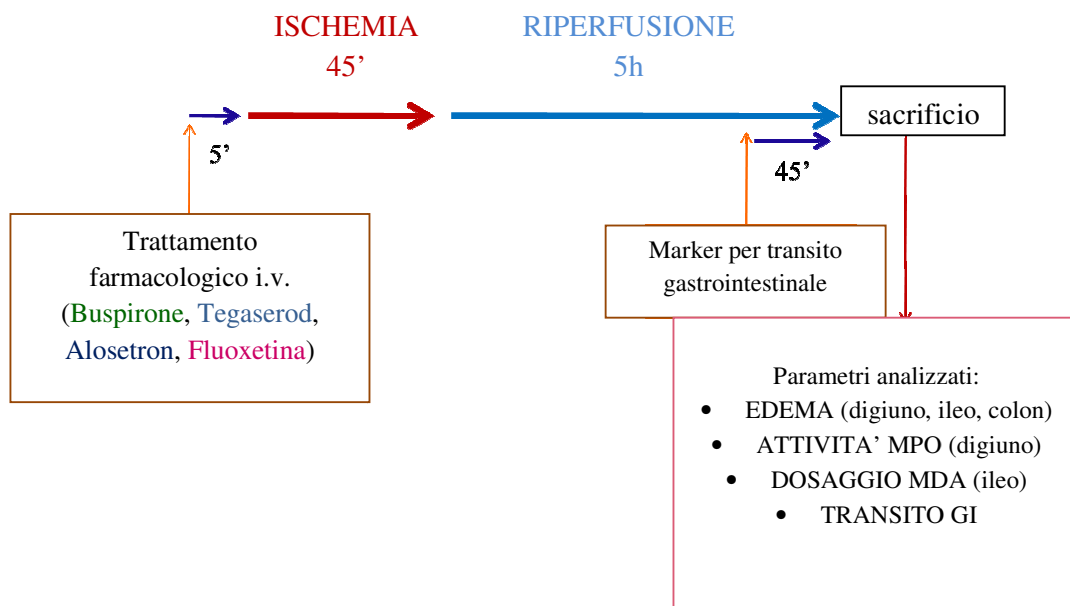


Figura 22. Schema del protocollo sperimentale.

RISULTATI (I)

EDEMA INTESTINALE

Il pre-trattamento con agonista parziale 5-HT_{1A} buspirone riduce efficacemente l'edema indotto nel digiuno da I/R.

L'edema infiammatorio, misurato nei tratti di digiuno, ileo e colon, è stato considerato indice dell'aumentata permeabilità vasale che si verifica in seguito ad una condizione di ischemia mesenterica seguita da riperfusione. La produzione di essudato è stata così sperimentalmente espressa come ratio tra differenza tra peso umido e peso secco dei campioni e peso secco del campione.

Nel tratto digiunale (**Fig.23**), si osserva che il modello sperimentale di I/R proposto (I45'/R5h) (ratio: 3.95 ± 0.22) determina aumento altamente significativo dell'edema tissutale ($P < 0.001$), quando comparato con il rispettivo gruppo FO di riferimento (ratio: 2.56 ± 0.15). Solo l'agonista parziale 5-HT_{1A} buspirone, si rivela efficace (ratio: 3.15 ± 0.27 ; $P < 0.05$) nel limitare l'edema nel digiuno, a differenza dei ligandi Alosetron e Fluoxetina che non modificano in modo significativo il parametro analizzato rispetto al gruppo I/R controllo. Il trattamento con Tegaserod, agonista parziale 5-HT₄, nonostante sia caratterizzato da un'ampia variabilità sperimentale (ratio: 4.69 ± 0.94), mostra una chiara tendenza a peggiorare la permeabilità vasale indotta da I/R.

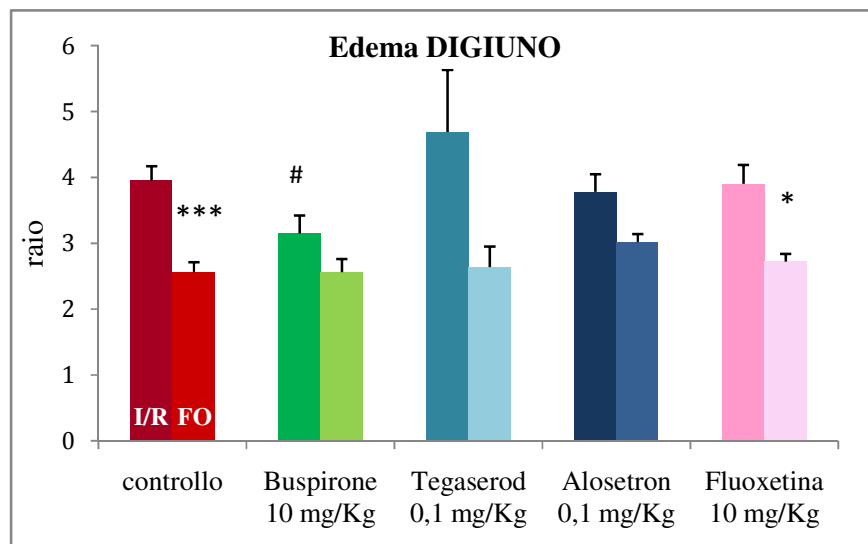


Figura 23. Edema tissutale misurato nel tratto del digiuno in topolini I/R e FO trattati con fisiologica, Buspirone e Fluoxetina (10 mg/Kg), Tegaserod e Alosetron (0.1 mg/Kg).

*** $P < 0.001$, * $P < 0.05$; FO rispetto corrispondente gruppo I/R; # $P < 0.05$ gruppo I/R trattato farmacologicamente vs gruppo I/R controllo (ANOVA two way, Bonferroni's post test).

Anche nel tratto ileale (**Fig. 24**), come osservato nel digiuno, l'ischemia di 45' seguita da 5h di riperfusione determina un notevole incremento (ratio: 4.04 ± 0.23 ; $P < 0.001$) nel contenuto d'acqua tissutale rispetto ai topolini FO (ratio: 2.19 ± 0.16).

Nessun trattamento farmacologico, somministrato per via intravenosa precedentemente l'occlusione mesenterica, in generale modifica la risposta vasale rispetto al gruppo I/R trattato con soluzione fisiologica. Si è registrato un incremento del valore di ratio misurato nei topolini trattati con Fluoxetina, mentre nuovamente il gruppo I/R trattato con agonista parziale 5-HT₄ presenta una maggiore variabilità nella risposta misurata, rispetto agli altri ligandi testati.

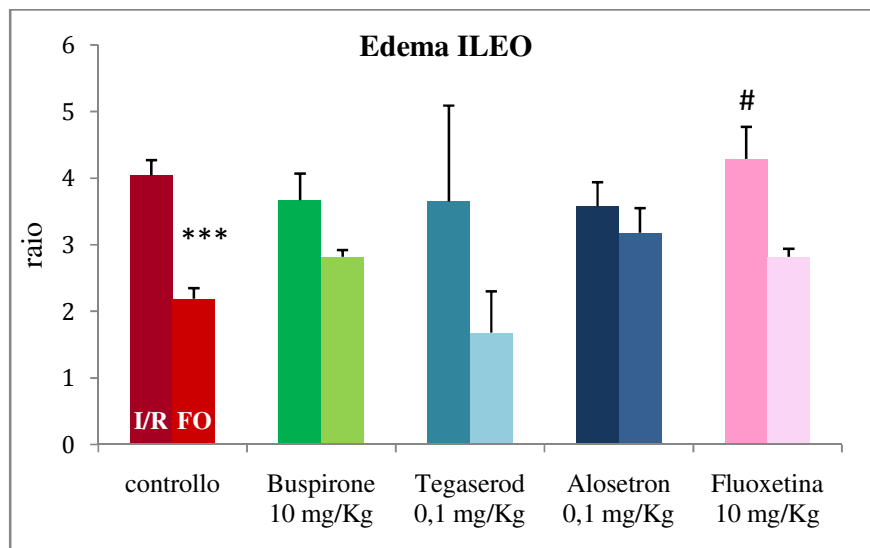


Figura 24. Edema tissutale misurato nel tratto dell'ileo in topolini I/R e FO trattati con fisiologica, Buspirone e Fluoxetina (10 mg/Kg), Tegaserod e Alosetron (0.1 mg/Kg).
 *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$; FO rispetto corrispondente gruppo I/R; # $P < 0.05$ gruppo I/R trattato farmacologicamente vs gruppo I/R controllo (ANOVA two way, Bonferroni's post test).

Per quanto riguarda infine l'edema misurato nella sezione centrale del colon, il nostro modello di I/R mesenterica non assicura un significativo incremento della permeabilità vasale rispetto ai corrispettivi animali FO. Questa risposta infiammatoria inferiore rispetto ai tratti digiunale e ileale precedentemente indagati, può essere attribuita ad un'irrorazione solo parziale dell'ultimo tratto colonico da parte dell'arteria mesenterica superiore.

Anche relativamente alla permeabilità vasale misurata nell'ultimo tratto colico (**Fig. 25**), nessuno dei trattamenti analizzati ha apportato significativa variazione della ratio rispetto al gruppo controllo.

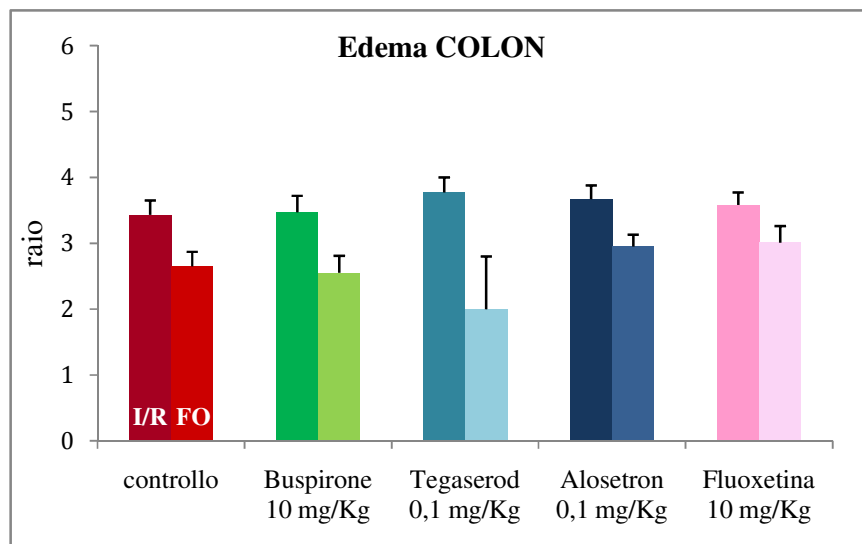


Figura 25. Edema tissutale misurato nel tratto del colon in topolini I/R e FO trattati con fisiologica, Buspirone e Fluoxetina (10 mg/Kg), Tegaserod e Alosetron (0.1 mg/Kg).

ATTIVITA' MIELOPEROSSIDASICA

Il pre-trattamento con agonista parziale 5-HT_{1A} buspirone previene significativamente l'incremento dell'attività dell'enzima Mieloperossidasi indotto da I/R.

L'attività della Mieloperossidasi (MPO), enzima rilasciato dai neutrofili attivati in risposta all'infiammazione indotta da I/R mesenterica, è stata misurata nel digiuno (U/g tessuto secco) come indicatore del processo di reclutamento dei PMNs.

Lo stato infiammatorio conseguente l'occlusione mesenterica di 45' rivela una massiccia attivazione leucocitaria (27.5 ± 5.61 U MPO/g tess. secco; $P < 0.001$) rispetto ai topolini sottoposti alla sola esposizione del tessuto intestinale (1.62 ± 0.78 U MPO/g tess. secco) (**Fig. 26**).

In accordo con quanto osservato per l'edema digiunale, il trattamento con buspirone 10 mg/kg contrasta l'attivazione linfocitaria, in quanto riduce (54.6%, $P < 0.05$) i livelli di MPO intestinale nei topolini ischemizzati (12.48 ± 4.32 U MPO/g tess. secco) rispetto al gruppo I/R trattato con fisiologica.

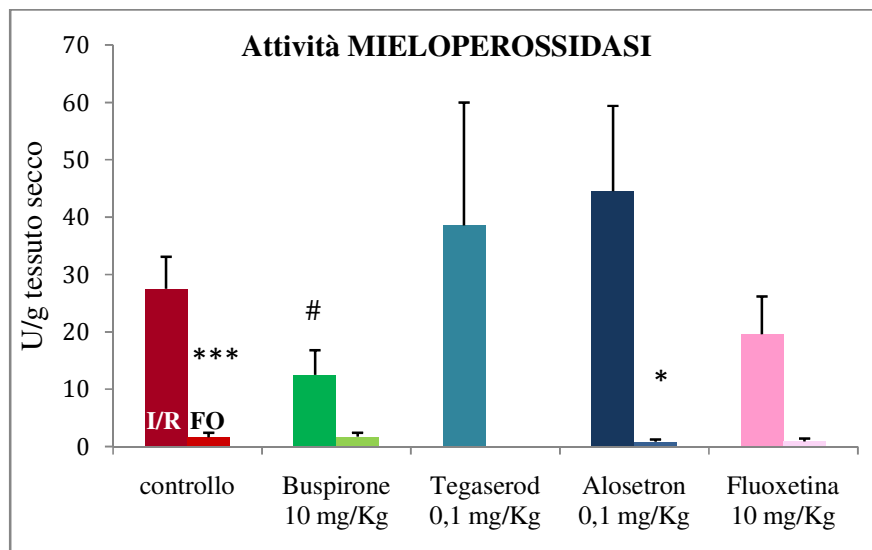


Figura 26. Attività mieloperossidasi misurata nel tratto del digiuno in topolini I/R e FO trattati con fisiologica, Buspirone e Fluoxetina (10 mg/Kg), Tegaserod e Alosetron (0.1 mg/Kg).
 *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$; FO rispetto corrispondente gruppo I/R; # $P < 0.05$ gruppo I/R trattato farmacologicamente vs gruppo I/R controllo (ANOVA two way, Bonferroni's post test).

All'analisi statistica gli altri trattamenti considerati non rivelano alcuna significativa differenza rispetto al gruppo I/R controllo: si osserva debole tendenza riduttiva dei livelli di MPO a seguito di trattamento con Fluoxetina, mentre, per quanto riguarda l'agonista parziale 5-HT₄ e l'antagonista 5-HT₃, la notevole variabilità osservata rende comunque difficoltosa l'interpretazione del dato.

DOSAGGIO MALONDIALDEIDE

Il pre-trattamento con agonista parziale 5-HT_{1A} buspirone limita in modo statisticamente rilevante i processi ossidativi legati alla produzione di ROS nei topi I/R.

La Malondialdeide (MDA), prodotto del processo di perossidazione lipidica, rappresenta un importante indice ileale di stress ossidativo associato alla formazione di specie radicaliche altamente reattive.

Come già osservato per gli altri parametri, l'insulto ischemico applicato (gruppo I/R) è responsabile anche di un notevole incremento dei processi ossidativi (700.7 ± 127 nmol MDA/g tessuto secco), poiché aumenta in modo rilevante ($P < 0.001$) i livelli di MDA rispetto ai corrispondenti animali FO (192.1 ± 40.2 nmol MDA/g tessuto secco) (**Fig. 27**).

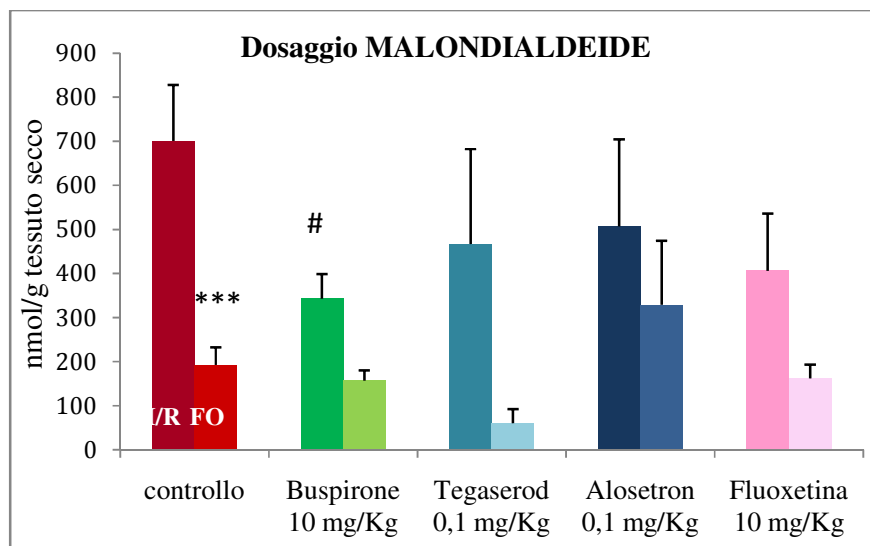


Figura 27. Quantificazione della Malondialdeide nel tratto dell'ileo in topolini I/R e FO trattati con fisiologica, Buspirone e Fluoxetina (10 mg/Kg), Tegaserod e Alosetron (0.1 mg/Kg).

*** $P < 0.001$, FO rispetto corrispondente gruppo I/R; # $P < 0.05$ gruppo I/R trattato farmacologicamente vs gruppo I/R controllo (ANOVA two way, Bonferroni's post test).

Nei tessuti ileali prelevati da topolini trattati con agonista parziale 5-HT_{1A}, 5' prima dell'occlusione mesenterica, si osserva una riduzione importante dei livelli di MDA (343±55.6 nmol MDA/g tessuto secco, P<0.05) rispetto al gruppo controllo di riferimento.

In accordo con quanto già osservato, gli altri trattamenti farmacologici invece non apportano alcun reale cambiamento dello stress ossidativo rilevato negli animali ischemizzati trattati con solo veicolo; i trattamenti con Alosetron e Tegaserod, nuovamente, sono caratterizzati da una maggior variabilità rispetto agli altri trattamenti.

TRANSITO GASTROINTESTINALE (GIT)

Nessun trattamento in studio modifica il transito gastrointestinale rispetto al gruppo I/R controllo.

Allo scopo di valutare le eventuali alterazioni motorie intestinali conseguenti a I/R è stato valutato il transito gastrointestinale attraverso somministrazione orale di un marker non assorbibile (10% carbone vegetale e al 5% gomma arabica in soluzione fisiologica) (*Puig et al., 2000*).

Come osservato in **Tab.3** risulta che il modello sperimentale proposto (I45'/R5h) non permette di rilevare differenze nel transito gastrointestinale, espresso come % della lunghezza dell'intestino percorsa dal colorante non assorbibile, tra i gruppi I/R e FO controllo. Questo risultato si differenzia da quanto osservato in un modello sperimentale di I/R mesenterica che prevedeva un periodo ripperfusivo di 24 ore: in seguito alla risoluzione di gran parte delle alterazioni acute nel gruppo dei FO, il transito gastrointestinale nei topolini ischemizzati risultava, infatti, statisticamente più lento rispetto agli animali FO (*Barocelli et al., 2006; Bertoni et al., 2007*). Questa differenza non è osservabile nel presente modello nel quale il transito gastrointestinale dei topi FO risulta rallentato tanto quanto quello degli animali sottoposti a I/R probabilmente come conseguenza del perdurare degli effetti associati alla fase postanestetica.

In generale i risultati ottenuti a seguito dei diversi trattamenti farmacologici sia nei gruppi falsi operati che in quelli sottoposti a successiva I/R non indicano alcuna differenza che assuma significato in termini statistici.

Transito GASTROINTESTINALE (%)

	controllo	Buspirone 10 mg/Kg	Tegaserod 0,1 mg/Kg	Alosetron 0,1 mg/Kg	Fluoxetina 10 mg/Kg
gruppo I/R	38,5±6,1	24,3±2,7	22,3±5,8	47,4±5,7	52±8,2
gruppo FO	35,4±6,3	51,7±3,5*	25,8±6,1	45,2±9,1	43,7±4,6

Tabella 3. Transito GI % misurato in topolini I/R e FO trattati con fisiologica, Buspirone e Fluoxetina (10 mg/Kg), Tegaserod e Alosetron (0.1 mg/Kg).

* $P < 0.05$; FO rispetto corrispondente gruppo I/R (ANOVA two way, Bonferroni's post test).

In tutti i parametri infiammatori presi in considerazione in questa prima parte del lavoro, edema intestinale, attività mieloperossidasi nel digiuno, livelli di malondialdeide nell'ileo e transito GI, nessun trattamento farmacologico ha determinato una evidente variazione statistica nelle risposte misurate rispetto agli animali FO trattati con soluzione fisiologica.

CONCLUSIONI (I)

In questa prima parte della ricerca attraverso l'uso di alcuni ligandi serotoninergici selettivi è stato possibile dimostrare l'intervento protettivo del buspirone nei confronti del danno infiammatorio locale scatenato acutamente da I/R intestinale.

La somministrazione intravenosa di buspirone ha infatti ridotto in modo marcato l'edema e il reclutamento linfocitario del tratto digiunale e i livelli di MDA nell'ileo.

A differenza del Buspirone, noto ansiolitico attualmente in fase di studio come pro cinetico nel trattamento della dispepsia (*Chial et al., 2003*), Tegaserod e Alosetron, farmaci ampiamente utilizzati nella terapia di altre patologie croniche intestinali, rispettivamente legate a ipo- (IBS-C) o ipermotilità (IBS-D) e l'antidepressivo Fluoxetina, spesso associato ad anti-infiammatori o modulatori della motilità, nel trattamento di IBS, IBD o morbo di Crohn, non hanno manifestato effetti di difesa.

In letteratura sono riportati effetti protettivi da stimolazione 5-HT₄, ad opera della Mosapride, in un modello di flogosi intestinale come l'ileo postoperatorio indotto da manipolazione chirurgica (*Tsuchida et al., 2011*). Ratti trattati con Mosapride per via sottocutanea dopo manipolazione intestinale, mostrano infatti ridotti livelli di MPO e di citochine, quali TNF α e IL-1 β , oltre a minori alterazioni motorie caratteristiche del modello, rispetto a corrispettivi animali controllo. Questi effetti protettivi, attribuiti alla attivazione 5-HT₄, recettore con ruolo facilitatorio localizzato a livello presinaptico sui neuroni colinergici mienterici, sono stati ricondotti ad aumentato rilascio di acetilcolina, stimolazione del recettore nicotinico $\alpha 7$, espresso sui macrofagi mienterici, residenti a livello mucosale e muscolare, che risultano inibiti a causa del blocco della trascrizione genica controllata dal fattore NF-kB (*Tsuchida et al., 2011*).

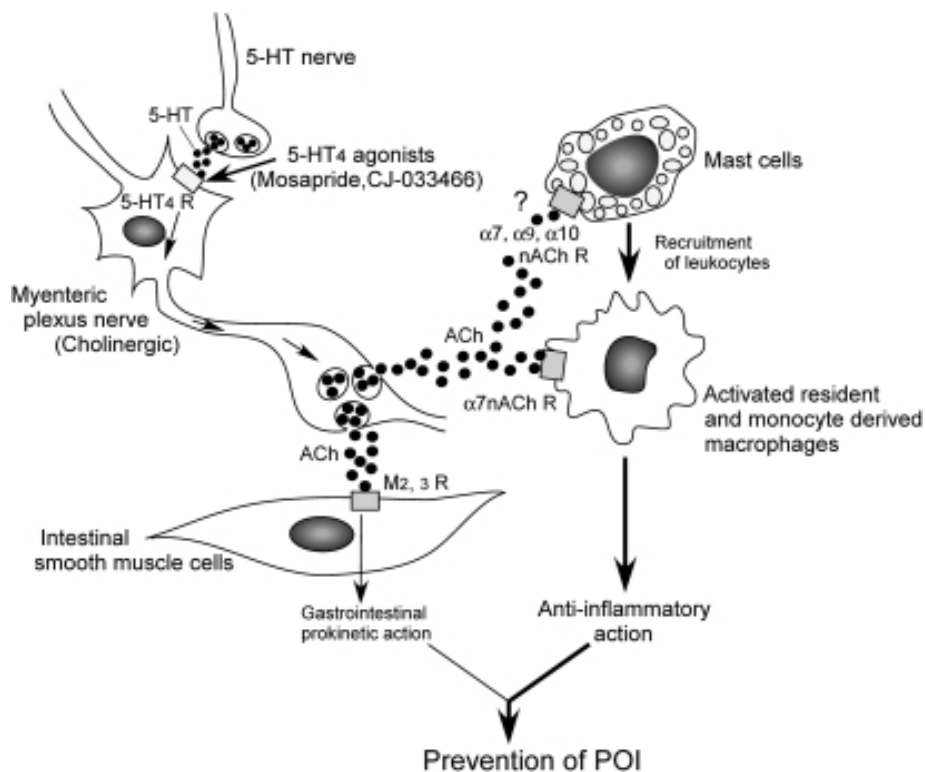


Figura 28. Meccanismo antinfiammatorio indotto da stimolazione 5-HT₄ (Tsuchida et al., 2011).

Applicando la stessa via e tempistica di somministrazione (i.v., 5' pre-I) proposta per tutti i trattamenti farmacologici fin ora testati, considerando la natura di agonista parziale, nei confronti dei recettori 5-HT₄, del Tegaserod abbiamo somministrato l'agonista pieno 5-HT₄ Mosapride 1 mg/kg e, al termine della fase di riperfusione, oltre alla quantificazione del danno locale tramite misurazione dell'essudato infiammatorio, dell'infiltrazione linfocitaria, dello stress ossidativo a carico delle membrane cellulari, sono stati anche dosati i livelli delle citochine plasmatiche TNF α e IL-1 β .

L'indagine è stata completata valutando gli effetti derivanti dal blocco recettoriale, prodotto per somministrazione dell'antagonista 5-HT₄ GR125487 5 mg/kg, sempre per via intravenosa prima dell'occlusione della SMA.

Entrambi i trattamenti analizzati non hanno modificato significativamente la risposta infiammatoria caratteristica del gruppo I/R controllo, l'agonista 5-HT₄ si è rivelato efficace solo nel contrastare l'incremento dell'essudato infiammatorio indotto nel digiuno da insulto ischemico di 45'.

Dai dati ottenuti non emerge quindi un fondamentale coinvolgimento del recettore 5-HT₄ nel modello murino di I/R mesenterica adottato, in parte a causa di una diffusa distribuzione del recettore, a livello muscolare e neuronale, che rende la sua caratterizzazione probabilmente più difficoltosa.

Il completo effetto protettivo descritto nel modello di ileo postoperatorio per la Mosapride, non osservato nell'I/R mesenterica, può essere giustificato considerando che lo stato infiammatorio presente in quest'ultima circostanza è di minore entità rispetto alla risposta infiammatoria innescata da occlusione mesenterica nel modello di I/R, caratterizzato da una complessa attivazione di mediatori lesivi locali e sistemici.

Il dato più significativo emerso in questa fase di studio è sicuramente la protezione dimostrata dal trattamento con Buspirone. Il meccanismo alla base dell'effetto protettivo esercitato dal Buspirone rimane da chiarire. E' noto che la stimolazione del recettore 5-HT_{1A} svolge un effetto neuroprotettivo contro il danno indotto da ischemia cerebrale in diversi modelli sperimentali in vitro ed in vivo (*Salazar-Colocho et al., 2007; Prehn et al., 1993; Piera et al., 1995*). Tuttavia in letteratura sono riportate evidenze contrastanti sugli effetti prodotti da Buspirone che viene talora descritto come inattivo (*Piera et al., 1995*) oppure come agente efficace nel prevenire il neuro danno causato da transitoria occlusione dell'arteria carotide mediana (*Kamei et al., 2001*). Queste differenze possono trovare spiegazione nel diverso dosaggio o nella diversa specie animale utilizzata nei due tests e tenendo presente che il Buspirone stesso presenta un profilo farmacologico complesso. Esso infatti viene descritto come un agonista parziale 5-HT_{1A} (*Kamei et al., 2001*), trasformato per un 25-30% in un metabolita attivo 1-PP (1-(2-pirimidinil)-piperazina) ancora dotato di attività agonista parziale verso i recettori 5-HT_{1A} e di debole attività alfa₂ antagonista (*Zuideveld et al., 2002*). La somministrazione di Buspirone, come di altri agonisti pieni 5-HT_{1A}, provoca, in ratti e topi, ipotermia di origine centrale, associata a ridotta liberazione di serotonina per attivazione degli autorecettori inibitori 5-HT_{1A} localizzati sui corpi cellulari dei neuroni serotoninergici del nucleo del rafe (*Millan 1993, Bill et al., 1991, Martin et al., 1992*). Nel corso di ischemia cerebrale si registra una ipertermia che viene attenuata proprio dagli agonisti 5-HT_{1A}. In realtà questo effetto ipotermizzante non sembra essere il principale responsabile dell'attività neuroprotettiva poiché comuni ipotermizzanti non esplicano effetti neuroprotettivi. Altri meccanismi

sono stati chiamati in causa per giustificare l'attività di protezione dal danno ischemico cerebrale prodotta dalla stimolazione 5-HT_{1A} come, ad esempio, una maggiore produzione di BDGF e l'inibizione dell'espressione di unità proteiche dei recettori NMDA (*Salazar Colacho et al., 2008*).

Anche se è stato suggerito che una moderata ipotermia potrebbe contribuire a ridurre il danno tissutale dovuto alla formazione locale di specie radicaliche dell'ossigeno durante I/R intestinale attraverso il mantenimento della sintesi di GSH detossificante (*Kimura et al., 2009*), sembra che in realtà questo non possa essere considerato il meccanismo primario della protezione offerta da Buspirone che, nel presente modello sperimentale, non ha provocato variazioni significative della temperatura corporea negli animali trattati rispetto agli animali controllo sottoposti a I/R.

Va tenuto presente che i recettori 5-HT_{1A}, che dovrebbero rappresentare il bersaglio principale del Buspirone, sono ampiamente espressi a livello intestinale, nei corpi cellulari di neuroni dei due plessi mienterico e sottomucoso, sulle cellule EC contenenti serotonina (*Kirchgeßner et al., 1996*) e su cellule immunocompetenti, dai linfociti (*Sempere et al., 2004*) ai mastociti (*Kushnir-Sukhov et al., 2006*), ai macrofagi (*Freire-Garabal et al., 2003*). La loro attivazione promuove la migrazione e adesione dei mastociti, la proliferazione dei linfociti T e la produzione di citochine, come IL-2 (*Aune et al., 1994*), come pure l'attività di fagocitosi macrofagica, effetti prevenuti da antagonisti 5-HT_{1A} specifici. E' infatti descritto che l'inibizione del recettore 5-HT_{1A} induce azione anti-proliferativa e anti-infiammatoria, attraverso un meccanismo legato ad aumento dei livelli intracellulari di cAMP con fosforilazione delle chinasi ERK1/2 e del fattore Akt e inibizione della trascrizione mediata da NF-kB.

Va considerato che nell'I/R vengono liberate grandi quantità di serotonina, come documentato dal lavoro di Teramoto e collaboratori (*Teramoto et al., 1998*), e confermato anche da precedenti studi condotti nei nostri laboratori attraverso tecnica immunoenzimatica ELISA. Infatti in segmenti di ileo prelevati da animali sottoposti a procedura ischemica, seguita da riperfusione, sono stati misurati livelli di 5-HT superiori (3157.6±294.2 ng/g tessuto secco) rispetto ai campioni collezionati da topi FO (2296.7±286.6 ng/g tessuto secco).

Tenendo conto della natura di agonista parziale del Buspirone (*Kamei et al., 2001*) sembra ragionevole ipotizzare che il meccanismo alla base della sua azione protettiva

possa dipendere non tanto dalla stimolazione dei recettori 5-HT_{1A} quanto piuttosto dalla sua capacità di antagonizzare gli effetti 5-HT_{1A}-dipendenti della serotonina così massicciamente presente nei tessuti intestinali postischemici.

SCOPO DELLA RICERCA (II)

Valutazione del meccanismo d'azione dell'agonista parziale 5-HT_{1A} Buspirone.

Considerando gli effetti protettivi ottenuti in seguito a somministrazione dell'agonista parziale 5-HT_{1A} Buspirone, l'attività di ricerca è proseguita con l'obiettivo di caratterizzare il meccanismo d'azione recettoriale responsabile dei suoi effetti anti-infiammatori.

Utilizzando lo stesso modello sperimentale di I/R mesenterica nel topolino (I45'/R5h), è stato confrontato l'insieme degli effetti prodotti da Buspirone (10 mg/Kg i.v.), con quelli prodotti da specifici ligandi selettivi 5-HT_{1A}: l'agonista 8-OH-DPAT e l'antagonista WAY100135, al fine di attribuire agli effetti mediati dall'agonista parziale Buspirone una specifica azione di attivazione o inibizione recettoriale 5-HT_{1A}.

Al termine delle 5h di riperfusione, oltre all'analisi di alcuni dei parametri infiammatori già indagati nella prima sezione, l'entità dell'edema intestinale (digiuno e ileo), i processi legati allo stress ossidativo nell'ileo e reclutamento linfocitario nel digiuno, è stata quantificata, nel plasma, l'isoforma inducibile dell'enzima citoprotettivo eme-ossigenasi (HO-1) (*Katori et al., 2002*).

PROTOCOLLO SPERIMENTALE (II)

A ciascun gruppo sperimentale (**gruppo I/R e FO**) è stato somministrato uno dei seguenti trattamenti farmacologici:

- Soluzione fisiologica (1 ml/kg), i.v. 5 minuti prima dell'occlusione mesenterica (**gruppo CONTROLLO**)
- **Buspirone (10 mg/kg)**, i.v. 5 minuti prima dell'occlusione mesenterica
- **8-OH-DPAT (1 mg/kg)**, i.v. 5 minuti prima dell'occlusione mesenterica
- **WAY100135 (5 mg/kg)**, i.v. 5 minuti prima dell'occlusione mesenterica

I dosaggi dei ligandiserotoninergici sono stati identificati sulla base di dati riportati in letteratura, che documentassero efficacia nella specie animale utilizzata, senza comparsa di effetti tossici.

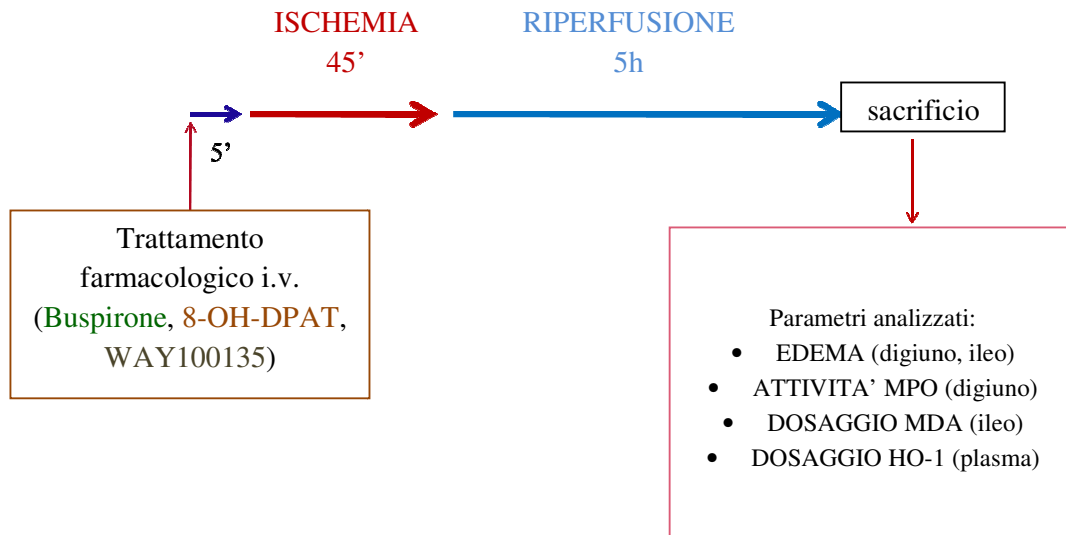


Figura 29. Schema del protocollo sperimentale.

RISULTATI (II)

EDEMA INTESTINALE

Il pre-trattamento con agonista parziale 5-HT_{1A} buspirone riduce efficacemente l'edema nel digiuno e nell'ileo, in modo confrontabile con quanto osservato per l'antagonista WAY100135.

La temporanea occlusione mesenterica di 45' seguita da 5h di riperfusione induce, in entrambi i tratti intestinali analizzati (digiuno e ileo), un significativo incremento ($P<0.001$) dell'edema tissutale rispetto ai corrispondenti gruppi FO (ratio digiuno: 3.83 ± 0.15 vs 2.58 ± 0.09 ; ratio ileo: 4.26 ± 0.22 vs 2.39 ± 0.09) (**Figg. 30-31**).

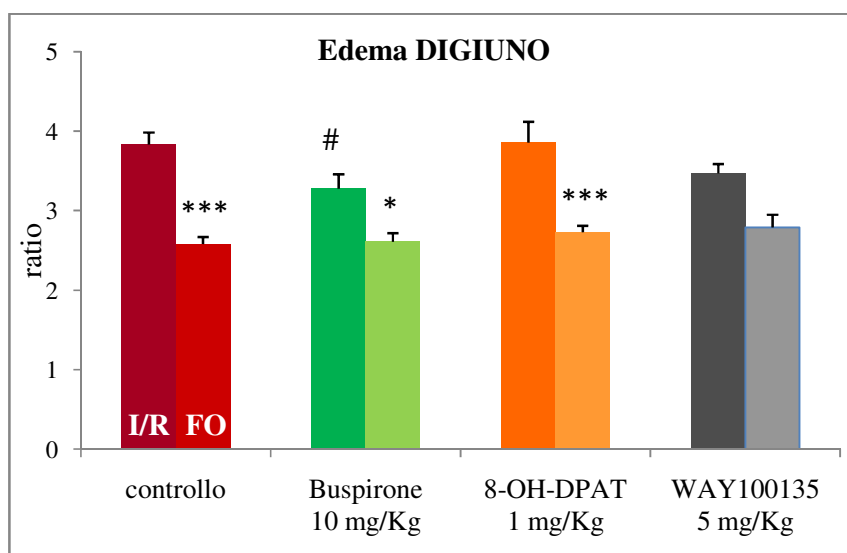


Figura 30. Edema tissutale misurato nel tratto del digiuno in topolini I/R e FO trattati con fisiologica, Buspirone (10 mg/Kg), 8-OH-DPAT (1 mg/Kg) e WAY100135 (5 mg/Kg).

*** $P<0.001$, * $P<0.05$; FO rispetto corrispondente gruppo I/R; # $P<0.05$ gruppo I/R trattato farmacologicamente vs gruppo I/R controllo (ANOVA two way, Bonferroni's post test).

Il pre-trattamento intravenoso con l'agonista parziale 5HT_{1A} Buspirone limita significativamente ($P<0.05$) l'aumento del contenuto d'acqua sia a livello del digiuno (ratio: 3.28 ± 0.18) che dell'ileo (ratio: 3.56 ± 0.24).

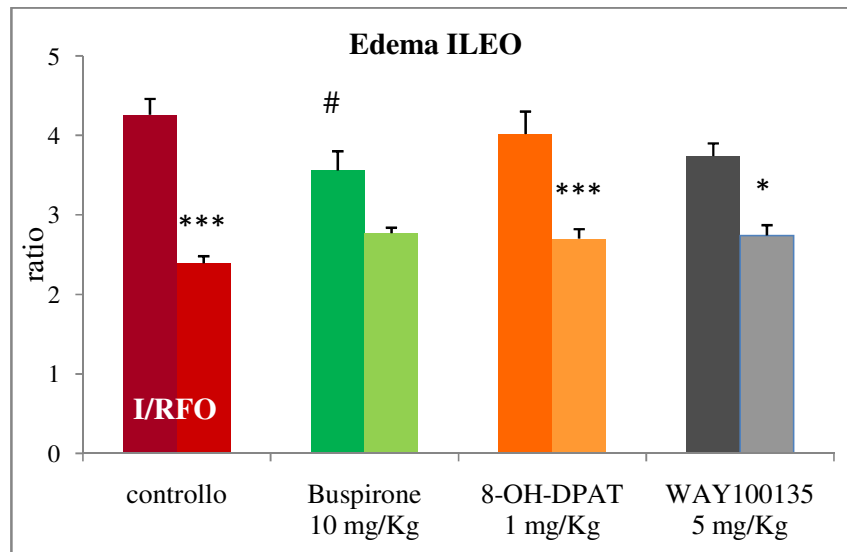


Figura 31. Edema tissutale misurato nel tratto del digiuno in topolini I/R e FO trattati con fisiologica, Buspirone (10 mg/Kg), 8-OH-DPAT (1 mg/Kg) e WAY100135 (5 mg/Kg).

*** $P<0.001$, * $P<0.05$; FO rispetto corrispondente gruppo I/R; # $P<0.05$ gruppo I/R trattato farmacologicamente vs gruppo I/R controllo (ANOVA two way, Bonferroni'a post test).

ATTIVITA' MIELOPEROSSIDASICA

Il pre-trattamento con agonista parziale 5-HT_{1A} buspirone riduce marcatamente l'attivazione dei PMNs nel digiuno, a differenza del corrispettivo antagonista.

La transitoria interruzione dell'apporto sanguigno al distretto intestinale determina inoltre una marcata attivazione leucocitaria, misurabile tramite incremento dei livelli digiunali di MPO (gruppo I/R: 22.58 ± 3.62 U/g tessuto secco) rispetto agli animali sottoposti alla sola esposizione tissutale (gruppo FO: 0.81 ± 0.33 U/g tessuto secco).

Come già osservato relativamente alla permeabilità vasale, risulta rilevante ($P < 0.01$) la riduzione protettiva dei livelli enzimatici nei topolini trattati con Buspirone 10 mg/kg (8.30 ± 2.74 U/g tessuto secco) (**Fig. 32**).

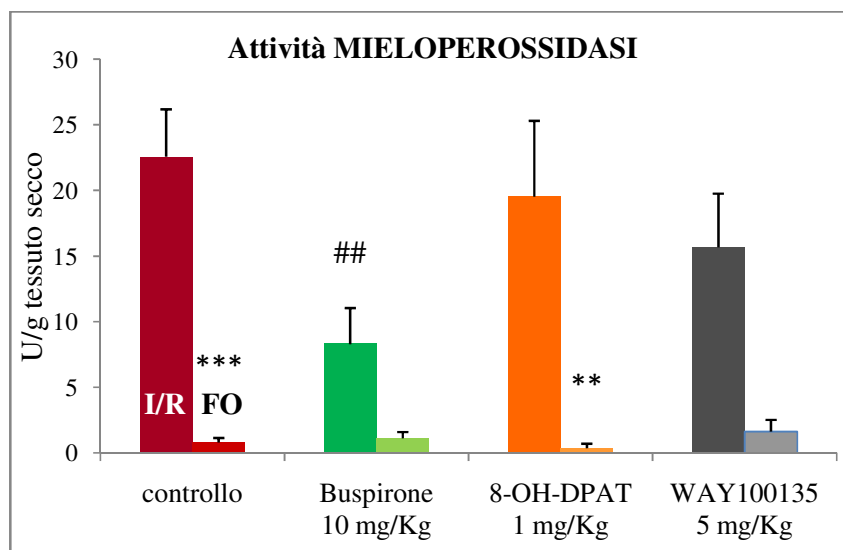


Figura 32. Attività mieloperossidasi misurata nel tratto del digiuno in topolini I/R e FO trattati con fisiologica, Buspirone (10 mg/Kg), 8-OH-DPAT (1 mg/Kg) e WAY100135 (5 mg/Kg).

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$; FO rispetto corrispondente gruppo I/R; ## $P < 0.01$ gruppo I/R trattato farmacologicamente vs gruppo I/R controllo (ANOVA two way, Bonferroni's post test).

Entrambi i trattamenti con 8-OH-DPAT e WAY100135, rispettivamente agonista e antagonista 5-HT_{1A}, non determinano alcuna effettiva modulazione del processo di reclutamento dei neutrofili caratteristico del gruppo controllo.

DOSAGGIO MALONDIALDEIDE

L' agonista parziale buspirone e l'antagonista 5-HT_{1A} WAY100135 riducono marcatamente lo stress ossidativo correlato alla produzione di ROS nell'ileo.

La produzione di specie radicaliche, processo caratteristico della fase iniziale di ri-perfusione, è quantificabile attraverso l'incremento massiccio ($P<0.001$) dei livelli di malondialdeide nell'ileo di topolini sottoposti a procedura ischemica (520.85 ± 167 nmol/g tessuto secco) rispetto agli animali FO di riferimento (167 ± 18 nmol/g tessuto secco).

Mentre nuovamente l'agonista 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT, al dosaggio di 1 mg/kg, non determina alcun effetto limitante lo stress ossidativo, sia l'agonista parziale Buspirone che l'antagonista 5-HT_{1A} WAY100135 riducono in modo rilevante (rispettivamente $P<0.01$ e $P<0.001$) i livelli intestinali di MDA rispetto al gruppo I/R di riferimento (**Fig. 33**).

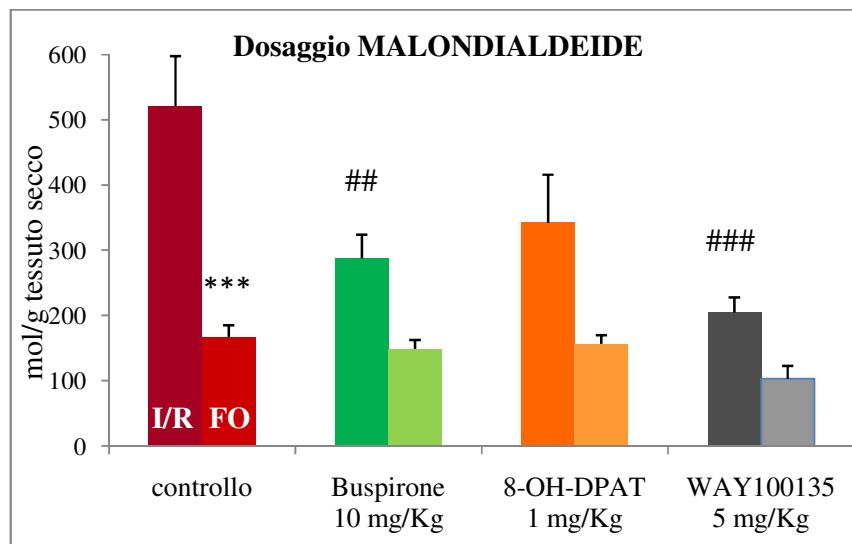


Figura 33. Quantificazione della Malondialdeide nel tratto dell'ileo in topolini I/R e FO trattati con fisiologica, Buspirone (10 mg/Kg), 8-OH-DPAT (1 mg/Kg) e WAY100135 (5 mg/Kg).
 *** $P < 0.001$, FO rispetto corrispondente gruppo I/R; ### $P < 0.001$, ## $P < 0.01$ gruppo I/R trattato farmacologicamente vs gruppo I/R controllo (ANOVA two way, Bonferroni's post test).

DOSAGGIO EME OSSIGENASI-1

L' agonista parziale buspirone e l'antagonista 5-HT_{1A} WAY100135 mostrano tendenza a ridurre i livelli di HO-1 nel plasma.

L'eme-ossigenasi-1 (HO-1), isoforma inducibile di un importante enzima microsomiale protettivo, catalizza la reazione di degradazione del gruppo eme, rilasciato dal gruppo prostetico di numerose emoproteine in risposta ad uno stato infiammatorio, producendo specie ad azione vasodilatatoria e anti-aggregante piastrinica come monossido di carbonio (CO), antiossidante come la Ferritina, chelante il Fe^{2+} , e biliverdina/bilirubina (BV) con conseguente riduzione della presenza di specie reattive dell'ossigeno e di richiamo dei neutrofili (Tsuchihashi *et al.*, 2004).

I livelli di questo enzima, quantificato nel plasma (ng/ml) tramite tecnica ELISA, sono marcatamente più elevati ($P < 0.05$) negli animali sottoposti a procedura ischemica e trattati con veicolo (gruppo I/R: 484.51 ± 73.51 ng/ml plasma), quando confrontati con i relativi topi FO (298.45 ± 22.2 ng/ml plasma) (**Fig. 34**). Questo risultato concorda con

osservazioni riportate da altri autori (*Park 2009*) e dimostra che il danno ossidativo cellulare, causato da I/R, ha portato ad aumentata espressione dell'enzima, importante fattore di difesa che opera per il mantenimento dell'omeostasi ossidativa cellulare. E' infatti noto che l'iperespressione di HO-1, attraverso una down-regulation delle molecole di adesione e della infiltrazione leucocitaria tissutale, controbilancia gli effetti citotossici, pro-ossidanti e pro-infiammatori causati dall'eme e dai ROS (*Lundvig et al., 2012*).

Anche se nessun trattamento modifica in modo statisticamente rilevante l'espressione enzimatica rispetto a quanto osservato nel gruppo I/R controllo, il pretrattamento con l'agonista parziale Buspirone o l'antagonista 5-HT_{1A} WAY100135 comporta una discreta riduzione dei livelli plasmatici di HO-1 (rispettivamente del 26.1% e 28.8%), indice di minor produzione radicalica. Al contrario, il trattamento con l'agonista totale 8-OH-DPAT fa registrare livelli plasmatici dell'enzima simili al gruppo I/R di riferimento.

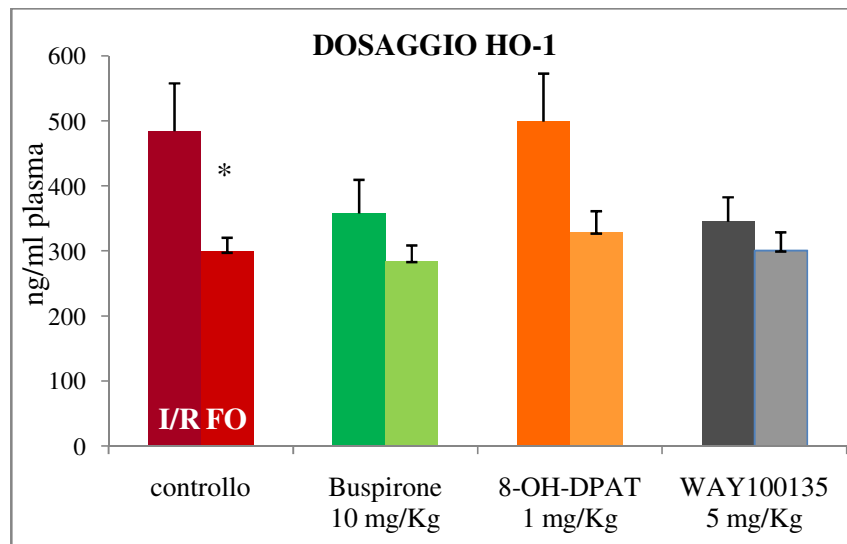


Figura 34. Quantificazione dell'eme- ossigenasi-1 nel plasma di topolini I/R e FO trattati con fisiologica, Buspirone (10 mg/Kg), 8-OH-DPAT (1 mg/Kg) e WAY100135 (5 mg/Kg).

* $P < 0.05$, FO rispetto corrispondente gruppo I/R; (ANOVA two way, Bonferroni's post test).

Infine, la somministrazione dei diversi ligandi 5-HT_{1A} in topolini FO non modifica la risposta infiammatoria (edema intestinale, quantificazione dell'attività linfocitaria, dei processi di lipoperossidazione e dosaggio dell'eme ossigenasi-1) rispetto ai corrispondenti FO trattati con soluzione fisiologica.

CONCLUSIONI (II)

I risultati ottenuti in questa seconda parte del progetto e la similitudine degli effetti anti-infiammatori prodotti da Buspirone e dall'antagonista WAY100135 indicano che l'attività protettiva nel limitare l'incremento della permeabilità vasale, dei livelli di MDA e dell'enzima HO-1 plasmatico, derivano dall'inibizione recettoriale 5-HT_{1A} e suggeriscono che tramite attivazione di questo specifico recettore la serotonina possa intervenire nel sostenere la risposta infiammatoria che si scatena nelle prime ore di riperfusione post-ischemica. Questa ipotesi è ulteriormente avvalorata considerando che l'attivazione del recettore 5-HT_{1A}, in seguito a trattamento con agonista 8-OH-DPAT, non modifica la risposta tissutale locale all'insulto ischemico.

Il mancato aumento dei livelli ematici di HO-1 a seguito del trattamento di topi I/R con Buspirone e WAY100635, rispetto agli animali sottoposti a I/R e fisiologica, suggerisce che i due composti riescono probabilmente ad ostacolare la formazione di specie radicaliche, l'aumento intracellulare delle concentrazioni di eme libero e di quei fattori di trascrizione, come Nrf2, NF-kB, Bach1, ritenuti capaci di innescare l'induzione dell'enzima citoprotettivo HO-1 (*Lundvig et al., 2012*) ma non sono induttori di HO-1, come altri agenti protettivi nei confronti del danno ischemico, ad esempio Octreotide (*Takano et al., 2012*), ketamina e glutamina (*Zhu et al., 2011*).

Il recettore 5-HT_{1A}, come già descritto, è localizzato a livello pre-sinaptico dove svolge importante azione modulatoria sul rilascio di serotonina e altri neurotrasmettitori, nei principali plessi neuronali mienterico e sottomucosale, e trova espressione anche in molte cellule infiammatorie coinvolte nella risposta tissutale attivata da I/R. L'assenza di effetti pro-infiammatori negli animali FO trattati con l'agonista 8-OH-DPAT suggerisce che il recettore 5-HT_{1A} coinvolto nelle condizioni di I/R sia soprattutto quello a localizzazione neuronale.

Si è così ipotizzato che il blocco recettoriale 5-HT_{1A} possa presumibilmente aumentare la disponibilità sinaptica di neurotrasmettitori con ruolo protettivo, anche se rimane ancora da indagare la natura della trasmissione neuronale che risulterebbe potenziata, e i

meccanismi che regolano gli effetti sulla modulazione dello stato infiammatorio indotto da I/R.

SCOPO DELLA RICERCA (III)

Valutazione della modulazione delle principali citochine pro-infiammatorie (TNF α e IL-1 β) da parte del Buspirone e dell'eventuale coinvolgimento del recettore $\alpha 7$ nACh nel meccanismo d'azione protettivo osservato per l'agonista parziale 5-HT_{1A}.

Alla luce degli effetti benefici associati all'inibizione del recettore 5-HT_{1A} nel danno da I/R mesenterica, si è approfondito lo studio del ruolo di questo sottotipo recettoriale nello stato infiammatorio ischemico.

Scopo di questa parte del lavoro di ricerca è stato così quello di valutare l'influenza del ligando 5-HT_{1A} Buspirone sulla produzione e sul rilascio di due importanti citochine (TNF α e IL-1 β) e di indagare l'eventuale coinvolgimento del recettore colinergico $\alpha 7$ nicotinico. Il recettore $\alpha 7$ nACh, infatti, oltre a rappresentare un importante target farmacologico per il trattamento di disturbi intestinali come IBS, IBD, ileo postoperatorio e morbo di Crohn, trova potenziale applicazione, come dimostrato dai numerosi studi già riportati, anche nella modulazione degli stati ischemici a carico di cuore, reni e fegato (*Sadis et al., 2007, Mioni et al., 2005*), anche se rimane ancora da valutarne il ruolo nell'ambito dell'I/R intestinale.

In particolare gli studi condotti su modelli di patologie infiammatorie intestinali suggeriscono un ruolo chiave di questo sottotipo recettoriale nicotinico nella risposta immunitaria regolata dai macrofagi, ampiamente distribuiti negli strati muscolare e mucosale della parete intestinale. Abbiamo così ipotizzato che anche nel nostro modello di I/R intestinale, tramite stimolazione $\alpha 7$ nicotinica, i macrofagi possano attivare le successive fasi della risposta infiammatoria, come il reclutamento linfocitario e la produzione di citochine.

L'ipotesi di un ruolo del recettore $\alpha 7$ nACh nel meccanismo d'azione protettivo osservato per il buspirone, deriva dalla possibile natura di etero-recettore per il recettore 5-HT_{1A}: l'inibizione del recettore 5-HT_{1A}, localizzato a livello presinaptico in neuroni colinergici dei plessi intestinali, incrementerebbe il rilascio di Ach, che tramite

attivazione del recettore $\alpha 7$ nicotinico espresso dai macrofagi residenti potrebbe ridurre la produzione di mediatori infiammatori, regolatori della risposta immunitaria all'insulto ischemico.

Per verificare questa ipotesi, topolini sottoposti alla stessa procedura ischemica utilizzata per gli studi precedenti (I45'/R5h) e corrispondenti falsi operati (gruppi I/R e FO), sono stati trattati con buspirone, con l'antagonista $\alpha 7$ selettivo Metillicaconitina (MLA) o con la loro associazione. I risultati ottenuti dagli animali trattati farmacologicamente sono stati confrontati sempre con la risposta del gruppo controllo, trattato con il solo veicolo.

In seguito alle 5h di riperfusione, i campioni prelevati dai diversi gruppi sperimentali sono stati analizzati per quantificare la risposta infiammatoria tramite valutazione di edema tissutale (digiuno e ileo), produzione di ROS nell'ileo (livelli MDA) e reclutamento dei PMNs nel digiuno (attività MPO). Oltre a questi parametri, sono stati misurati i livelli di TNF α e IL-1 β nel plasma tramite specifico kit ELISA.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE (III)

A ciascun gruppo sperimentale (**gruppo I/R e FO**) è stato somministrato uno dei seguenti trattamenti farmacologici:

- Soluzione fisiologica (1 ml/kg), i.v. 5 minuti prima dell'occlusione mesenterica (**gruppo CONTROLLO**)
- **Buspirone**(10 mg/kg), i.v. 5 minuti prima dell'occlusione mesenterica
- **MLA** (5 mg/kg), s.c. 30minuti prima dell'occlusione mesenterica
- **MLA** (5 mg/kg), s.c. 30 minuti prima dell'occlusione mesenterica + **Buspirone** (10 mg/kg), i.v. 5 minuti prima dell'occlusione mesenterica (**ASSOCIAZIONE**)

I dosaggi dei composti sono stati identificati sulla base di dati riportati in letteratura, che documentassero efficacia nella specie animale utilizzata, senza comparsa di effetti tossici.

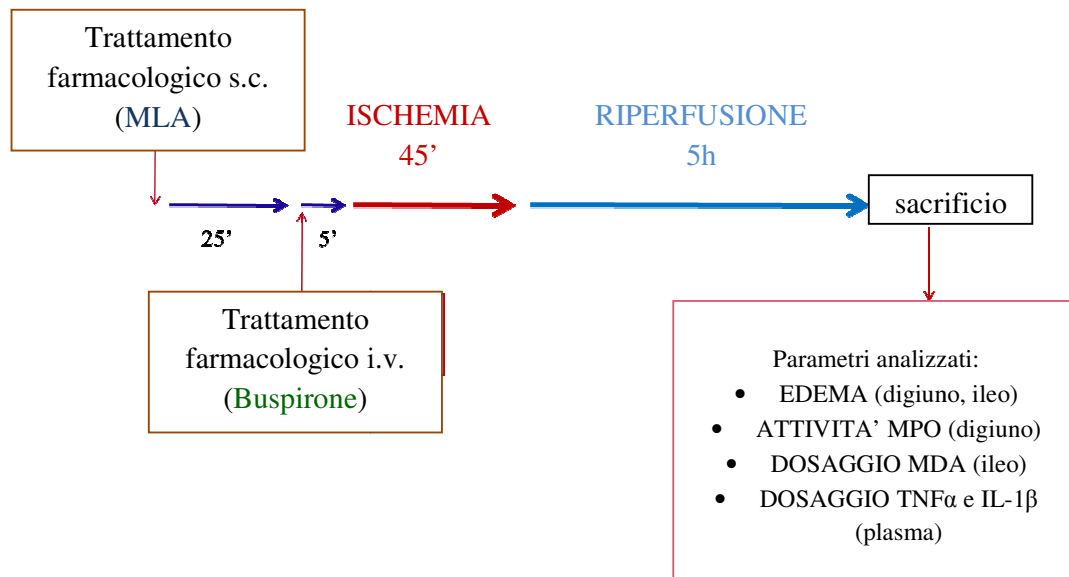


Figura 35. Schema del protocollo sperimentale.

RISULTATI (III)

EDEMA INTESTINALE

Il pretrattamento con MLA abolisce nel digiuno l'effetto anti-edema determinato dal Buspirone.

La condizione ischemica caratteristica del nostro modello sperimentale riconferma un incremento significativo dell'essudato infiammatorio espresso in ratio, sia nel digiuno (4.35 ± 0.29 , $P < 0.05$) che nell'ileo (4.76 ± 0.27 , $P < 0.05$), rispetto ai topolini FO (rispettivamente, ratio: 3.07 ± 0.25 e 3.02 ± 0.25) (**Figg. 36-37**).

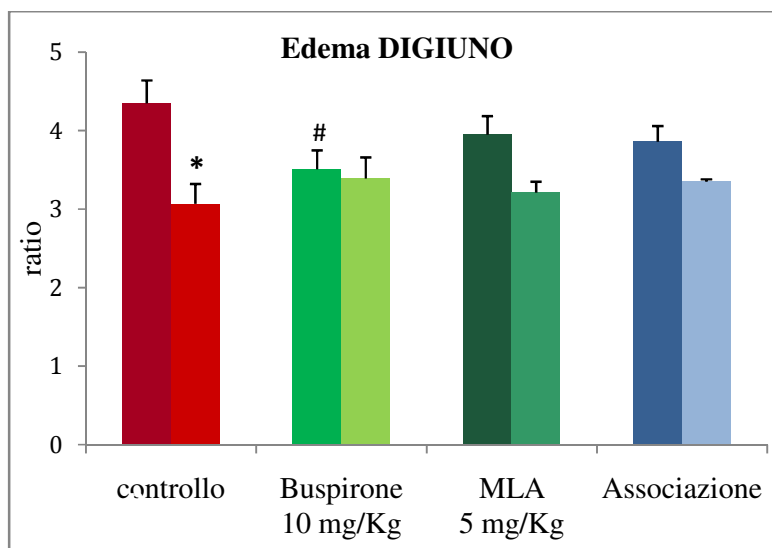


Figura 36. Edema tissutale misurato nel tratto del digiuno in topolini I/R e FO trattati con fisiologica, Buspirone (10 mg/Kg), MLA (5 mg/Kg) e loro associazione.

* $P < 0.05$; FO rispetto corrispondente gruppo I/R; # $P < 0.05$ gruppo I/R trattato farmacologicamente vs gruppo I/R controllo (ANOVA two way, Bonferroni's post test).

Nel digiuno, il trattamento farmacologico con agonista parziale 5-HT_{1A}, come già osservato, riduce in modo marcato ($P<0.05$) il contenuto d'acqua tissutale (ratio: 3.51 ± 0.24) rispetto al gruppo I/R controllo; questo effetto viene contrastato dal pretrattamento con MLA che riporta l'edema a valori (ratio: 3.86 ± 0.2) non statisticamente differenti rispetto al gruppo controllo. A differenza del Buspirone, la somministrazione del solo antagonista $\alpha 7$ nicotinico Metillicaconitina (MLA) non determina alcuna reale modulazione del parametro analizzato rispetto agli animali trattati con soluzione fisiologica.

Nell'ileo, il buspirone da solo o in associazione con MLA mostra solo la tendenza, non significativa, a ridurre la permeabilità vasale (ratio: 3.97 ± 0.265 e 4.05 ± 0.31 , rispettivamente). Questo effetto raggiunge valori significativi in termini statistici per MLA quando somministrato da solo ($P<0.05$, ratio: 3.74 ± 0.44).

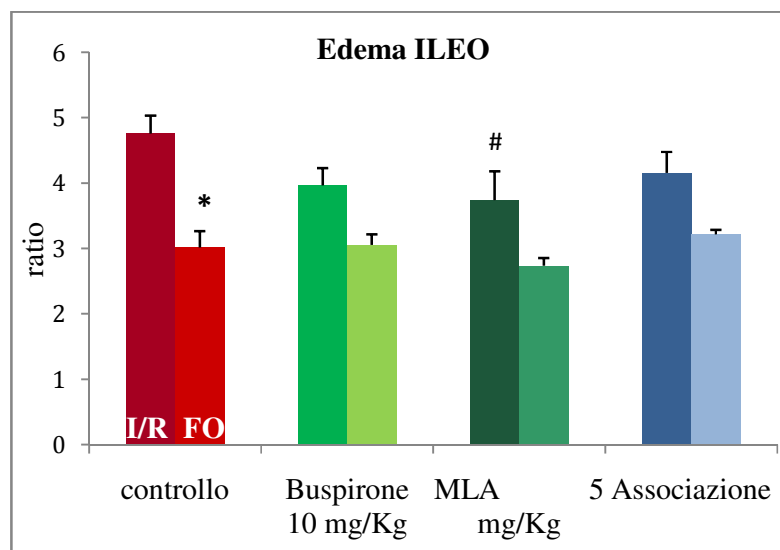


Figura 37. Edema tissutale misurato nel tratto dell'ileo in topolini I/R e FO trattati con fisiologica, Buspirone (10 mg/Kg), MLA (5 mg/Kg) e loro associazione.

* $P<0.05$; FO rispetto corrispondente gruppo I/R; # $P<0.05$ gruppo I/R trattato farmacologicamente vs gruppo I/R controllo (ANOVA two way, Bonferroni's post test).

ATTIVITA' MIELOPEROSSIDASI

La riduzione dell'attività mieloperossidasi da parte del Buspirone è abolita dall'antagonista $\alpha 7$ nicotinico.

La transitoria interruzione del circolo mesenterico nel gruppo controllo riconferma un significativo aumento dell'attività mieloperossidasi rispetto agli animali FO (48.14 ± 13 U/g vs 0.38 ± 0.2 U/g, $P < 0.05$). Il pre-trattamento con Buspirone riduce i livelli di MPO (15.75 ± 6.41 U/g, $P < 0.05$) rispetto al gruppo I/R controllo (**Fig. 38**). Questa inibizione viene antagonizzata dal pretrattamento con l'antagonista MLA (26.92 ± 8.51 U/g).

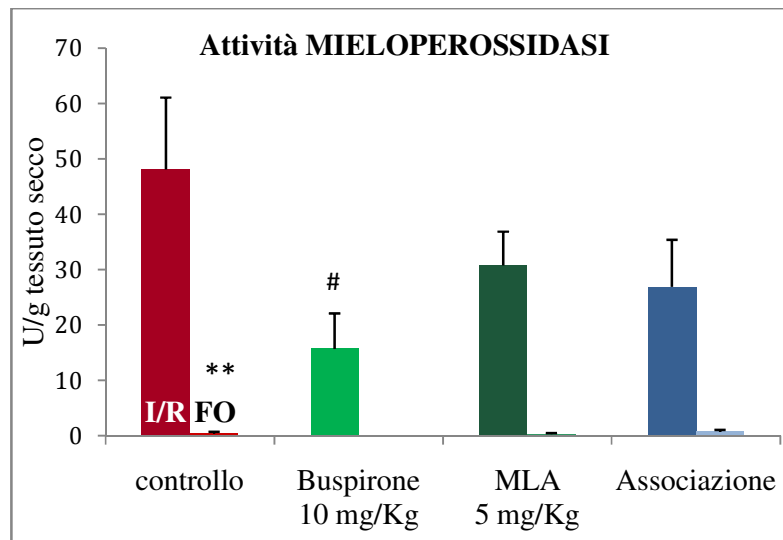


Figura 38. Attività mieloperossidasi misurata nel tratto del digiuno in topolini I/R e FO trattati con fisiologica, Buspirone (10 mg/Kg), MLA (5 mg/Kg) e loro associazione.

** $P < 0.01$; FO rispetto corrispondente gruppo I/R; # $P < 0.05$ gruppo I/R trattato farmacologicamente vs gruppo I/R controllo (ANOVA two way, Bonferroni's post test).

DOSAGGIO MALONDIALDEIDE

Scarsa riduzione dello stress radicalico rispetto al gruppo controllo per tutti i trattamenti farmacologici

I livelli ileali di MDA, superiori nel gruppo di topolini ischemizzati (334.32±40.24 vs 213.07±20.76 nmol/g) trattati con veicolo rispetto ai corrispondenti FO, risultano solo lievemente ridotti dal trattamento con Buspirone, a differenza di quanto osservato in tutte le altre sezioni della tesi (296.64±26.98 nmol/g). Anche l' MLA e la sua associazione con l'agonista parziale 5-HT_{1A} sembrano apportare un marginale effetto protettivo nei confronti dello stress ossidativo a carico delle membrane cellulari (rispettivamente 279.01±68.67 e 302.6736.23 nmol/g) (**Fig. 39**).

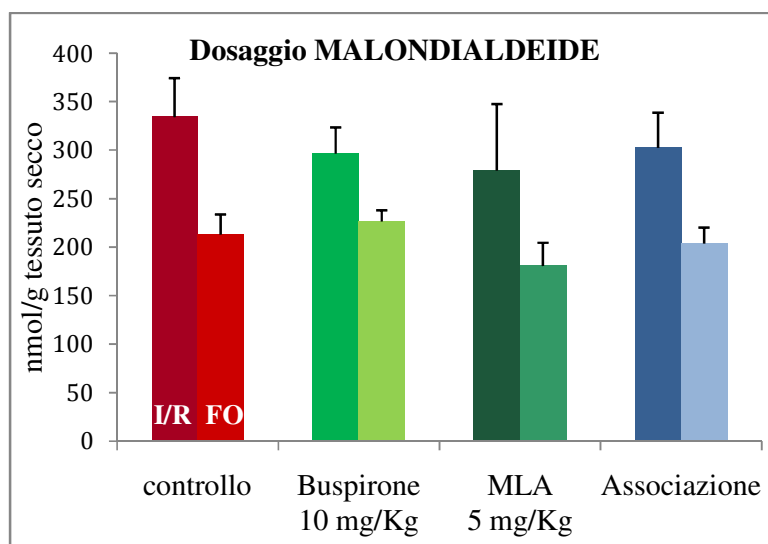


Figura 39. Dosaggio della Malondialdeide misurata nel tratto dell'ileo in topolini I/R e FO trattati con fisiologica, Buspirone (10 mg/Kg), MLA (5 mg/Kg) e loro associazione.

DOSAGGIO DELLE CITOCHINE PLASMATICHE

Tutti i trattamenti analizzati riducono in modo significativo i livelli di TNF α e IL-1 β nel plasma rispetto al gruppo I/R controllo.

Le citochine rappresentano fondamentali regolatori dell'interazione tra le varie cellule e intervengono nella risposta immunitaria e infiammatoria; tramite tecnica immunoenzimatica di tipo ELISA, sono state dosate il TNF α e l'IL-1 β nel plasma dei topolini appartenenti ai diversi gruppi sperimentali, come prime citochine ad azione locale e sistemica rilasciate dai monociti/macrofagi attivati durante l'evento acuto ischemico.

Topolini controllo, sottoposti a occlusione della SMA per 45', seguita da riperfusione di 5h, mostrano livelli di TNF α (16.64 ± 4.47 pg/ml) (**Fig. 40**) e IL-1 β (16.61 ± 2.72 pg/ml) (**Fig.41**) statisticamente superiori rispetto agli animali FO (rispettivamente, $P < 0.05$ e $P < 0.01$), in accordo con quanto osservato in precedenti studi (Souza et al., 2001, Kimizuka et al., 2004).

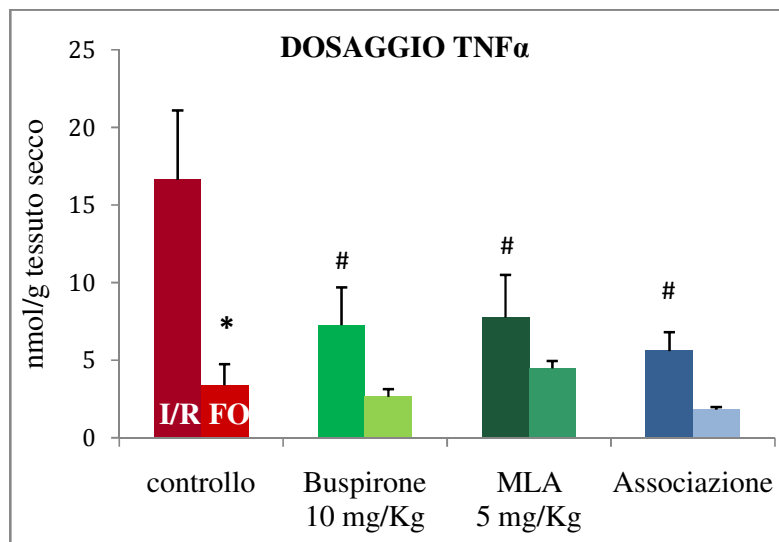


Figura 40. Livelli di TNF α misurati nel plasma di topolini I/R e FO trattati con fisiologica, Buspirone (10 mg/Kg), MLA (5 mg/Kg) e loro associazione.

* $P < 0.05$; FO rispetto corrispondente gruppo I/R; # $P < 0.05$ gruppo I/R trattato farmacologicamente vs gruppo I/R controllo (ANOVA two way, Bonferroni's post test).

Il trattamento con Buspirone, da solo o in associazione a MLA, e il trattamento con solo MLA comportano livelli marcatamente inferiori di entrambe le citochine analizzate (Buspirone: TNF α : 7.28 $\pm$ 2.62 pg/ml, P<0.05 e IL-1 β : 7.66 $\pm$ 1.89 pg/ml, P<0.01) (associazione: TNF α : 5.61 $\pm$ 1.21 pg/ml e IL-1 β : 8.92 $\pm$ 3.15, P<0.05) rispetto al controllo. Anche quando somministrato da solo 30' prima dell'occlusione mesenterica, l'antagonista $\alpha 7$ nicotinico mostra simile andamento protettivo nella modulazione delle citochine analizzate, riducendone il rilascio nel circolo sistemico in modo significativo (per TNF α : P<0.05, per IL-1 β : P<0.01).

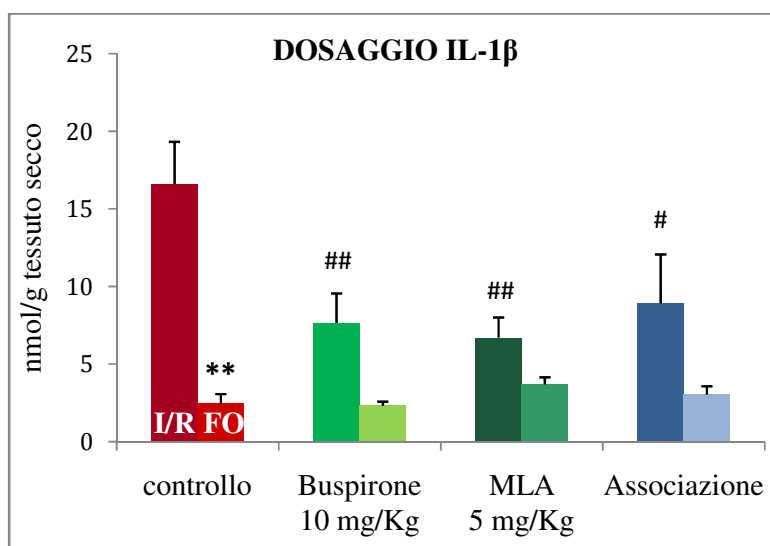


Figura 41. Livelli di IL-1 β misurati nel plasma di topolini I/R e FO trattati con fisiologica, Buspirone (10 mg/Kg), MLA (5 mg/Kg) e loro associazione.

** P<0.01 FO rispetto corrispondente gruppo I/R; # P<0.05, ## P<0.01 gruppo I/R trattato farmacologicamente vs gruppo I/R controllo (ANOVA two way, Bonferroni's post test).

Infine come per tutti i trattamenti farmacologici analizzati in questo lavoro di tesi, anche l'MLA, da solo o somministrato come pretrattamento al Buspirone, non modifica, nel gruppo FO, l'entità della risposta misurata per tutti i parametri considerati rispetto al gruppo FO controllo.

CONCLUSIONI (III)

Quest'ultima sezione del progetto di ricerca ha riconfermato per l'agonista parziale 5-HT_{1A} Buspirone un effetto protettivo nei confronti dell'edema intestinale e dei processi legati a reclutamento linfocitario e nella riduzione dei livelli plasmatici di TNF α e IL-1 β con un meccanismo parzialmente basato sulla interazione tra i sistemi serotoninergico e colinergico.

Infatti, l'antagonista $\alpha 7$ nicotinico MLA, somministrato per via sottocutanea, abolisce l'effetto inibitorio di Buspirone ma solo sulla formazione di essudato infiammatorio e reclutamento dei PMNs nel digiuno. L'edema e lo stress ossidativo dell'ileo e il rilascio delle citochine nel circolo sistemico sono invece ugualmente contrastati da Buspirone, associazione MLA-Buspirone o MLA somministrato da solo. Questi risultati sembrerebbero così confermare solo un parziale interessamento del recettore $\alpha 7$ nACh a seguito di inibizione 5-HT_{1A}.

La stimolazione farmacologica o elettrica della trasmissione vagale, tramite l'attivazione recettoriale $\alpha 7$ regola le funzioni immunitarie in numerose patologie infiammatorie a carico dell'intestino e in diversi modelli di I/R extraintestinali, ma in realtà, in modo simile alla nostra ricerca, anche in letteratura sono riportati esempi di risultati contraddittori.

La somministrazione giornaliera di nicotina (0.04-0.4 mg/kg), in un modello murino di colite indotta da somministrazione orale di destrano sodio solfato (DSS), riduce dopo 7 giorni l'attivazione del fattore NF-kB, i livelli tissutali di TNF α , IL-6 e IL-17 e l'edema colico. Nonostante questi dati le condizioni di salute degli animali (variazione ponderale) e le lesioni osservate all'analisi istologica non risultano migliorate. Invece il trattamento subcronico con agonisti $\alpha 7$ nicotinici sperimentali AR-R17779 (0.1-0.3-1-3-5 mg/Kg) e GSK1345038A (3-10-30 mg/Kg) migliora, alle dosi più alte, i parametri clinici della malattia, senza modificare l'andamento dei livelli delle citochine. La nicotina inoltre sembra apportare beneficio anche in un diverso modello di colite indotta per somministrazione intrarettale di acido trinitrobenzensolfonico (TNBS), mentre gli

stessi agonisti in studio non determinano alcun effetto anti-infiammatorio (*Snoek et al., 2010*).

Tali risultati sollevano dubbi sull'entità degli effetti benefici determinati da stimolazione $\alpha 7$, effetti che perciò sembrano influenzati da fattori sperimentali legati al differente modello prescelto, al dosaggio testato, alla via di somministrazione e alla gravità della patologia infiammatoria studiata.

L'efficacia sperimentale dei ligandi $\alpha 7$ emersa solo a dosaggi alti, presumibilmente accompagnati da una certa perdita di selettività recettoriale e la maggior efficacia terapeutica ottenuta per la nicotina, agonista $\alpha 7$ non selettivo, possono suggerire anche l'eventuale attivazione di altri recettori nicotinici, espressi dalle cellule immunitarie e a livello gastrointestinale.

Oltre al recettore $\alpha 7$ nicotino, i macrofagi intestinali esprimono anche il sottotipo nicotino $\alpha 4/\beta 2$, coinvolto nel processo di endocitosi e fagocitosi di agenti lesivi e prodotti di degradazione cellulare, tramite stimolazione della GTPasi Dinamina-2 che coordina il processo di formazione del fagosoma e l'internalizzazione delle vescicole. Uno studio condotto su colture di macrofagi peritoneali murini isolati, ha evidenziato un aumento della capacità fagocitaria, in seguito a stimolazione $\alpha 4/\beta 2$ con nicotina, effetto abolito dall'antagonista $\alpha 4/\beta 2$ selettivo diidro- β -eritroidina (DH β E) (*Van der Zanden et al., 2009*).

Anche la subunità $\alpha 5$ nicotina, espressa nel SNC e dall'epitelio gastrointestinale, sembra svolgere un ruolo importante nell'aumentare la suscettibilità all'infiammazione intestinale. Topolini knock out per questa subunità, sottoposti a induzione di colite tramite somministrazione orale di DSS per 7 giorni, sviluppano una risposta infiammatoria più severa, caratterizzata da maggior calo ponderale, attività mieloperossidasi colica e livelli di PGE₂ superiori, rispetto ai corrispondenti animali wild type usati come controllo. Nonostante sia ancora sconosciuta l'influenza della subunità $\alpha 5$ sull'interazione con acetilcolina, lo studio mostra come la sua presenza nella conformazione pentamerica possa regolare l'integrità epiteliale intestinale e la permeabilità tissutale (*Orr-Urtreger et al., 2005*).

Considerando così le evidenze sperimentali riportate, è riduttivo considerare il solo recettore $\alpha 7$ nACh mentre non si può escludere, anche nel modello di I/R intestinale adottato in questo lavoro, un coinvolgimento degli altri recettori $\alpha 4/\beta 2$ e $\alpha 5$.

Non sono generalmente riportati in letteratura dati circa gli effetti derivanti dalla sola somministrazione di MLA sui livelli delle citochine infiammatorie. Il nostro dato, inerente alla riduzione dei livelli plasmatici di citochine da parte dell'antagonista $\alpha 7$, sembra in accordo con quanto osservato in un modello murino di meningite batterica da *E.Coli*, in cui la somministrazione di MLA riduce significativamente i livelli di TNF α , IL-1 β e IL-6 nel fluido cerebrospinale e la migrazione dei PMNs studiata in vitro su cellule endoteliali microvascolari cerebrali (BMEC) di topo in coltura. D'altra parte, topolini knock out per il recettore $\alpha 7$ nACh non sviluppano le caratteristiche alterazioni della barriera ematoencefalica in risposta alla meningite. La protezione indotta da MLA risulterebbe correlata ad un blocco della trasmissione intracellulare dipendente dai livelli di Ca⁺², necessaria alla diffusione di E.Coli (*Chi et al., 2011*). Anche se risulta comunque difficoltoso un confronto di questi dati con quelli ottenuti dal nostro studio, i risultati descritti confermano che la modulazione $\alpha 7$ nella difesa immunitaria risulta sempre più complessa e diversificata a seconda della diversa tipologia di tessuto infiammato.

Il coinvolgimento colinergico è stato anche indagato valutando l'eventuale ruolo della trasmissione vagale nella modulazione dell'evento ischemico mesenterico. Oltre alla stimolazione farmacologica del recettore $\alpha 7$ nicotinico, infatti, a livello sperimentale sono stati ottenuti buoni risultati anche dalla stimolazione di tipo elettrica del nervo vago: in modelli di I/R cardiaca, per esempio, l'attivazione vagale previene la comparsa di gravi aritmie e di lesioni istologiche a carico ventricolare (*Mioni et al., 2005*), mentre nella milza riduce i livelli sierici di TNF α e l'infiltrato tissutale di PMNs conseguenti l'I/R (*Altavilla et al., 2006*). Secondo queste evidenze la componente afferente vagale trasmette al SNC informazioni riguardanti lo stato infiammatorio in periferia: le stesse citochine rilasciate localmente possono stimolare le fibre afferenti vagali e il complesso dorsale vagale (DVC) a livello cerebrale. Il DVC coordina così una risposta efferente diretta a limitare i danni infiammatori attraverso il rilascio di Ach e attivazione dei recettori nicotinici citati (*Pavlov et al., 2003*).

Il coinvolgimento della componente vagale è stata considerata, in modo preliminare, nel nostro laboratorio, effettuando, su topolini Swiss femmine, vagotomia subdiaframmatica totale prima dell'evento ischemico mesenterico (I45'/R5h), allo scopo di verificare un eventuale aggravamento della risposta infiammatoria all'ischemia

in concomitanza con l'assenza del controllo vagale. Purtroppo l'eccessiva mortalità, legata probabilmente alla manovra chirurgica di piloroplastica, necessaria per permettere agli animali vagotomizzati il corretto svuotamento gastrico, ha ridotto molto la numerosità dei gruppi sperimentali influenzando l'esito dei risultati, che rimangono tutt'ora non significativi.

E' stata anche simulata una risposta vagale, tramite somministrazione sistemica di 2-Deossiglucosio (2-DG), composto che, captato a livello cellulare, si comporta come falso metabolita della via metabolica glicolitica, inducendo un deficit energetico. Interferendo con i processi energetici fisiologici, il 2-DG induce uno stato di grave ipoglicemia che stimola la trasmissione vagale compensatoria enterica, volta a stimolare l'assorbimento gastrointestinale di sostanze nutritive. Il 2-DG, testato al dosaggio di 350 mg/kg per via sottocutanea, prima di I/R ha solo mostrato tendenza riduttiva dei livelli di MPO nel digiuno, senza modificare l'edema e lo stress radicalico rispetto al gruppo I/R di riferimento.

In questo studio ci siamo soffermati solamente alla valutazione dell'interessamento colinergico, senza considerare che gli effetti mediati dalle cellule immunitarie potrebbero anche essere regolati da recettori del sistema adrenergico di tipo β_2 , ugualmente espressi dai macrofagi intestinali. In modo simile al recettore α_7 nACh, l'attivazione β_2 riduce la risposta infiammatoria, inibendo il rilascio dei numerosi mediatori: agonisti selettivi come albutanolo e fenoterolo limitano in vitro la liberazione di TNF α e IL-8 da parte dei monociti umani THP-1, in presenza di stimolo endotossico da LPS. L'effetto è determinato da aumentati livelli citoplasmatici del fattore i-kB, promossa da specifici fattori di trascrizione CREB, che ostacola la traslocazione nucleare di NF-kB (*Farmer and Pugin, 2000*). Come per il recettore α_7 nACh, anche la modulazione β adrenergica risulta influenzata dal modello sperimentale adottato e da un complesso sistema di trasduzione del segnale intracellulare. Infatti, studi effettuati su linee cellulari murine di macrofagi (RAW 264.7) mostrano al contrario come, in assenza di stimolo flogistico, l'attivazione β_2 induca la sintesi di IL-1 β e IL-6 attraverso meccanismo dipendente dall'attivazione chinasi della famiglia ERK1/2 e fosforilazione dei fattori di trascrizione ATF-1 e ATF-2 (*Tan et al., 2007*).

In conclusione, la caratterizzazione funzionale serotoninergica di questo lavoro di dottorato, condotta nell'ambito dell'I/R mesenterica ha permesso di identificare nel

recettore 5-HT_{1A}, tra tutti i sottotipi recettoriali indagati, un promettente bersaglio su cui poter intervenire per modulare lo stato infiammatorio.

Il meccanismo d'azione alla base dei promettenti effetti benefici del Buspirone sembra essere il risultato della modulazione immunitaria indiretta, determinata da stimolazione neuronale della trasmissione colinergica, più che il risultato di antagonismo nei confronti del recettore 5-HT_{1A} espresso dalle cellule immunocompetenti.

I dati raccolti hanno evidenziato anche un parziale coinvolgimento del recettore $\alpha 7$ nACh nella protezione indotta da inibizione 5-HT_{1A} in seguito a somministrazione di Buspirone. Nonostante i risultati raggiunti, il meccanismo d'azione alla base dell'effetto protettivo del Buspirone è stato solo parzialmente caratterizzato: l'analisi condotta ha infatti introdotto nuovi quesiti inerenti la complessa interazione tra i sistemi serotoninergico e colinergico, che rimane tutt'ora da approfondire, alla luce della possibile modulazione delle funzioni immunitarie sia da parte di altri recettori nicotinici ($\alpha 4/\beta 2$ - e $\alpha 5$ nAChR) che del sistema adrenergico ($\beta 2$ R).

MATERIALI E METODI

Per questo studio è stato applicato un modello di ischemia/riperfusione intestinale nel topolino. Lo studio sperimentale è stato condotto nel rispetto delle normative della Comunità Europea sull'utilizzo e la cura degli animali da laboratorio e in conformità ai protocolli di ricerca approvati dal Ministero della Salute (DL 116/92).

CHIRURGIA ADDOMINALE

La ricerca è stata condotta su topi femmina appartenenti al ceppo Swiss, di peso compreso tra i 20-30 g, mantenuti a digiuno nelle 18 ore antecedenti l'esperimento, con libero accesso all'acqua.

Dopo essere stati pesati, gli animali sono stati anestetizzati con Nembutal (70mg/kg) per via intraperitoneale.

Dopo laparotomia, l'intestino è stato estratto dalla cavità addominale e spostato sul lato sinistro, in modo da rendere individuabile l'arteria mesenterica superiore (SMA) che è stata occlusa temporaneamente, esercitando una trazione sulle due estremità di un filo di nylon i cui capi sono stati inseriti all'interno di un catetere a doppio lume.

In questo modo è stato possibile ottenere una condizione di ischemia totale acuta, estesa a tutto l'intestino tenue e crasso per un periodo controllato di 45 minuti. Nel periodo di ischemia l'intestino dell'animale viene umettato con soluzione fisiologica tiepida e la temperatura corporea è mantenuta costante con l'ausilio di lampade riscaldanti.

Dopo 45 minuti di ischemia la clip viene rimossa e l'addome è suturato per permettere una riperfusione di 5 ore prima che gli animali siano sacrificati per inalazione di CO₂.

Come gruppi di riferimento sono stati utilizzati animali sottoposti alle stesse condizioni sperimentali ad eccezione dell'occlusione dell'arteria mesenterica superiore, definiti falsi operati (FO).

COMPOSTI UTILIZZATI

Sono state utilizzate come sostanze acido tiobarbiturico, acido acetico, aprotinina, o-dianisidina, HTAB, KCl, H₂O₂, SDS, HCl, buspirone, Mosapride, metillicaconitina (MLA), 2-Deossiglucosio (2-DG); tutte acquistate presso la ditta Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Fluoxetina, WAY100135, 8-OH-DPAT e GR125487 sono stati ottenuti da TOCRIS Bioscience (Ellisville, Missouri, USA). Tegaserod e Alosetron sono stati acquistati presso molekula (Shaftesbury, Dorset. UK). Il butanolo è stato acquistato dalla ditta Carlo Erba. La mieloperossidasi standard è stata fornita da Calbiochem. I kit ELISA relativi alle citochine TNF α e IL-1 β sono stati acquistati presso Prodotti Gianni s.p.a. (Milano), il kit relativo all'eme ossigenasi-1 (HO-1) presso la ditta TEMA ricerca s.r.l. (Bologna), Tutti i trattamenti farmacologici testati sono stati disciolti in soluzione fisiologica.

EDEMA INTESTINALE

Il contenuto intestinale di acqua, indicatore di stravasamento associato ad aumento della permeabilità vascolare, è stato determinato prelevando circa 2 cm di intestino corrispondente ai tratti digiuno, ileo e colon; i campioni, svuotati del contenuto luminare, sono stati pesati (peso umido) subito dopo il prelievo, aperti lungo il tratto anti-mesenterico e lasciati essiccare a temperatura ambiente per 24h. I campioni sono stati nuovamente pesati al termine dell'essiccamento (peso secco) (*Moore-Olufemi et al., 2005*).

L'edema è stato misurato come incremento relativo del peso del campione di tessuto umido rispetto al peso secco [ratio = (peso umido-peso secco)/peso secco].

ATTIVITÀ MIELOPEROSSIDASICA

L'attività dell'enzima MPO, indicatore dell'accumulo intestinale di neutrofili, viene determinata secondo il metodo di Krawisz leggermente modificato (*Krawisz et al., 1984*). Il tessuto intestinale, rapidamente prelevato, è stato pesato ed omogenato in ghiaccio con polytron (Ultra Turrax T25 Basic), in 10 volumi di tampone fosfato (PBS 100mM, pH7,4) addizionato di aprotinina (1µg/ml), un inibitore delle proteasi. L'omogenato è stato inoltre centrifugato a 10000 rpm (rotazioni per minuto) per 20 minuti ad una temperatura di 4°C.

Il pellet così ottenuto (contenente più del 90% dell'attività di MPO) viene omogenato ulteriormente in 5 volumi di PBS 50mM pH6 contenente esadeciltrimetilammonio bromuro (HTAB) allo 0,5% e aprotinina (1µg/ml). L'omogenato che ne deriva viene diviso in due aliquote, conservato in criotubi e congelato in azoto liquido. Il giorno seguente viene sottoposto a tre cicli di congelamento in azoto liquido (10 minuti) alternati a scongelamento a 37°C (15 minuti).

Un'aliquota (100µl) di surnatante ottenuto dopo 30 minuti di centrifugazione a 12000 rpm a 4°C viene fatta reagire con una soluzione di reazione (900µl) contenente H₂O₂ 0.0005% e O-dianisidina 16,7 mg/ml in PBS 50mM pH6.

I dati di assorbanza sono letti a 470 nm da uno spettrofotometro con lettura cinetica della durata di 4 minuti ed i risultati sono espressi in unità di MPO per grammo di tessuto (U/g).

Un'unità di MPO è definita come la quantità di enzima in grado di causare una variazione di assorbanza a 470nm di 1.0/min a 25°C (*Bradley et al., 1982*).

LIVELLI DI MALONDIALDEIDE

I livelli intestinali di malondialdeide (MDA) indicano l'entità del danno alla parete intestinale causato dalla presenza dei ROS: la MDA si genera attraverso processi degradativi degli acidi grassi polinsaturi, componenti principali delle membrane cellulari, dovuti alla perossidazione lipidica che avviene in seguito all'attività dei ROS.

La concentrazione di MDA nel tratto di ileo prelevato è determinata seguendo il metodo spettrofotometrico di Ohkawa (*Ohkawa et al., 1979*).

Una volta sacrificato l'animale, il tessuto intestinale ileale prelevato viene pesato ed omogenato con polytron in 10 volumi di KCl 1,15%. Un'aliquota di questo omogenato (300µl) viene aggiunta alla soluzione di reazione contenente 200µl di sodio dodecilsolfato (SDS) 8,1%, 1500µl di acido acetico 20% (pH3.5), 1500µl di acido tiobarbiturico 0,8% e 500µl di acqua distillata.

I campioni vengono riscaldati per un' ora a 95°C e dopo raffreddamento in ghiaccio si preleva 2 ml del campione e si aggiunge 2 ml di butanolo, per effettuare il processo di estrazione. Di seguito i campioni vengono vortexati per 30 sec e centrifugati a 3000 giri per 10 minuti.

La MDA, prodotto di perossidazione lipidica, reagisce con l'acido tiobarbiturico portando alla formazione di un composto colorato che assorbe a 532nm. Il valore di assorbanza del surnatante viene perciò letto a 532 nm tramite uno spettrofotometro e i dati sono espressi come nmol/g tessuto facendo riferimento a una retta di taratura di campioni a titolo noto di MDA.

TRANSITO GASTROINTESTINALE (GIT)

La motilità del tratto gastro-intestinale superiore dell'intestino è stata valutata tramite somministrazione (1ml/100g di peso corporeo) intragastrica di un marker nonassorbibile (0,25ml di una miscela al 10% carbone vegetale e al 5% gomma arabica in soluzione fisiologica).Dopo 45' dalla somministrazione del marker l'animale è sacrificato e l'intestino tenue è valutato per la quantificazione del transito, nel tratto compreso tra il piloro e la valvola ileo-ciecale.

L'entità del transito intestinale viene espressa come percentuale di intestino percorso dal marker rispetto alla lunghezza totale dell'intestino (*Puig et al., 2000*).

LIVELLI PLASMATICI DI TNF α , IL-1 β e HO-1

Le concentrazioni delle citochine TNF α , IL-1 β e HO-1 sono state misurate nel plasma dei topolini sottoposti a diverso trattamento farmacologico tramite opportuni kit ELISA commerciali, seguendo la procedura operativa indicata dal produttore.

Il sangue è stato prelevato dal ventricolo sinistro immediatamente dopo il sacrificio ed eparinizzato (150U/ml in fisiologica, 1:9 v/v). Il plasma è stato ottenuto dal sangue non coagulato tramite centrifugazione per 15' a 4500 rpm a temperatura ambiente, dopo stabilizzazione di 30' dal prelievo. Il plasma è stato conservato a -20°C fino al momento dell'analisi. I livelli plasmatici di TNF α e IL-1 β sono espressi come μ g/ml, i livelli di HO-1 invece come ng/ml.

ANALISI STATISTICA

I dati sono espressi come medie +/- errore standard e analizzati statisticamente applicando il test statistico per l'analisi della varianza (ANOVA two way, Bonferroni's post test). Le differenze tra gruppi 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. Tutti i test sono stati effettuati utilizzando il programma di analisi statistica Prism 4 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA).

BIBLIOGRAFIA

Abbas A. K. and Lichtman A. H.: **“Cellular and molecular immunology”**; Elsevier Ed. 2005.

Abdouh M., Albert P. R., Drobetsky E., Filep J. G., Kouassi E.: **“5-HT_{1A}- mediated promotion of mitogen-activated T and B cell survival and proliferation is associated with increased translocation of NF-kB to the nucleus”**; *Brain, Behavior and Immunity* 2004; 18: 24-34.

Agazzi A., De Ponti F., De Giorgio R., Candura S. M., Anselmi L., Cervio E., Di Nucci A., Tonini M.: **“Review of the implication of dietary tryptophan intake in patients with irritable bowel syndrome and psychiatric disorders”**; *Digestive and Liver Disease* 2003; 35: 590-595.

Albrecht E. W., Stegeman C. A., Heeringa P., Henning R. H., Van Goor H.: **“Protective role of endothelial nitric oxide syntase”**; *J Pathol* 2003;199 (1): 8-17.

Altavilla D., Guarini S., Bitto A et al.: **“Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway reduces NF-kB activation, blunts TNF-alpha production and protects against splanchnic artery occlusion shock”**; *Shock* 2006; 25:500-506.

Ahern G. P.: **“5-HT and the immune system”**; *Current Opinion in Pharmacology* 2011; 11: 29-33.

Aune T. M., McGrath K. M., Sarr T., Bombara M. P., Kelley K. A.: **“Expression of 5HT_{1A} receptors on activated human T cells”**; *The Journal of Immunology* 1993; 151: 1175-1183.

Aune T. M., Golden H. W., McGrath K. M.: **"Inhibitors of serotonin synthesis and antagonists of serotonin 1A receptors inhibit T lymphocyte function in vitro and cell-mediated immunity in vivo"**; *J Immunol* 1994; 153: 489-498.

Ayala A. and Chaudry I. H.: **"Platelet activating factor and its role in trauma, shock and sepsis"**; *New Horiz* 1996; 4: 265-75.

Barocelli E., Ballabeni V., Ghizzardi P., Cattaruzza F., Bertoni S., Lagrasta C., Impicciatore M.: **"The selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents intestinal ischemia-reperfusion injury in mice"**; *Nitric Oxide* 2006; 14: 212-218.

Beattie D. T. and Smith J. A. M.: **"Serotonin pharmacology in the gastrointestinal tract: a review"**; *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2008; 377: 181-203.

Bertoni S., Ghizzardi P., Cattaruzza F., Ballabeni V., Impicciatore M., Tognolini M., Lagrasta C., Barocelli E.: **"Evidence for the involvement of 5-HT_{2A} receptors in mild mesenteric ischemia/reperfusion dysfunctions in mice"**; *Pharmacological research* 2007; vol 56: 550-555.

Bill D. J., Knight M., Forster E. A., Fletcher A.: **"Direct evidence for an important species difference in the mechanism of 8-OH-DPAT-induced hypothermia"**; *Br J Pharmacol* 1991; 103(4): 1857-64.

Boeckxstaens G. E., Snoek S. A. et al.: **"Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates postoperative ileus in mice"** *Gastroenterology* 2007; 133: 1219-28.

Bonaventure P., Nepomuceno D., Miller K., Chen J., Kuei C., Kamme F., Tran D. T., Lovenberg T. W., Liu C.: **"Molecular and pharmacological characterization of serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptor subtypes in dogs"**; *Eur J Pharmacol* 2005; 513: 181-192.

Bradley P.P., Priebat D.A., Christensen R.D., Rothstein G.: **"Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker"**; *J. Invest. Dermatol* 1982; 78 (3): 206-209.

Branchek T. A., Mawe G. M., and Gershon M. D.: **“Characterization and Localization of a Peripheral Neural 5-Hydroxytryptamine Receptor Subtype (5-HT₂) with a Selective Agonist, 3H-5-Hydroxyindalpine”**; *The Journal of Neuroscience*, 1988, 8(7): 2582-2595.

Budhoo M. R., Harris R. P., Kellum J. M.: **“5-Hydroxytryptamine-induced Cl-transport is mediated by 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors in the rat distal colon”**; *Eur J Pharmacol* 1996; 298: 137-144.

Bulkley G. B.: **“Mesenteric vascular insufficiency”**; *Curr Probl Surg* 1997; 34: 943-990.

Calvillo L., Vandi E., Andreoli E., Besana A., Omodeo E., Gneccchi M., Zerbi P., Vago G., Busco G., Schwartz P.: **“Vagal stimulation, through its nicotinic action, limits infarct size and the inflammatory response to myocardial ischemia and reperfusion”**; *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2011; 58: 500-507.

Carden D. L. and Granger D. N.: **“ Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury”**; *J Pathol* 2000; 190: 255-266.

Carter D., Champney M., Hwang B., Eglen R. M.: **“Characterization of a postjunctional 5-HT receptor mediating relaxation of guinea pig isolated ileum”** *Eur J Pharmacol* 1995; 280: 243-250.

Chen Y., Lui V. C. H., Rooijen N. V., Tam P. K. H.: **“Depletion of intestinal resident macrophages prevents ischaemia reperfusion injury in gut”**; *Gut* 2004; 53:1772-1780.

Chi F., Wang L., Zheng X., Wu C., Jong A., Sheard M. A., Shi W., Huang S.: **“Meningitic *Escherichia coli* K1 penetration and neutrophil transmigration across the blood-brain barrier modulated by alpha7 nicotinic receptor”**; *PLoS ONE* 2011; 6(9): 1-17.

Chial H. J., Camilleri M., Burton D. et al.: **“Selective effects of serotonergic psychoactive agents on gastrointestinal functions in health”** *Am J Physiol* 2003; 284: G130-7.

Cloez-Tayarani I., Petit- Bertron A. F., Venters H. D., Cavaillon J. M.: **“Differential effect of serotonin on cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated human peripheal blood mononuclear cells: involvement of 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors”**; *Int Immunol* 2003; 15(2): 233-40.

Cote F., Thevenot E., Fligny C., Fromes Y., Darmon M., Ripoche M. A., Bayard E., Hanoun N., Saurini F., Lechat P., Dandolo L., Hamon M., Mallet J., Vodijani G.: **“Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function”** ; *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(23): 13525-30.

Coulie B., Tack J., Sifrim D., Andrioli A., Janssens J.: **“Role of nitric oxide in fasting gastric fundus tone and in 5-hydroxytryptamine-1 receptor mediated relaxation of the gastric fundus”**; *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1999; 276: G373-G377.

Crockett E. T., Galligan J., J., Uhal B. D., Harkema J., Roth R., Pandya K.: **“Protection of early phase hepatic ischemia-reperfusion injury by cholinergic agonists”** *BMC Clin Phatol* 2006; 6:3.

Del Gobbo V.: **“Immunologia e immunoematologia”**; PICCIN Editore, 2003.

De Jonge W. J., van der Zanden E. P. et al.: **“Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the jak2-STAT3 signaling pathway”**; *Nat Immunol* 2005; 6: 844-51.

De Ponti F.: **“Pharmacology of serotonin: what a clinician should know”**; *Gut* 2004; 53: 1520-1535.

Dickson E. J., Heredia D. J. and Smith T. K.: **“Critical role of 5-HT_{1A}, 5-HT₃, and 5-HT₇ receptor subtypes in the initiation, generation, and propagation of the murine colonic migrating motor complex”**; *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010; ; 299(1): G144–G157.

Enciclopedia Britannica on line

Erspamer V., Asero B.: **“Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine”**; *Nature* 1952; 169: 800-2.

Farmer P. and Pugin J.: **“ β -adrenergic agonists exert their “ anti-inflammatory” effects in monocytic cells through the ikB/NF-kB pathway”**; *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L675-L682.

Foley S., Coleman N., Holmes G. K. T., Bennet A., Spiller R. C.: **“Serotonin transporter expression is reduced in celiac disease”**; *Gastroenterology* 2006; 130, A740.

Freire-Garabal M., Nunez M. J., Balboa J., Lopez-Delgado P., Gallego R., Garcia-Caballero T., Fernandez-Roel M. D., Brenlla J., Rey-Mendez M.: **“Serotonin upegulates the activity of phagocytosis through 5-HT_{1A} receptors”**; *British Journal of Pharmacology* 2003; 139: 457-463.

Furness J. B.: **“Types of neurons in the enteric nervous system”**; *J Auton Nerv Syst* 2000; 81: 87-96.

Galitovskiy V., Qian J., Chernyavsky A. I. et al.: **“Cytokine-induced alterations of alpha7 nicotinic receptor in colonic CD4 T cells mediate dichotomous response to nicotine in murine models of Th1/Th17- versus Th2-mediated colitis”**; *J Immunol* 2011; 187: 2677-87.

Galligan J. J.: **“Ligand-gates ion channels in the enteric nervous system”**; *Neurogastroenterol Motil* 2002; 14: 611-623.

Germann C.-Stanfield V.: **“Fisiologia umana”**; EdiSES 2003.

Gershon M. D.: **“Review article: serotonin receptors and transporters-roles in normal and abnormal gastrointestinal motility”**; *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 (suppl 7): 3-14.

Gershon M. D.: **“Nerves, reflexes and the enteric nervous system”**; *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: S184-S193.

- Gershon M. D. and Tack J.: **“The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders”**; *Gastroenterology* 2007; 132: 397-414.
- Ghia J. E., Blennerhasset P., Deng Y., Verdu E. F., Khan W. I., Collins S. M.: **“Reactivation of inflammatory bowel disease in a mouse model of depression”**; *Gastroenterology* 2009; 136:2280-2288.
- Gibbs S. A., Weiser M. R., Kobzik L., Valeri C. R., Shepro D., Hechtman H. B.: **“P-selectin mediates intestinal ischemic injury by enhancing complement deposition”** *Surgery* 1996; 119(6): 652-656.
- Granger D. N.: **“Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury”**; *Am J Physiol* 1988; 255(6): H1269-H1275.
- Halliwell B. and Gutteridge J.: **“Free radicals in biology and medicine”**; 3rd ed. New York 1999.
- Hansen M. B.: **“The enteric nervous system I: organization and classification”**; *Pharmacology and Toxicology* 2003; 92: 105-113.
- Harrison R.: **“Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?”** *Free Radi Biol Med* 2002; 33: 774-797.
- Heeschen C., Weis M., Aicher A., Dimmeler S., Cooke J. P.: **“A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors”**; *J. Clin. Invest* 2002; 110: 527-536.
- Hierholzer C., Kalff J. C., Audolfsson G., et al.: **“Molecular and functional contractile sequelae of rat intestinal ischemia/reperfusion injury”**; *Transplantation* 1999; 68: 1244-54.
- Holzer P.: **“sensory neurone responses to mucosal noxae in the upper gut: relevance to mucosal integrity and gastrointestinal pain”**; *Neurogastroenterol Motil* 2002; 14:459-475.

Hsiung S., Tamir H., Franke T. F. Liu K.: “ **Roles of extracellular signal-regulated kinase and Akt signaling in coordinating nuclear transcription factor-kB-dependent cell survival after serotonin 1A receptor activation**”; *Journal of Neurochemistry* 2005; 95: 1653-1666.

Kamei K., Maeda N., Ogino R., Koyama M., Nakajima M., Tatsuoka T., Ohno T., Inoue T.: “**New 5-HT1A receptor agonists possessing 1,4-benzoxazepine scaffold exhibit highly potent anti-ischemic effects**”; *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11(4): 595-8.

Karlin A.: “**Structure of nicotinic acetylcholine receptors**”; *Curr Opin Neurobiol* 1993; 3: 299-309.

Katori M., Busuttil R. W., Kupiec-Weglinski J. M.: “**Heme oxygenase-1 system in organ transplantation**”; *Transplantation* 2002; 74(7): 905-912.

Kimizuka K., Nakao A., Nalesnik M. A., Demetris A. J., Uchiyama T., Ruppert K., Fink M. P., Stolz D. B., Murase N.: “**Endogenous IL-6 inhibits acute inflammatory responses and prevents ischemia/reperfusion injury after intestinal transplantation**”; *Am J Transplant* 2004; 4(4): 482-94.

Kimura Y., Pierro A., Eaton S.: “**Glutathione synthesis in intestinal ischaemia-reperfusion injury: effects of moderate hypothermia**”; *J Pediatr Surg* 2009; 44(2): 253-7.

Kirchgessner A. L., Liu M. T., Raymond J. R., Gershon M. D.: “**Identification of cells that express 5-hydroxytryptamine1A receptors in the nervous systems of the bowel and pancreas**”; *J Comp Neurol* 1996; 364(3): 439-455.

Komada T. and Yano S.: “**Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine-receptor subtypes in circular muscle from the rat stomach**”; *Biol Pharm Bull* 2007; 30:508-513.

Koval L., Lykhmus O., Zhmak M. et al.: “**Differential involvement of alpha4beta2, alpha7 e alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors in B lymphocyte activation in vitro**” *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43: 516-24.

- Krawisz J.E., Sharon P. and Stenson W.F.: **“Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity”**; *Gastroenterology* 1984; 87: 1344-1350.
- Kubes P., Ibbotson G., Russel J., Wallace J. L., Granger D. N.: **“Role of platelet-activating factor in reperfusion-induced leukocyte adherence”**; *Am J Physiol* 1990; 259:G300-G305.
- Kubes P and McCafferty D. M.: **“Nitric oxide and intestinal inflammation”**; *Am J Med* 2000; 109(2): 150-158.
- Kuemmerle J. F., Murthy K. S., Grider J. R., Martin D. C., Makhlof G. M.: **“Coexpression of 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors coupled to distinct signaling pathways in human intestinal muscle cells”**; *Gastroenterology* 1995; 109: 1791-1800.
- Kushnir-Sukhov N. M., Gilfillan A. M., Coleman J. W., Brown J. M., Bruening S., Toth M., Metcalfe D. D.: **“5-hydroxytryptamine induces mast cell adhesion and migration”**; *J Immunol* 2006; 177(9): 6422-32.
- Lackan S. E. and Kirchgessner A.: **“Anti-inflammatory effects of nicotine in obesity and ulcerative colitis”**; *J Trasl Med* 2011; 9: 129-143.
- Lundvig D. M. S., Immenschuh S., Wagener F. A. D.: **“Heme oxygenase, inflammation, and fibrosis: the good, the bad, and the ugly”**; *Fronters in PHARMACOLOGY* 2012; 81(3): 1-14.
- Mallick I. H., Yang W., Winslet M. C., Seifalian A. M.: **“Ischemia-Reperfusion Injury of the intestine and protective strategies against injury”** *Digestive Disease and Science* 2004, vol 49: 1359-1377.
- Martin K. F., Phillips I., Hearson M., Prow M. R., Heal D. J.: **“Characterization of 8-OH-DPAT-induced hypothermia in mice as a 5HT_{1A} autoreceptor response and its evaluation as a model to selectively identify antidepressants”**; *Br J Pharmacol* 1992; 107(1): 15-21.
- Massberg M. and Messmer K.: **“The nature of ischemia/reperfusion injury”**; *Transplantation Proceedings* 1998; 30: 4217-4223.

Mawe G. M., Coates M. D., Moses P. L.: **“Review article: intestinal serotonin signalling in irritable bowel syndrome”**; *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1067-1076.

Millan M. J., Rivet J., Canton H., Le Marouille-Girardon S., Gobert A.: **“Induction of hypothermia as a model of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated activity in the rat: a pharmacological characterization of the actions of novel agonists and antagonists”**; *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1993; 254: 1364-1376.

Mioni C., Bazzani C., Giuliani D. et al.: **“Activation of an afferent cholinergic pathway produces strong protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats”**; *Crit Care Med* 2005; 33: 2621-2628.

Montalto M.C., Hart M. L., Jordan J. E., Wada K., Stahl G. L.: **“Role for complement in mediating intestinal nitric-oxide synthase-2 and superoxide dismutase expression”** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285(1): G 197-206.

Moore-Olufemi S.D., Xue H., Allen S.J. et al.: **“Effects of primary and secondary intra-abdominal hypertension on mesenteric lymph flow: implications for the abdominal compartment syndrome”**; *Jr. Shock* 2005; 23: 571-575.

Mori T., Kawano K., Shishikura T.: **“5-HT₃-receptor antagonist inhibits visceral pain differently in chemical and mechanical stimuli in rats”**; *J Pharmacol Sci* 2004; 94: 73-76.

Morteau O., Julia V., Eeckhout C., Bueno L.: **“Influence of 5-HT₃ receptor antagonists in visceromotor and nociceptive responses to rectal distension before and during experimental colitis in rats”**; *Fundam Clin Pharmacol* 1994; 8: 553-562.

Moss N. C., Tang R., Willis M., Stansfield W. E., Baldwin A. S., Selzman C. H.: **“Inhibitory kappa B kinase- β is a target for specific nuclear factor kappa B-mediated delayed cardioprotection”**; *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 136: 1274-9.

Naito Y., Takagi T., Uchiyama K., Handa O., Tomatsuri N., Imamoto E., Kokura S., Ichikawa H., Yoshida N., Yoshikawa T.: **“Suppression of intestinal ischemia-**

reperfusion injury by a specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, pioglitazone, in rats"; *Redox Rep* 2002; 7(5): 294-299.

Ohkawa H., Ohishi N. e Yagi K.: **"Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction"**; *Analytical Biochemistry* 1979, 95: 351-358.

Oldenburg W. A., Lau L. L., Rodenberg T. J., Edmonds H. J., and Burger C. D.: **"Acute mesenteric ischemia: a clinical review"**; *Arch Intern Med* 2004, 164: 1054-1062.

Orr-Urtreger A., Kedmi m., Rosner S., Karmeli F., Rachmilewitz D.: **"Increased severity of experimental colitis in alpha5 nicotinic acetylcholine receptor subunit-deficient mice"**; *Molecular Neuroscience* 2005; 16(10): 1123-1127.

Pan H. and Gershon M. D.: **"Activation of intrinsic afferent pathways in submucosal ganglia of the guinea pig small intestine"**; *J Neurosci* 2000; 20: 3293-3309.

Panes J., Perry M., Granger D. N.: **"Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention"**; *Br J Pharmacol* 1999; 126(3): 537-550.

Park Y. Y.: **"Ischemia/reperfusion lung injury increases serum ferritin and heme oxygenase-1 in rats"**; *Korean J Physiol Pharmacol* 2009; 13(3): 181-7.

Parsons S. M., Prior C., Marshall I. G.: **"Acetylcholine transport, storage and release"**; *Int Rev Neurobiol* 1993; 35: 279-390.

Pascual D., Alsasua A., Goicoechea C., Martin M. I.: **"The involvement of 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors in two models of gastrointestinal transit in mice"**; *Neurosci Lett* 2002; 326: 163-166.

Pavlov V. A., Wang H., Czura C. J., Friedman S. G. and Tracey K. J.: **"The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation"**; *Molecular Medicine* 2003; 9 (5-8): 125-134.

Peng H. B., Libby P., Liao J. K.: **"Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B"**; *J Biol Chem* 1995; 270(23): 14214-14219.

Piera M. J., Beaughard M., Michelin M. T., Massingham R.: **“Effects of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor agonists, 8-OH-DPAT, buspirone and flesinoxan, upon brain damage induced by transient global cerebral ischaemia in gerbils”**; *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1995; 329(3): 347-59.

Prehn J. H., Weisch M., Backhauss C., Nuglisch J., Ausmeier F., Karkoutly C., Kriegelstein J.: **“Effects of serotonergic drugs in experimental brain ischemia: evidence for a protective role of serotonin in cerebral ischemia”**; *Brain Res* 1993; 630(1-2): 10-20.

Puig M. M., Warner W., Poi O.: **“Intestinal inflammation and morphine tolerance alter the interaction between morphine and clonidine on gastrointestinal transit in mice”**; *Anesthesiology* 2000; 93: 219-230.

Qian Y., Galli A., Ramamoorthy S., Risso S., DeFelice L.J., Blakely R. D.: **“Protein kinase C activation regulates human serotonin transporter in HEK-293 cells via altered cell surface expression”**; *J Neurosci* 1997; 17: 45-57.

Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M., Moore P. K.: **“Farmacologia”**; terza edizione, 2007.

Robbins e Cotran: **“Le basi patologiche delle malattie”**; settima edizione, 2006.

Rosas-Ballina M. and Tracey K. J.: **“Cholinergic control of inflammation”** *Journal of internal medicine* 2009; 265: 663-679.

Sadis C., Teske G., Stokman G., Kubiak C., Claessen N., Moore F., Loi P., Diallo B., Bonvais L., Goldman M., Floryuin S., Le Moine A.: **“Nicotine protects kidney from renal ischemia/reperfusion injury through the cholinergic anti-inflammatory pathway”**; *Plos One* 2007; 2(5):e469.

Saeed R. W., Varma S., Peng-Nemeroff T. et al.: **“Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation”**; *J Exp Med* 2005; 201: 1113-23.

Salazar-Colocho P., del Rio J., Frechilla D.: **“Serotonin 5-HT_{1A} receptor activation prevents phosphorylation of NMDA receptor NR1 subunit in cerebral ischemia”**; *J Physiol Biochem* 2007; 63(3): 203-11.

Salazar-Colocho P., del Rio J., Frechilla D.: **“Neuroprotective effects of serotonin 5-HT_{1A} receptor activation against ischemic cell damage in gerbil hippocampus: involvement of NMDA receptor NR1 subunit and BDNF”**; *Brain Research* 2008; 1199: 159-166.

Salzmar A. L.: **“Nitric oxide in the gut”**; *New Horiz* 1995; 3(2): 352-364.

Seal J. B., Gewertz B. L.: **“Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury”**; *Ann Vasc Surg*. 2005; 19(4):572-84.

Sempere T., Urbina M., Lima L.: **“5-HT_{1A} and beta-adrenergic receptors regulate proliferation of rat blood lymphocytes”**; *Neuroimmunomodulation* 2004; 11(5): 307-15.

Silvestri L. A.: **“Saunders comprehensive review for the NCLEX-RN examination”**; Elsevier Ed., 2010.

Snoek S. A., Verstege M. I., van der Zanden E. P., Deeks N., Bulmer D. C., Skynner M., Lee K., te Velde A. A., Boeckxstaens G. E. and de Jonge W. J.: **“ Selective α_7 nicotinic acetylcholine receptor agonists worsen disease in experimental colitis”**; *British Journal of Pharmacology* 2010; 160: 322-333.

Souza D. G., Cassali G. D., Poole S., Teixeira M. M.: **“Effects of inhibition of PDE4 and TNF α on local and remote injuries following ischemia and reperfusion injury”**; *Br J Pharmacol* 2001; 134(5): 985-994.

Spiller R.: **“Serotonin and GI clinical disorders”**; *Neuropharmacology* 2008; 55: 1072-1080.

Takano T., Yonemitsu Y., Saito S., Itoh H., Onohara T., Fukuda A., Takai M., Maehara Y.: **“A somatostatin analogue, ocreotide, ameliorates intestinal ischemia-**

reperfusion injury through the early induction of heme oxygenase-1"; *J Surg Res* 2012, 175(2): 350-8.

Talley N. J.: **"Serotonergic neuroenteric modulators"**; *Lancet* 2001; 358 (9298): 2061-2068.

Tam F. S., Hillier K., Bunce K. T.: **"Characterization of the 5-hydroxytryptamine receptor type involved in inhibition of spontaneous activity of human isolated colonic circular muscle"**; *Br J Pharmacol* 1994; 113: 143-150.

Tan K. S., Nackley A. G., Satterfield K., Maixner W., Diatchenko L., Flood P. M.: **"Beta2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF-kappaB-independent mechanisms"**; *Cell Signal* 2007; 19(2): 251-60.

Teramoto Y., Urano T., Nagai N., Takada Y., Ikeda K., Takada A.: **"Plasma levels of 5-HT and 5-HIAA increased after intestinal ischemia/reperfusion in rats"**; *Jpn J Physiol.* 1998; 48: 333-9.

Tonini M., Vicini R., Cervio E., De Ponti F., De Giorgio R., Barbara G., Stanghellini V., Dellabianca A., Sternini C.: **"5-HT₇ receptors modulate peristalsis and accommodation in the guinea pig ileum"**; *Gastroenterology* 2005; 129(5):1557-66.

Tsuchida Y., Hatao F., Fujisawa M., Murata T., Kaminishi M., Seto Y., Hori M., Ozaki H.: **"Neuronal stimulation with 5-hydroxytryptamine 4 receptor induces anti-inflammatory actions via α 7nACh receptors on muscularis macrophages associated with postoperative ileus"**; *Gut* 2011; 60: 638-47.

Tsuchihashi S., Fodevila C., Kupiec-Weglinski J. W.: **"Heme oxygenase system in ischemia and reperfusion injury"** *Ann Transplant* 2004; 9(1):84-7.

Yamada T., Inui A., Hayashi N., Fujimura M., Fujimiya M.: **" Serotonin stimulates endotoxin trans location via 5HT₃ receptors in the rat ileum"**; *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284 (5): G782-8.

Yoshikawa H., Hurokawa M., Ozaki N. et al.: **“Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-kappaB phosphorylation and nuclear factor-kappaB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor alpha7”**; *Clin Exp Immunol* 2006; 146: 116-23.

Yan S. F., Fujita T., Lu J., et al.: **“Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress”**; *Nat Med* 2000; 6:1355-61.

Young H. M. and Furness J. B.: **“Ultrastructural examination of the targets of serotonin-immunoreactive descending reflexes to the circular muscle of guinea pig small intestine”**; *J Comp Neurol* 1995; 356: 101-114.

Van der Zanden E. P., Snoek S. A., Heinsbroek S. E., Stanisor O. I., Verseijden C., Boeckxstaens G. E., Peppelenbosch M. P., Greaves D. R., Gordon S. and De Jonge W. J.: **“Vagus nerve activity augments intestinal macrophage phagocytosis via nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 4/\beta 2$ ”**; *Gastroenterology* 2009; 137: 1029-1039.

Van Leeuwen P.A., Boermeester M. A., Houdijk A. P., Ferwerda C. C., Cuesta M. A., Meyer S., Wesdorp R. I.; **“Clinical significance of translocation”**; *Gut* 1994; 35: S28-S34.

Vollmar B. and Menger M. D.: **“Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences”**; *Langenbecks Arch Surg.* 2011; 396(1):13-29.

Wang D. W., Zhou R. B. Yao Y. M. et al.: **“Stimulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine increases suppressive capacity of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells in mice in vitro”**; *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 335: 553-61.

Wess J.: **“Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors”**; *Crit Rev Neurobiol* 1996; 10: 69-99.

Wouters M. M., Farrugia G., Schemann M.: **“5-HT receptors on interstitial cells of Cajal, smooth muscle and enteric nerves”**; *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19 (suppl 2): 5-12.

www.unifi.it

www.vascularweb.org

Zhu X., Fan W., Li D., Kung H., Lin M. C. M.: “**Heme oxygenase-1 system and gastrointestinal inflammation: A short review**”; *World J Gastroenterol* 2011; 17(38): 4283-4288.

Zoehir N, Lappin D. F., Nile C. J.: “**Acetylcholine and the alpha 7 nicotinic receptor: a potential therapeutic target for the treatment of periodontal disease?**” *Inflamm Res* 2012; 61: 915-926.

Zuideveld K. P., Rusic-Pavletic J., Maas H. J., Peletier L. A., Van der Graaf P. M., Danhof M.: “**Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of Buspirone and its metabolite 1-(2-pyrimidinyl)-piperazine in rats**”; *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303(3): 1130-7.