

-Università del Piemonte Orientale-

“Amedeo Avogadro”

**Espressione di PPAR γ in Monociti/Macrofagi
umani di donatori sani fumatori e non: un
possibile effetto diretto della nicotina.**

XIX Ciclo di Dottorato in Medicina Molecolare

Tutor: Prof. Sandra Brunelleschi

Dottorando: Dott.ssa Angela Amoruso

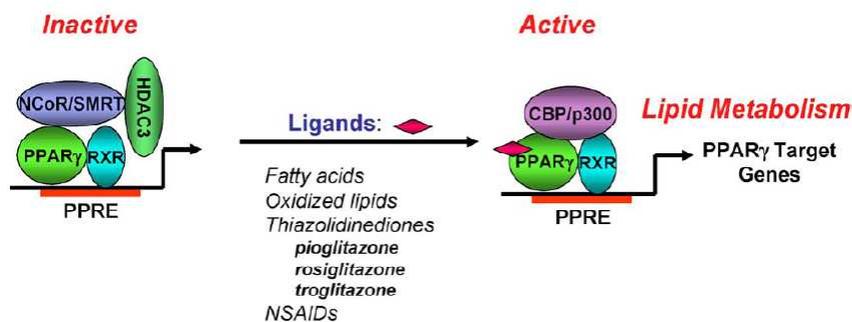
Introduzione

I *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors* (PPARs) sono fattori trascrizionali che svolgono un ruolo importante nella regolazione del metabolismo lipidico e glucidico, nel differenziamento adipocitario e sono coinvolti nel controllo di vari fenomeni infiammatori.

Se ne conoscono tre sottotipi, PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ , ed ognuno di essi ha una specifica distribuzione tissutale e ligandi specifici (Berger *et al.*, 2005; Duval *et al.*, 2002).

Oltre ad essere molto espresso nel tessuto adiposo, PPAR γ ha una larga diffusione in diverse tipologie cellulari: lo si trova in cellule endoteliali, muscolari lisce e in particolar modo nei monociti/macrofagi (Neve *et al.*, 2000; Ricote *et al.*, 1998a, 1998b; Staels *et al.*, 1998; Tontonoz *et al.*, 1998).

PPAR γ può essere attivato da ligandi naturali, quali la 15-deoxy-delta^{12,14}-prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂), un metabolita di PGD₂, l'acido 15-idrossieicosatetraenoico (15-HETE), l'acido 13-idrossioctadecadienoico (HODE) e le lipoproteine a basso peso molecolare (ox-LDL). Inoltre è attivato da ligandi sintetici, quali i tiazolidindioni, una classe di farmaci anti-diabetici, (ad es. il rosiglitazone e il ciglitazone) e da alcuni farmaci anti-infiammatori non steroidei (i NSAIDs, ad es. indometacina e ibuprofen) (Forman *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1998; Lehmann *et al.*, 1995; Nagy *et al.*, 1998; Valledor & Ricote, 2004).



I PPAR γ sono recettori nucleari che si trovano nel nucleo in forma inattiva, associati con co-repressori nucleari (NCoR/SMRT) e con la istone-deacetilasi (HDACs).

I co-repressori agiscono in modo tale da mantenere il recettore in uno stato inattivo mentre la HDACs mantiene la cromatina circostante in uno stato condensato attraverso la de-acetilazione dell'istone, in modo tale da inibire l'espressione genica (Jepsen *et al.*, 2000; McKenna and O'Malley, 2002).

I recettori nucleari PPAR γ inducono l'espressione genica attraverso la trans-attivazione trascrizionale: in seguito al legame ligando-recettore, il co-repressore si stacca e viene sostituito dall'attivatore trascrizionale che si lega a sua volta al recettore.

L'associazione col co-attivatore permette la formazione di un complesso trascrizionale che legandosi al PPRE, cioè alla sequenza consensus specifica sul DNA, consente la trascrizione genica. (Glass and Rosenfeld, 2000; McKenna and O'Malley, 2002).

Le proteine co-attivatrici, come CBP e p300, agiscono positivamente sulla regolazione dell'espressione genica mediante la loro intrinseca attività di acetiltransferasi sull'istone.

L'acetilazione dell'istone porta alla de-condensazione della cromatina, e quindi alla facilitazione dell'espressione genica.

L'osservazione che PPAR γ sia attivato da metaboliti dell'acido arachidonico e da alcuni NSAIDs suggerisce un ruolo di controllo, per questo recettore, nei processi infiammatori, anche se è molto discusso il meccanismo di trans-repressione trascrizionale che sta alla base dell'inibizione dell'espressione dei geni coinvolti nell'infiammazione (Daynes and Jones, 2002).

Infatti, differenti agonisti di PPAR γ inibiscono la produzione di citochine pro-infiammatorie (ad es. TNF- α , IL-6, IL-1 β) da monociti umani stimolati con PMA (Jiang *et al.*, 1998), supportando il ruolo anti-infiammatorio di PPAR γ .

I ligandi selettivi, inoltre, fanno sì che nei macrofagi attivati si abbia una diminuzione, a livello di espressione genica, dei geni di TNF- α , IL-6, IL-1 β , NO-sintasi inducibile, di gelatinasi B, del recettore *scavenger* A e di COX-2, antagonizzando, in parte, l'attività dei fattori di trascrizione AP-1, STAT e NF- κ B (Jiang *et al.*, 1998; Ricote *et al.*, 1998a, 1998b, 1999; Subbaramajah *et al.*, 2001).

PPAR γ è inoltre considerato un modulatore chiave nel differenziamento dei macrofagi, nonostante contrastanti risultati ottenuti in differenti specie animali e linee cellulari *macrophage-like* (Chawla *et al.*, 2001; Chinetti *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 2001; Ricote *et al.*, 1998a; Tontonoz *et al.*, 1998).

E' ormai risaputo che il fumo di sigaretta è una delle cause principali nelle malattie cardiache e polmonari, ma nello stesso tempo è anche responsabile dell'attivazione di cellule quali i monociti/macrofagi (Brunelleschi *et al.*, 1996; Skold *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1998; Valkonen & Kuusi, 1998; Vayssier *et al.*, 1998).

Precedentemente, abbiamo dimostrato che i macrofagi alveolari da fumatori sani presentano costitutivamente un aumento della traslocazione nucleare del fattore di trascrizione NF- κ B e un aumentato rilascio di citochine infiammatorie e radicali dell'ossigeno, rispetto alle cellule di donatori sani non -fumatori (Bardelli *et al.*, 2005; Brunelleschi *et al.*, 1996; Gunella *et al.*, 2006).

Scopo

In questo terzo anno di dottorato ci si è proposti di valutare le differenze nell'espressione della proteina PPAR γ e nel rilascio di citochine pro- ed anti-infiammatorie, in monociti e macrofagi (ottenuti dal differenziamento dei monociti: *monocyte-derived macrophages*, MDM) di donatori sani, fumatori e non-fumatori, e di valutare un possibile effetto diretto della nicotina.

Inoltre, si è portato a termine il lavoro di quantificazione dell'espressione di PPAR γ sui pazienti affetti da coronaropatie iniziato lo scorso anno e terminato con una casistica di circa 77 pazienti.

Materiali e metodi

Studio della popolazione

Per lo studio di PPAR γ su cellule di donatori sani, fumatori e non-fumatori, sono stati valutati 24 volontari: 14 uomini e 10 donne, tra i 20 e i 51 anni (età media = 33.9 ± 2 anni; età media degli uomini e delle donne: 32.8 ± 2.5 e 35.5 ± 3.5 anni, rispettivamente, $p = 0.07$). 8 uomini e 4 donne erano fumatori (in media da 12.9 ± 2 anni, con un numero medio di sigarette al giorno = 20.7 ± 1.5 ; $n = 12$) mentre 6 uomini e 6 donne erano non-fumatori; l'età media dei fumatori era 33.08 ± 2.8 anni ($n = 12$) e dei non-fumatori era 34.75 ± 3 anni ($n = 12$). I soggetti erano sani, non soffrivano di malattie all'apparato cardio-circolatorio o polmonare o di altri disturbi cronici di varia natura, non erano sottoposti a nessuna terapia al momento dello studio; erano tutti donatori di sangue del Servizio Trasfusionale dell'Ospedale di Borgomanero (No). Il sangue è stato prelevato tra le 8.00 e le 9.00 del mattino ed i fumatori si astenevano dal fumo da almeno 1 ora prima del prelievo.

Preparazione di monociti umani (M) e Monocyte-Derived Macrophages (MDM)

I monociti umani (M) sono stati isolati da preparazioni di *buffy-coat* freschi, raccolti da donatori sani fumatori e non-fumatori. Il *buffy-coat* viene fatto sedimentare con una soluzione di destrano in rapporto 1:1 e centrifugato a 400g per 30' a temperatura ambiente su gradiente di Hystopaque (densità = 1.077 g/cm³). L'anello di cellule mononucleate viene trasferito in un altro tubo e lavato con PBS (phosphate-buffered saline pH 7.4) per 10' a 250g per tre volte; le cellule così recuperate vengono piastrate in RPMI 1640 medium, con l'aggiunta di FBS al 5% (*fetal bovine serum* scomplementato), 2 mM di glutammina, 50 µg ml⁻¹ di streptomicina, 5 U ml⁻¹ di penicillina e 2.5 µg ml⁻¹ di anfotericina B (Brunelleschi *et al.*, 1998). La popolazione purificata di monociti viene ottenuta per adesione (90', 37°C, 5% CO₂) e le cellule in sospensione (principalmente linfociti) vengono rimosse con tre lavaggi di PBS; la vitalità cellulare viene valutata con "trypan blue dye exclusion" ed è normalmente > 98% (Brunelleschi *et al.*, 1998). Attraverso la citofluorimetria sono stati valutati diversi marker di superficie che hanno permesso di appurare che fosse una popolazione pura di monociti (> 90% CD14⁺, < 2% CD3⁺). I *Monocyte-Derived Macrophages* (MDM) sono ottenuti da monociti incubati a 37°C per 8-10 giorni con RPMI 1640 completo con l'aggiunta del 20% di FBS, con cambi di terreno ogni 2-3 giorni. Gli MDM vengono considerati cellule "macrophage-like", in accordo a Gantner *et al.* (1997), grazie alla diminuzione dei marker di superficie CD14 (soltanto il 25-30% degli MDM sono CD14) ed all'assenza dell'espressione del marker CD1a che dimostra che nelle preparazioni di MDM non ci sono cellule che si stanno differenziando in cellule dendritiche (Brunelleschi *et al.*, 2001).

Espressione proteica e quantificazione di PPARγ

Le cellule isolate da donatori sani fumatori e non-fumatori, sono state suddivise in cellule controllo (in cui si valuta l'espressione basale costitutiva di PPARγ) e cellule trattate (per 6 ore, a 37°C, in presenza del 5% di CO₂) con i ligandi selettivi PPARγ: 15d-PGJ₂ (0.1-10 µM) e ciglitazone (0.1-50 µM). I monociti e gli MDM dei non fumatori sono anche stati trattati con nicotina (range: 0.1-10 µM per 6 ore) per valutare il suo possibile effetto sull'espressione di PPARγ. Le cellule (2 x 10⁶), sono state lavate due volte con PBS freddo e staccate in tampone di lisi (3% SDS, 0.25 M Trizma base e 1 mM PMSF, phenyl-methyl-sulfonyl fluoride). Le cellule lisate sono state sonicate in immersione per circa 2 min. ed inoltre gli estratti sono stati sottoposti a shock termico. La determinazione delle concentrazioni proteiche sono state fatte con metodo Bradford. I campioni di proteina (20 µg) sono stati analizzati con SDS-PAGE (10% acrilammide) e trasferiti su membrane di nitrocellulosa. Gli *immunoblots* sono stati eseguiti con metodiche standard utilizzando i seguenti

anticorpi: anticorpo monoclonale PPAR γ (Santa Cruz; 1:1000 in TBS-Tween 5% latte) ed anticorpo monoclonale β -actina (Sigma; 1:5000 in TBS-Tween 3% BSA). L'anticorpo secondario utilizzato è associato con la perossidasi (Amersham Biosciences). Le proteine sono state visualizzate attraverso un sistema di intensificazione della chemiluminiscenza (ECL, Perkin Elmer). Il segnale di chemiluminiscenza è stato analizzato con un densitometro in condizioni non saturanti (Versadoc, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La quantificazione della proteina PPAR γ è stata fatta calcolando il rapporto tra l'espressione proteica di PPAR γ e quella della β -actina, quest'ultima utilizzata come proteina *house-keeping*.

Rilascio di citochine

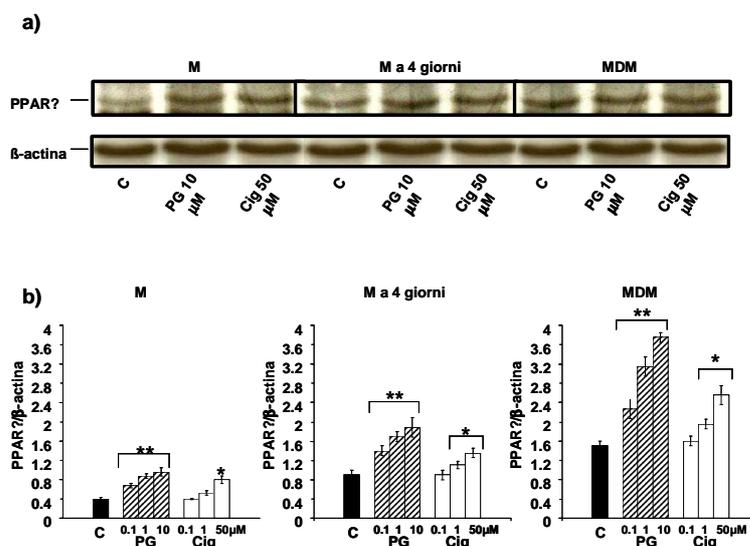
Le cellule (1×10^6) sono state suddivise in cellule controllo (valore basale delle citochine d'interesse) e cellule trattate con gli agonisti PPAR γ (15d-PGJ₂ e ciglitazone) per 6 ore; dopo i vari stimoli sono stati raccolti i surnatanti e conservati a -20°C sino all'uso. In alcuni casi, le cellule dei non-fumatori sono state incubate, in presenza e in assenza degli agonisti PPAR γ o di nicotina, con PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) ad una concentrazione di 0.1 μ M per 24 ore. Questa stimolazione di 24 ore è stata utilizzata per valutare il massimo rilascio di citochine, come descritto in precedenti nostre pubblicazioni (Bardelli *et al.*, 2005; Gunella *et al.*, 2006). TNF- α , IL-6 e IL-10 (l'ultima è considerata una delle più importanti citochine anti-infiammatorie) sono state misurate utilizzando dei kit ELISA (Pelikine CompactTM human ELISA kit). I risultati sono espressi in pg ml⁻¹. La concentrazione minima rilevata dal kit per le tre diverse citochine è: 1.4 pg ml⁻¹ per TNF- α , 0.6 pg ml⁻¹ per IL-6 e 1.2 pg ml⁻¹ per IL-10.

Risultati

Espressione di PPAR γ e rilascio di citochine in monociti (M) e macrofagi (MDM) di donatori sani non-fumatori

Questo studio si proponeva di valutare l'espressione proteica di PPAR γ sia in M sia in MDM di donatori sani fumatori e non-fumatori e di quantificare il contenuto di PPAR γ calcolando il rapporto tra l'espressione di PPAR γ e la β -actina, considerata la proteina housekeeping.

Fig1:



La proteina costitutiva PPAR γ è stata studiata (attraverso tecniche di Western blot) in M adesi provenienti da non-fumatori e la sua espressione è risultata up-regolata durante il differenziamento a MDM (Figura 1). Come si vede in Figura 1a, 6 ore di incubazione con il ligando endogeno 15d-PGJ₂ (usato a 10 μ M) o il ligando sintetico, ciglitazone (usato a 50 μ M) aumentano fortemente l'espressione di PPAR γ in M, in macrofagi parzialmente differenziati (M a 4 giorni) e in macrofagi totalmente differenziati (MDM), confermando così precedenti osservazioni (Chinetti *et al.*, 1998; Tontonoz *et al.*, 1998).

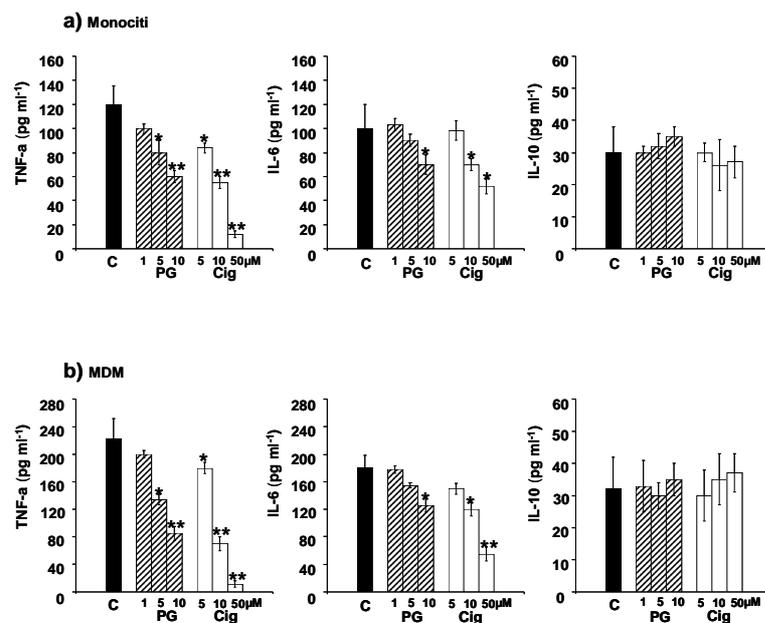
Si è così passati a quantificare l'espressione di PPAR γ calcolata come rapporto con la proteina β -actina. I livelli di β -actina sono sempre stati costanti e stabili in ogni tipologia cellulare e non sono stati indotti o inibiti dai diversi trattamenti a 6- e 24-ore.

Come mostrato in Figura 1b, il rapporto di PPAR γ / β -actina negli MDM è 1.47 ± 0.2 (n = 12), ed è circa quattro volte più alto che nei M (0.38 ± 0.08 ; n = 12; p < 0.001 vs MDM). Entrambi i ligandi di PPAR γ aumentano l'espressione di PPAR γ in maniera concentrazione-dipendente; il range di

utilizzo per 15d-PGJ₂ è 0.1- 10 µM, mentre il ciglitazione è stato usato in un “range” 0.1-50 µM (Figura 1b). Alla massima concentrazione (10 µM), la 15d-PGJ₂ incrementa l’espressione di PPARγ di circa 2.4 volte, 2.1 volte e 2.5 volte in M, M a 4 giorni e MDM, rispettivamente (n = 6; p < 0.01 vs controllo; Figura 1b); il ligando endogeno aumenta significativamente l’espressione di PPARγ anche alla concentrazione più bassa (0.1 µM). Il ciglitazione, invece, risulta inattivo alle basse concentrazioni e, alla massima concentrazione testata (50 µM), incrementa l’espressione di PPARγ di 2 volte circa nei M e di 1.7 volte nei M a 4 giorni e negli MDM, (n = 6; p < 0.05 vs controllo; Figura 1b).

Considerando che i monociti/macrofagi rilasciano spontaneamente significative quantità di citochine infiammatorie, ci è sembrato interessante andare a valutare la capacità degli agonisti PPARγ di alterare tale rilascio basale.

Fig2:



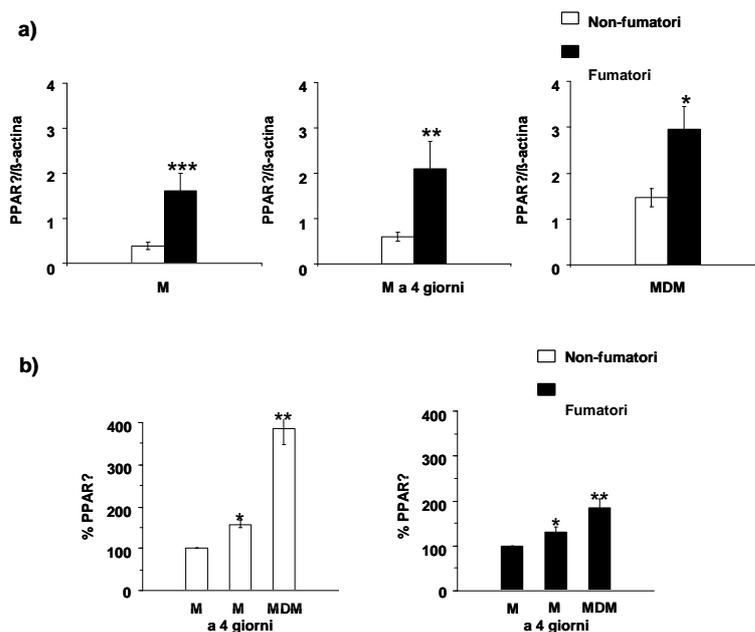
I M e gli MDM sono stati incubati con concentrazione crescenti degli agonisti PPARγ (ciglitazione: 5, 10 e 50 µM; 15d-PGJ₂: 1, 5 e 10 µM) per 6 ore, lo stesso tempo usato negli esperimenti di Western blot. Il rilascio basale di TNF-α, IL-6 e IL-10 da parte dei M è, rispettivamente, il seguente: 120 ± 15 pg ml⁻¹, 100 ± 20 pg ml⁻¹ e 30 ± 8 pg ml⁻¹ (n = 6; Figura 2). Le concentrazioni basali rilasciate, invece, dagli MDM di TNF-α, IL-6 e IL-10 sono, rispettivamente, le seguenti: 223 ± 29 pg ml⁻¹, 180 ± 18 pg ml⁻¹ and 32 ± 10 pg ml⁻¹ (n = 6; Figura 2). Il ciglitazione alla massima concentrazione testata (50 µM) è risultato più efficiente che la 15d-PGJ₂ alla massima concentrazione (10 µM) nell’inibire il rilascio di TNF-α e IL-6. Infatti, il ligando sintetico inibisce il rilascio di TNF-α del 90 % (se paragonato all’inibizione del 50% dovuta alla 15d-PGJ₂) e inoltre

riduce il rilascio di IL-6 del 50% (se comparato con l'inibizione del 30% ottenuta con la 15d-PGJ₂) nei M (Figura 2a). Il rilascio di TNF- α dagli MDM incubati con ciglitazione o 15d-PGJ₂ diminuisce ulteriormente fino al 5% e 40%, rispettivamente; il rilascio di IL-6 è anch'esso ulteriormente diminuito (70% d'inibizione con ciglitazione, ma soltanto il 30% con la 15d-PGJ₂) (Figura 2b). Come si può notare, il rilascio di IL-10, una delle maggiori citochine anti-infiammatorie, non viene modulato da nessuno dei due agonisti (Figura 2 a e b).

Espressione di PPAR γ e rilascio delle citochine in M e MDM da donatori sani fumatori

Diversi studi hanno evidenziato come il fumo di tabacco sia responsabile dell'attivazione di monociti/macrofagi. Partendo dalla constatazione che la proteina PPAR γ sia presente in M, M a 4 giorni e MDM, e considerando i rapporti PPAR γ / β -actina, si è visto come l'espressione della proteina PPAR γ sia aumentata nei fumatori (Figura 3): il rapporto PPAR γ / β -actina è 1.61 ± 0.38 nei M (n =12), significativamente aumentato (p < 0.001) rispetto a quello misurato nei M dei non-fumatori (0.38 ± 0.08 ; n = 12) (Figura 3a).

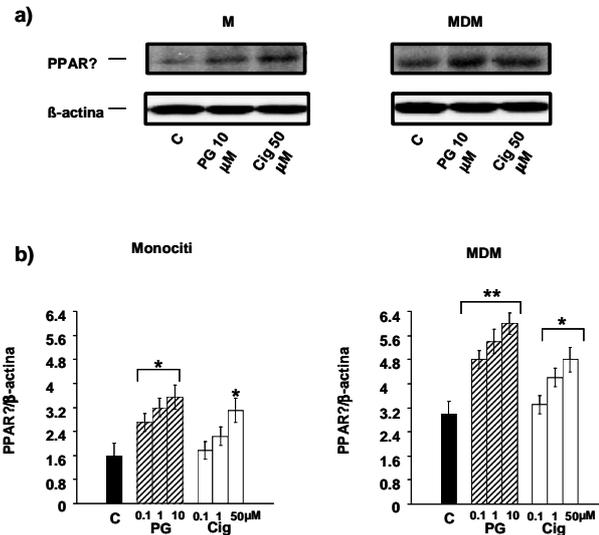
Fig3:



I rapporti PPAR γ / β -actina misurati negli MDM dei fumatori e dei non-fumatori sono 2.96 ± 0.5 (n = 12) e 1.47 ± 0.2 (n = 12; p < 0.05 vs fumatori), rispettivamente; simili risultati sono stati osservati anche nei macrofagi non totalmente differenziati (M a 4 giorni) (0.86 ± 0.1 nei non-fumatori e 2.2 ± 0.2 nei fumatori; n = 12; p < 0.01) (Figura 3a). Valutando l'espressione della proteina PPAR γ durante il differenziamento, e ponendo uguale a 100 quella osservata nei monociti, è interessante notare che la proteina PPAR γ era quattro volte più abbondante negli MDM rispetto ai M dei non-

fumatori, mentre nei fumatori l'incremento negli MDM era solo di due volte (Figure 3b). Come mostrato precedentemente nelle cellule dei non-fumatori (Figura 1), il ciglitazone e la 15d-PGJ₂ aumentano l'espressione di PPAR γ in maniera dose-dipendente sia nei M che negli MDM dei fumatori. La 15d-PGJ₂ ha un effetto maggiore rispetto al ciglitazone (Figura 4a e b).

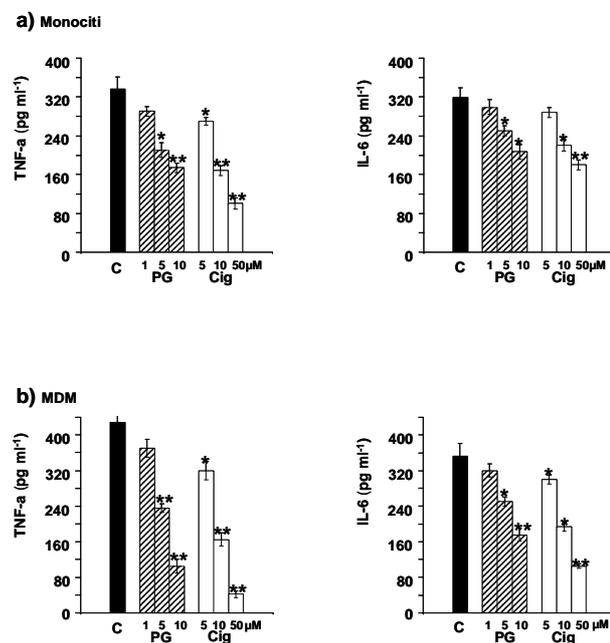
Fig4:



Infatti, il ligando endogeno aumenta significativamente ($p < 0.05$ in M; $p < 0.01$ in MDM; $n = 5$; Figure 4b) l'espressione di PPAR γ anche solo a 0.1 μ M, mentre il ciglitazone agisce solo a concentrazioni più alte.

In accordo con quanto osservato nelle cellule dei non-fumatori, entrambi i ligandi PPAR γ inibiscono il rilascio basale di citochine in maniera dose-dipendente nei M (Figura 5a) e negli MDM dei fumatori (Figura 5b).

Fig5:

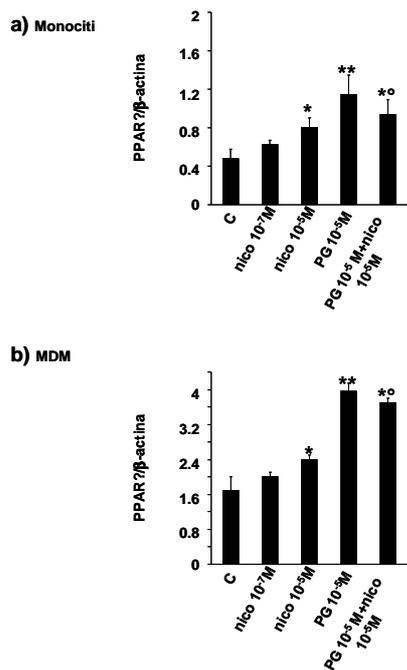


Il rilascio basale di TNF- α e IL-6 da M è di 336 ± 25 pg ml⁻¹ e 319 ± 20 pg ml⁻¹, rispettivamente (n = 4). Negli MDM il rilascio spontaneo di TNF- α era di 429 ± 45 pg ml⁻¹ e quello di IL-6 era di 352 ± 28 pg ml⁻¹ (n= 4). In questo caso, il ciglitazone a 50 μ M era più efficace della 15d-PGJ₂ a 10 μ M nell'inibire il rilascio di TNF- α e IL-6 (Figura 5).

Effetti della nicotina sull'espressione di PPAR γ e sul rilascio di citochine in M e MDM di non-fumatori

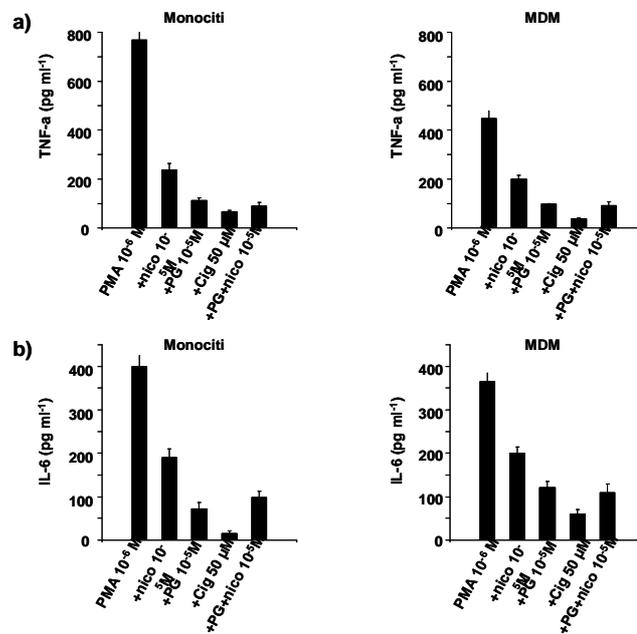
Per verificare se l'aumento dell'espressione della proteina PPAR γ misurata nelle cellule dei fumatori, potesse essere in parte un effetto diretto della nicotina, è stata esaminata la capacità della nicotina di indurre, *in vitro*, l'espressione di PPAR γ . Le cellule dei non-fumatori sono state trattate con nicotina 10 μ M o 0.1 μ M per 6 ore; la 15d-PGJ₂ è stata utilizzata come controllo positivo. In questa serie di esperimenti, il rapporto PPAR γ / β -actina nel controllo era 0.48 ± 0.1 nei M (n =5) e 1.7 ± 0.3 (n = 5) negli MDM.

Fig6:



Come si evince dalla Figura 6, la nicotina induce l'espressione di PPAR γ in modo dose-dipendente ed alla concentrazione di 10 μ M, incrementa l'espressione di PPAR γ di circa 1.6 volte nei M (n =5; Figura 6a) e di 1.4 volte negli MDM (n =5; Figura 6b). Inoltre, non è stato dimostrato nessun effetto additivo o sinergico tra nicotina e 15d-PGJ₂ (Figure 6).

Fig7:



La nicotina di per sé non altera il rilascio basale di citochine, ma inibisce fortemente il rilascio di TNF- α e IL-6 in cellule stimulate con PMA, così come fanno il ciglitazone e la 15d-PGJ₂: anche in questo caso, la nicotina non sembra avere nessun effetto additivo con l'agonista endogeno di PPAR γ (Figure 7).

Quindi, con questo lavoro, abbiamo confermato che PPAR γ è un marker di differenziamento dei macrofagi umani (Chawla *et al.*, 2001; Chinetti *et al.*, 1998; Ricote *et al.*, 1998a; Tontonoz *et al.*, 1998) e abbiamo iniziato una parziale quantificazione, misurandone il rapporto PPAR γ / β -actina.

Abbiamo inoltre dimostrato che l'espressione costitutiva della proteina PPAR γ è significativamente aumentata nelle popolazioni monocito/macrofagiche ottenute da fumatori sani, rispetto ai non-fumatori. Questo effetto è parzialmente riprodotto in vitro dai trattamenti con la nicotina in modo dose-dipendente.

Inoltre, trattando i M e gli MDM con gli agonisti PPAR γ , si è ottenuto un aumento dell'espressione della proteina dose dipendente. Alle massime concentrazioni testate (10 μ M per la 15d-PGJ₂ e 50 μ M per il ciglitazone, in accordo con Hinz *et al.*, 2003), entrambi gli agonisti aumentano di circa due volte l'espressione di PPAR γ sia in M che negli MDM, dato correlato alla capacità degli agonisti di inibire il rilascio delle citochine pro-infiammatorie, TNF- α e IL-6.

Mentre le rilevanze cliniche di queste scoperte sono ancora da chiarire, questo lavoro suggerisce che l'aumentata espressione di PPAR γ , associata ad un ridotto rilascio delle citochine pro-infiammatorie, potrebbe costituire un meccanismo di protezione contro la tossicità del fumo di tabacco.

Espressione di PPAR γ in M e MDM di pazienti coronaropatici

Nell'arco di questo terzo anno di dottorato si è inoltre ultimato lo studio sull'espressione del recettore PPAR γ nei pazienti con coronaropatie, fumatori e non.

La casistica comprende 77 pazienti con un età compresa tra i 38 e gli 85 anni. Tutti i dati dei pazienti sono riportati nella seguente tabella:

TOT. PAZIENTI: 77

Caratteristiche generali:

Età media (anni)	65.2±9.3 (38-85)
Donne (percentuale sul totale pazienti)	19 (24.7%)
Peso	76±11
Altezza	168±8
Body mass index (Kg/m ²)	26.6±3.3 (19.2-34.6)
Diabetici (perc. sul totale pazienti)	28 (36.4%)
IDDM (perc. sul totale pazienti)	10 (13%)
NIDDM (perc. sul totale pazienti)	18 (23.4%)
Familiarità per CAD (perc. sul totale pazienti)	23 (29.9%)
Fumatori (perc. sul totale pazienti)	22 (28.6%)
Ex-fumatori (perc. sul totale pazienti)	25 (32.5%)
Non fumatori (perc. sul totale pazienti)	30 (39%)
Ipertesi (perc. sul totale pazienti)	48 (62.3%)
Dislipidemici (perc. sul totale pazienti)	50 (64.9%)

Trattamenti:

Ace-inibitori (perc. sul totale pazienti)	52 (68%)
Ca-antagonisti (perc. sul totale pazienti)	14 (18%)
Statine (perc. sul totale pazienti)	46 (60%)
Nitrati (perc. sul totale pazienti)	57 (74%)
Sartanici (perc. sul totale pazienti)	14 (18%)
Insulina (perc. sul totale pazienti)	11 (14.2%)
Ipoglicemici orali (perc. sul totale pazienti)	14 (18%)

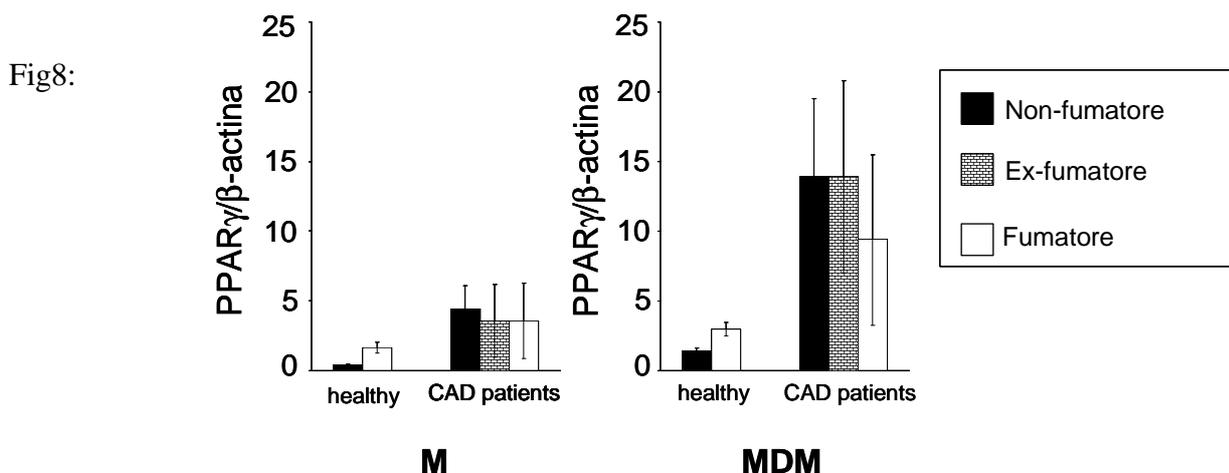
Parametri biomedici:

Angina instabile (percentuale sul totale pazienti)	34 (42%)
Glicemia	121±41

Colesterolo Tot	188±43
Colesterolo HDL	44±11
Colesterolo LDL	118±38
Trigliceridi	125±67
Fibrinogeno	421±165
PCR	0.73±0.89
Coronarie indenni (perc. sul totale pazienti)	11 (14.3%)
Coronarie compromesse: Monovasali (perc. sul totale pazienti)	29 (37.7%)
Coronarie compromesse: Plurivasali (perc. sul totale pazienti)	39 (48.2%)

A tutti i pazienti sono stati prelevati 40 cc. di sangue, da cui sono stati isolati i monociti utilizzati negli esperimenti di valutazione dell'espressione del recettore PPAR γ .

Come si può vedere dalla figura 8, l'espressione di PPAR γ nei pazienti con malattie cardiovascolari è marcatamente più elevata rispetto ai donatori sani, sia a livello di monociti che di macrofagi. Inoltre, sia nei M che negli MDM i pazienti non-fumatori esprimono di più il recettore rispetto ai pazienti non-fumatori: addirittura, negli MDM, i non fumatori hanno un incremento di 4.3 volte dell'espressione di PPAR γ , rispetto ai fumatori che aumentano l'espressione della proteina di 2.7 volte. Un ulteriore dato interessante è che gli ex fumatori hanno un andamento molto simile a quello dei fumatori se consideriamo i M, mentre hanno un notevole incremento dell'espressione di PPAR γ , paragonabile a quello dei non-fumatori, dopo il differenziamento a MDM.



Inoltre, valutando l'eventuale correlazione tra l'espressione di PPAR γ e i parametri rilevanti per le patologie cardiovascolari, quali l'indice di massa corporea (BMI: body mass index), la

colesterolemia totale, ed il risultato delle coronarografie, si è ottenuto un dato del tutto simile a quello dei pazienti precedentemente valutati.

Quindi, concludendo, con questi risultati è possibile riconfermare le valutazioni già fatte l'anno scorso, cioè che nei pazienti affetti da coronaropatie il recettore PPAR γ è costitutivamente espresso, sia nei monociti che negli MDM, ad alti livelli se comparato ai donatori sani. Inoltre nei pazienti è evidente una larga variabilità di espressione di PPAR γ in monociti e macrofagi dovuta alla variabilità individuale di ciascun paziente. Una notevole espressione di PPAR γ è presente soprattutto nei monociti dei non-fumatori, ma ancora più marcata risulta l'espressione della proteina negli MDM degli ex fumatori e dei non-fumatori, quasi a voler, ancora una volta, ribadire il suo ruolo anti-aterogenico e quindi citoprotettivo.

Infine, non sembrano esserci evidenti correlazioni tra i parametri dei pazienti presi in considerazione (diabete, BMI, livelli di colesterolo totale e risultati delle coronarografie) e l'espressione della proteina PPAR γ ; ma anche se non si osserva una significatività statistica, il BMI sembra essere correlato all'espressione del recettore PPAR γ , dato che, però, richiede ancora ulteriori conferme.

BIBLIOGRAFIA

- Bardelli C, Gunella G, Varsaldi F, Balbo P, Del Boca E, Seren Bernardone I, Amoruso A, Brunelleschi S (2005). Expression of functional NK₁ receptors in human alveolar macrophages: superoxide anion production, cytokine release and involvement of NF-κB pathway. *Br J Pharmacol* **145**: 385-396.
- Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT (2005). PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmac Sci* **26**: 244-251.
- Brunelleschi S, Bordin G, Colangelo D, Viano I (1998). Tachykinin receptors on human monocytes: their involvement in rheumatoid arthritis. *Neuropeptides* **32**: 215-223.
- Brunelleschi S, Guidotto S, Viano I, Fantozzi R, Pozzi E, Ghio P, Albera C (1996). Tachykinin activation of human alveolar macrophages in tobacco smoke and sarcoidosis: a phenotypical and functional study. *Neuropeptides* **30**: 456-464.
- Brunelleschi S, Penengo L, Lavagno L, Santoro C, Colangelo D, Viano I, Gaudino G (2001). Macrophage Stimulating Protein (MSP) evokes superoxide anion production by human macrophages of different origin. *Br J Pharmacol* **134**: 1285-1295.
- Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM (2001). PPAR-γ dependent and independent effects on macrophage gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nature Med* **7**: 48-52.
- Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Pineda Torra I, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B (1998). Activation of proliferator-activated receptors α and γ induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* **273**: 25573-25580.
- Daynes, R.A., Jones, D.C., 2002. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 748–759.
- Duval C, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Staels B (2002). The role of PPARs in atherosclerosis. *Trends Mol Med* **8**: 422-430.
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM (1995). 15-deoxy-Δ^{12,14}-prostaglandin J₂ is a ligand of the adipocyte determination factor PPARγ. *Cell* **83**: 803-812.
- Gantner F, Kupferschmidt R, Schud C, Wendel A, Hatzelmann A (1997). In vitro differentiation of human monocytes to macrophages: change of PDE profile and its relationship to suppression of tumour necrosis factor-α release by PDE inhibitors. *Br J Pharmacol* **121**: 221-231.

- Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 14, 121–141.
- Gunella G, Bardelli C, Amoruso A, Viano I, Balbo P, Brunelleschi S (2006). Macrophage Stimulating Protein (MSP) differently affects human alveolar macrophages from smoker and non-smoker patients: evaluation of respiratory burst, cytokine release and NF- κ B pathway. *Br J Pharmacol* **148**: 478-489.
- Hinz B, Brune K, Pahl A (2003). 15-Deoxy-delta^{12,14}-prostaglandin J₂ inhibits the expression of proinflammatory genes in human blood monocytes via a PPAR- γ -independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* **302**: 415-420.
- Jepsen, K., Hermanson, O., et al., 2000. Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell* 102, 753–763.
- Jiang C, Ting AT, Seed B (1998). PPAR γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* **391**: 82-86.
- Kelly, D., Campbell, J.I., et al., 2004. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat. Immunol.* 5, 104–112.
- Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkinson WO, Wilson TM, Kliewer SA (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J Biol Chem* **270**: 12953-12956.
- McKay, L.I., Cidlowski, J.A., 1999. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr. Rev.* 20, 435–459.
- McKenna, N.J., O'Malley, B.W., 2002. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108, 465–474.
- Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, Randow F, Andersson LP, Althuler D, Milstone DS, Mortensen RM, Spiegelman BM, Freeman MW (2001). The role of PPAR- γ in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nature Med* **7**: 41-47.
- Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JGA, Chen H, Evans RM (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell* **93**: 229-240.
- Neve PL, Fruchart JC, Staels B (2000). Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol* **60**: 1245-1250.
- Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerz J, Palinki W, Glass CK (1998b). Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARgamma) in human

atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7614-7619.

Ricote M, Huang JT, Welch J, Glass CK (1999). The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol* **66**: 733-739.

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK (1998a). The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391**: 79-82.

Skold CM, Lundahl J, Hallden M, Eklund A (1996). Chronic smoke exposure alters the phenotype pattern and the metabolic response in human alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol* **106**: 108-113.

Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Pineda-Torra I, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A (1998). Activation of human aortic smooth muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. *Nature* **393**: 790-793.

Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, Dannenberg AJ (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem* **276**: 12440-12448.

Taylor BV, Oudit GY, Kaalman PG, Liu P (1998). Clinical and pathophysiological effects of active and passive smoking on cardiovascular system. *Can J Cardiol* **14**: 1129-1139.

Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM (1998). PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* **93**: 241- 252.

Valkonen M, Kuusi T (1998). Passive smoking induces atherogenic changes in low-density lipoprotein. *Circulation* **97**: 2012-2016.

Valledor AF, Ricote M (2004). Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochem Pharmacol* **67**: 201-212.

Vayssier M, Favatier F, Pinot F, Bachelet M, Polla BS (1998). Tobacco smoke induces coordinate activation of HSF and inhibition of NF-kappaB in human monocytes: effects on TNF-alpha release. *Biochem Biophys Res Commun* **252**: 249-256.

SEMINARI 2005 / 2006

19 gennaio 2006– Prof.ssa Maria Grano (Dipartimento di Anatomia e Istologia, Facoltà di Medicina, Università di Bari): **Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation.**

13 febbraio 2006– Prof. Ferdinando Nicoletti (Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia, Università “La Sapienza”, Roma): **New Perspectives in Metabotropic Glutamaterceptors Neurobiology.**

15 febbraio 2006– Prof. Daniele Sblattero (Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale, Novara): **Anticorpi ricombinanti: un potente tool biotecnologico.**

20 febbraio 2006– Prof.ssa Daniela Furlan (Facoltà di Medicina, Università dell'Insubria): **Tecniche di biologia e genetica molecolare nella diagnostica del carcinoma del colon.**

13 marzo 2006– Dott.ssa Antonia Follenzi (Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale, Novara): **Il Trapianto di cellule endoteliali (LSCE) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell'emofilia.**

20 marzo 2006– Prof. Mikael Knip (Hospital for children and adolescents, University of Helsinki, Finland): **The Natural course of preclinical Type I Diabetes.**

23 marzo 2006– Dott.ssa Susanna Ceffa (Dipartimento di Oncologia,, Università di Pisa; Comunità di Sant' Egidio – DREAM Program): **La prevenzione della trasmissione verticale di HIV in Africa Sub Sahariana. L'esperienza del programma DREAM.**

6 aprile 2006- Dr Francesco Forconi (Divisione di Ematologia, Università degli Studi di Siena): **Aspetti immunogenetici e terapeutici della “hairy cell leukemia”.**

20 aprile 2006- Dott.ssa Daniela Cilloni (Divisione di Ematologia, Università di Torino- Polo S. Luigi, Orbassano): **Terapie molecolari nelle malattie mieloproliferative.**

4 maggio 2006- Prof. Mutti Luciano (Ospedale SS Pietro e Paolo, Borgosesia): **Il Mesotelioma: un modello di terapia traslazionale.**

30 maggio 2006- Prof.ssa Marialuisa Lavitrano (Università Milano Bicocca): **Sperm Mediated Gene Transfer. Storia e Applicazioni.**

27 giugno 2006- Prof.ssa Lia Rimondini (Università del Piemonte Orientale, Novara): **Osteointegrazione e superfici implantari.**

5 luglio 2006- Dott.ssa Renata Grifantini (Novartis Vaccines, Siena): **DNA and protein arrays in infection diseases: from basic research to vaccine design.**

11 settembre 2006- Prof. Dieter Broemme (University of British Columbia): **The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis.**

29 settembre 2006- Prof. Ulrich Pfeffer (Istituto Nazionale per la ricerca sul cancro -IST- Genova): **La rete di regolazione delle attività anti-angiogeniche degli interferoni.**

PUBBLICAZIONI e CONGRESSI 2005-2006

GUNELLA G, BARDELLI C, AMORUSO A, VIANO I, BALBO P & S. BRUNELLESCHI.
Macrophage-stimulating protein differently affects human alveolar macrophages from smoker and non-smoker patients: evaluation of respiratory burst, cytokine release and NF-kappaB pathway.
Br J Pharmacol. 2006 Jun;148(4):478-89. Epub 2006 Apr 24.

AMORUSO A.,BARDELLI C.,GUNELLA G.,FRESU LG.,FERRERO V.,BRUNELLESCHI S.
Quantification of PPAR- γ protein in monocyte/macrophages from healthy smokers and non-smokers: a possibile direct effect of nicotine. *Submitted settembre 2006*

BARDELLI C, AMORUSO A, GUNELLA G, FRESU LG., & S. BRUNELLESCHI. Effects of nicotine on human monocyte/macrophages in smokers and non-smokers; XII Convegno Monotematico: Nicotina, neurobiologia, neuropsicofarmacologia, 5 giugno 2006, Genova.

....e questa è Alice, la mia bimba, nata durante questo terzo anno di dottorato!!!

