

**-Università del Piemonte Orientale-**

**“Amedeo Avogadro”**

# **Individuazione di bioindicatori real-time in patologie con complicanze vascolari**

**XXV Ciclo di Dottorato in Medicina Molecolare**

***Tutor: Prof. Sandra Brunelleschi***

***Dottorando: Dott. Pasquale Lista***

## Introduzione

Lo stress ossidativo, in particolare l'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), rappresenta un fattore di rischio per le malattie con complicanze cardiovascolari (incluse l'Aterosclerosi, la Sindrome Metabolica e la Broncopneumopatia Cronico Ostruttiva). Per quanto riguarda la Sindrome Metabolica (SM) sono state proposte diverse definizioni; in particolare, nel 1989 Kaplan definì la SM con il termine di "quartetto mortale" in quanto presentava una stretta associazione tra fattori quali resistenza insulinica, alterazioni metaboliche, ipertensione arteriosa e mortalità cardiovascolare (Kaplan NM. 1989). La reale patogenesi della sindrome è rimasta ignota e per un certo tempo questa associazione di fattori di rischio è stata indicata come "Sindrome X" (Haffner SM. 1992), distinguendola con l'aggettivo "metabolica" della Sindrome X cardiaca, costituita da una malattia dei piccoli vasi miocardici. Tuttavia, questi studi costituivano un'interessante spiegazione patofisiologica di un fenomeno osservato frequentemente, cioè l'associazione di più fattori di rischio cardiovascolare nello stesso individuo. Negli anni '90, un gruppo dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (Alberti KG et al., 1998) propose la definizione di "Sindrome Metabolica" da utilizzare in ambito clinico per identificare soggetti ad elevato rischio cardiovascolare e di diabete. Qualche anno più tardi, il Third Report of the National Cholesterol Education Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults identificò un diverso numero di componenti della SM dividendoli in fattori di rischio "di base", "maggiori" ed "emergenti". I fattori "di base" sono l'obesità, l'inattività fisica ed una dieta aterogena; i secondi sono il fumo di sigaretta, l'ipertensione, gli elevati livelli di colesterolo associato a lipoproteine a bassa densità (LDL), l'anamnesi familiare per malattia cardiaca precoce e l'invecchiamento; ed, infine, i fattori "emergenti" sono l'ipertrigliceridemia, l'aumento delle LDL, l'insulino-resistenza, l'intolleranza glicemica, lo stato pro-infiammatorio e pro-trombotico (Grundy SM et al., 2004).

Studi recenti hanno identificato numerosi biomarcatori, infiammatori e non, che sembrerebbero correlati con un aumentato rischio cardiovascolare. In particolare, alti livelli plasmatici della proteina C reattiva, delle LDL ossidate (oxLDL), dell'omocisteina e del fibrinogeno; aumentata velocità di sedimentazione eritrocitaria e la produzione della citochina infiammatoria interleukina 6 (IL-6). Nel corso degli anni è stato anche ipotizzato, e confermato da numerosi studi, il ruolo chiave giocato dall'adesione cellula-cellula come meccanismo più generale coinvolto nell'occlusione vascolare. Dati precedentemente ottenuti dal nostro gruppo evidenziano che i radicali liberi e le specie reattive, quali il perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>), sono in grado di alterare sia la plasticità eritrocitaria, fondamentale per il mantenimento della forma e della funzionalità di questa cellula,

che l'espressione di alcune molecole quali la fosfatidilserina (fosfolipide di membrana coinvolto nella morte programmata del globulo rosso) e la Glicoforina A (proteina coinvolta nell'invecchiamento del globulo rosso).

## **Scopo**

Lo scopo di questo studio è quello di individuare bioindicatori predittivi innovativi che, in tempo reale, possano essere predittivi sia dell'evoluzione della SM che, qualora i pazienti affetti da questa patologia fossero sottoposti a cura, della risposta ad un eventuale trattamento farmacologico.

A tal proposito, in questo primo anno di dottorato, è stato iniziato uno studio pilota *ex vivo* sul sangue periferico di pazienti con SM ed i risultati ottenuti sono stati messi a confronto con quelli provenienti da donatori sani, considerati come controlli. Lo studio è stato focalizzato sulle differenze di genere (gender-differences) al fine di individuare percorsi diagnostici e terapeutici mirati ad un miglioramento dell' "outcome" clinico anche attraverso l'apporto di cure differenziali.

## **Materiali e metodi**

### ***Studio della popolazione***

Per il seguente studio verranno e, in parte, sono stati arruolati presso il Dipartimento di Scienze Cardiovascolari e Respiratorie del Policlinico Umberto I di Roma, 60 pazienti con diagnosi di SM e 40 donatori sani, entrambi informati e consenzienti. Nello stesso studio verranno inclusi soggetti di entrambi i sessi, di età compresa tra i 35 e i 75 anni. Sia i pazienti che i donatori sani sono stati e/o saranno sottoposti ad esami clinici di laboratorio per la valutazione dei livelli plasmatici di: Colesterolo totale, Colesterolo HDL, Colesterolo LDL, Trigliceridi, Glicemia, Fibrinogeno e Proteina C reattiva (PCR).

### ***Isolamento degli eritrociti e del plasma***

Per ogni soggetto è stato effettuato un prelievo di 10 ml di sangue venoso in provette rivestite di eparina. Le cellule del sangue sono state separate mediante centrifugazione per 15 min a 900 rpm. Dopo la separazione, il plasma è stato aliquotato e congelato a -80°C fino al momento dell'analisi. Gli eritrociti sono stati lavati per tre volte con una soluzione tampone fosfato (PBS, pH 7.4) mediante centrifugazione.

### ***Analisi morfometrica***

Prima di procedere con la separazione della componente corpuscolata del sangue, 20 µl di sangue sono stati prelevati ed utilizzati per effettuare uno striscio su vetrino destinato all'analisi morfologica mediante microscopia ottica. La forma alterata degli eritrociti è stata valutata contando al microscopio ottico 50 eritrociti per 20 campi differenti ad un ingrandimento 1000x. Ogni campione è stato contato in triplicato.

### ***Analisi citometriche***

#### *Determinazione della fosfatidilserina*

La valutazione quantitativa della esternalizzazione della fosfatidilserina è stata effettuata su cellule vive mediante citometria a flusso utilizzando l'annessina V-coniugata con fluorosceina isotiocianato (FITC) (Marine Biological Laboratori, Woods Hole, MA, USA). Gli eritrociti sono stati prima lavati con un tampone contenente calcio e poi colorati come segue: 1 ml di pellet è stato diluito nella stessa soluzione tampone utilizzata per i lavaggi (diluizione 1:300) ed incubato con annessina V-FITC alla concentrazione 1 mg/ml. L'incubazione è stata effettuata per 10 minuti a temperatura ambiente ed al buio. Infine, i campioni sono stati analizzati mediante citometria a flusso FACScan. Per ogni campione sono stati acquisiti almeno 20.000 eventi. I valori mediani degli istogrammi di fluorescenza, sono stati usati per fornire un'analisi semiquantitativa.

#### *Determinazione della glicoforina A*

Per la determinazione della glicoforina A gli eritrociti sono stati lavati 3 volte in PBS ed incubati per 40 minuti a 4°C con l'anticorpo monoclonale anti-glicoforina A coniugato con FITC (Dako, Glostrup, Danimarke Chemicon Australia). Come controllo negativo è stata utilizzata una appropriata immunoglobulina FITC-coniugata.

Per l'analisi in citometria statica i campioni sono stati montati su vetrini portaoggetti con PBS-glicerolo (2:1) ed osservati mediante microscopia a fluorescenza con apparecchio Nikon Microphot, collegato ad una videocamera a colori (Carl Zeiss GmbH, Jena, Germania). Le immagini sono state acquisite utilizzando il software OPTILAB (Graftek, Mirmank, Francia).

Per l'analisi quantitativa mediante citometria a flusso i campioni sono stati analizzati con un citometro a flusso FACScan. Per ogni campione sono stati acquisiti almeno 20.000 eventi. I valori mediani degli istogrammi di fluorescenza, sono stati usati per fornire un'analisi semiquantitativa.

#### *Determinazione del CD47 e della P-selectina*

Per l'analisi citometrica gli eritrociti, dopo tre lavaggi in PBS, sono stati fissati con paraformaldeide al 3.7% in PBS (pH 7.4) per 30 minuti a temperatura ambiente; lavati tre volte con lo stesso tampone e permeabilizzati con Triton X-100 allo 0.5% in PBS per 5 minuti.

Per la determinazione del CD47 gli eritrociti sono stati marcati con un anticorpo monoclonale anti-CD47 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Dopo 30 minuti d'incubazione a 37°C i campioni sono stati lavati 3 volte in PBS ed incubati per 30 minuti a 37°C con un anticorpo secondario anti-mouse IgG (Sigma Chemical Co). Gli eritrociti incubati solo con l'anticorpo secondario sono stati utilizzati come controlli negativi.

Lo stesso protocollo è stato eseguito per la determinazione della P-selectina. Infine, dopo tre lavaggi in PBS i campioni sono stati analizzati mediante citometria statica ed a flusso.

Per l'analisi in citometria statica i campioni sono stati montati su vetrini portaoggetti con PBS-glicerolo (2:1) ed osservati mediante microscopia a fluorescenza con apparecchio Nikon Microphot, collegato ad una videocamera a colori (Carl Zeiss GmbH, Jena, Germania). Le immagini sono state acquisite utilizzando il software OPTILAB (Graftek, Mirmand, Francia).

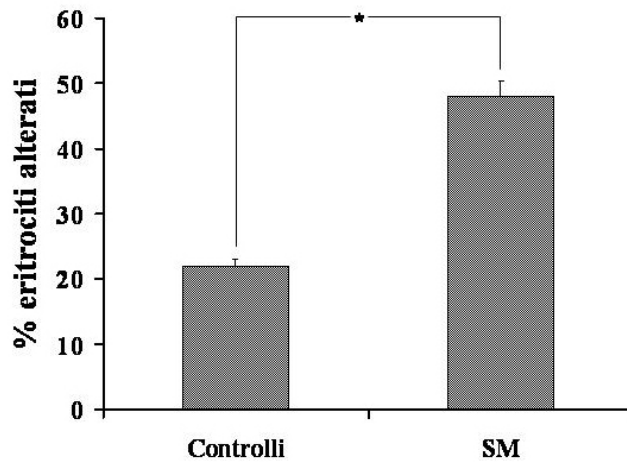
Per l'analisi quantitativa mediante citometria a flusso i campioni sono stati analizzati con un citometro a flusso FACScan. Per ogni campione sono stati acquisiti almeno 20.000 eventi. I valori mediani degli istogrammi di fluorescenza, sono stati usati per fornire un'analisi semiquantitativa.

## **Risultati**

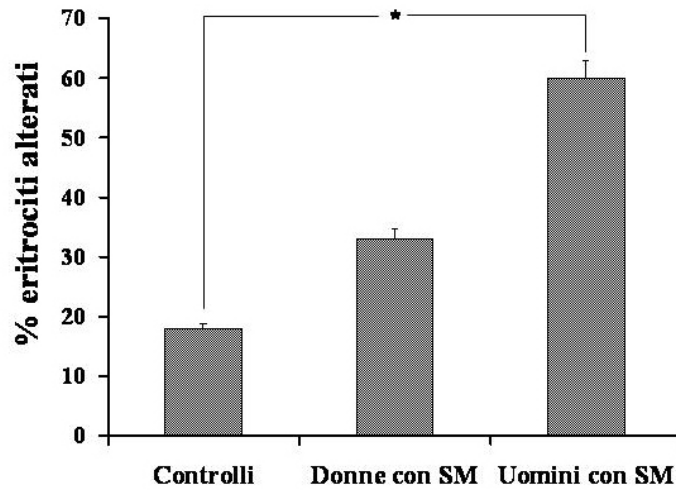
Il mantenimento della forma, l'elasticità e la deformabilità sono prerequisiti essenziali per il funzionamento del globulo rosso. Infatti, globuli rossi che presentano una normale forma biconcava tendono ad "impilarsi" ed a passare nel sistema circolatorio in maniera ordinata e sequenziale. Se la morfologia del globulo rosso cambia, anche la sua capacità di aderire o di formare aggregati cambia, contribuendo così ad un danno vascolare (Minetti M et al., 2007). Per verificare se anche nelle SM il globulo rosso possa essere considerato come marker prognostico e/o di progressione, abbiamo utilizzato un test semplice, quale lo striscio di sangue su vetrino, che ci ha permesso di valutare sia la morfologia che le capacità adesive ed aggregative del globulo rosso.

Abbiamo osservato che nei pazienti con SM il globulo rosso perde la sua struttura di disco biconcavo ed assume quella di leptocita (disco piatto) o acantocita (eritrocita con protuberanze di superficie). Inoltre, è emerso che nei pazienti con SM vi è una maggiore percentuale di eritrociti alterati rispetto ai pazienti sani (**Fig. 1A**).

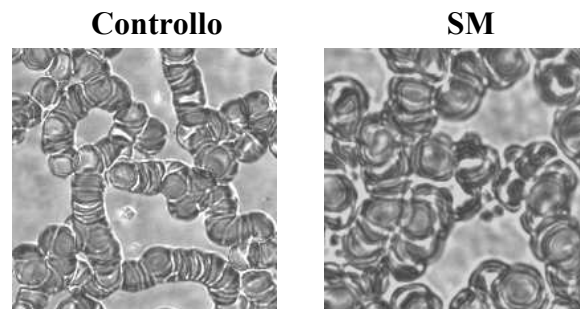
**A**



**B**



**C**



**Fig.1.** (A) I globuli rossi dei pazienti con SM presentano, rispetto a quelli dei donatori sani, un'alterazione della morfologia significativa ( $p < 0.01$ ). I dati riportati nell'istogramma rappresentano la media delle percentuali di cellule alterate osservate al microscopio ottico sia dei donatori sani che nei pazienti con SM. (B) I globuli rossi degli uomini con SM presentano, rispetto a quelli delle donne, una percentuale di eritrociti alterati significativamente più alta ( $p < 0.01$ ). (C) Due immagini rappresentative ottenute al microscopio ottico di eritrociti provenienti da un donatore sano e da un paziente con SM (1000x).

Ancora più interessante è stato il confronto tra pazienti uomini e donne, in cui si evince che gli uomini presentano un globulo rosso maggiormente alterato rispetto alle donne (**Fig. 1B**).

In particolare, negli uomini gli eritrociti tendono ad aderire al substrato, mentre nelle donne si assiste alla formazione di aggregati; quest'ultimo dato suggerisce una maggiore predisposizione per la donna a formare il trombo.

Allo scopo di verificare se le alterazioni morfologiche riscontrate nei globuli rossi dei pazienti con SM potessero essere seguiti da invecchiamento nonché da morte, siamo andati a valutare due marker: la glicoforina A e l'esternalizzazione della fosfatidilserina.

La glicoforina A è una sialoglicoproteina espressa sulla membrana degli eritrociti. Ha un peso molecolare di 30 kDa. L'estremità della glicoforina A che porta gli zuccheri è localizzata sulla superficie esterna della membrana eritrocitaria, formando una proiezione a cespuglio. Il segmento medio idrofobico si sviluppa attraverso il doppio strato lipidico. L'altra estremità, rappresentata da residui aminoacidici molto polari e carichi negativamente, sporge nel citosol. Questa proteina è stata studiata come marker di senescenza cellulare (Cohen NS et al., 1976; Reid ME et al., 2004; Lutz HU et al., 1979).

L'esternalizzazione della fosfatidilserina, rappresenta un tipico marcatore precoce di apoptosi in cellule nucleate. Essa è stata recentemente descritta come un chiaro indice di danno cellulare anche nelle cellule eritrocitarie in patologie ematiche, quali ad esempio l'anemia falciforme (Boas FE et al., 1998; Piagnerelli M et al., 2003). Sebbene nel globulo rosso, privo di mitocondri e nucleo, parlare di apoptosi risulti paradossale, in quanto sono cellule che mancano di alcuni regolatori mitocondriali quali caspasi -9, Apaf-1 e citocromo c che giocano un ruolo cardine nell'apoptosi delle cellule nucleate, gli eritrociti rappresentano un interessante modello cellulare per lo studio del *pathway* apoptotico a livello della membrana plasmatica (Berg CP et al., 2001). La fosfatidilserina, rappresentando così un fenomeno tipico del processo apoptotico, contribuisce alla riduzione dell'emivita degli eritrociti difettosi (De Jong K et al., 2001; Steinberg MH et al., 2003) e successivamente alla rimozione dal circolo, ogni volta che tale molecola è espressa in superficie. Essa può, inoltre, alterare alcune funzioni del globulo rosso quali la coagulazione e l'aggregabilità (Schlegel RA et al., 2001).

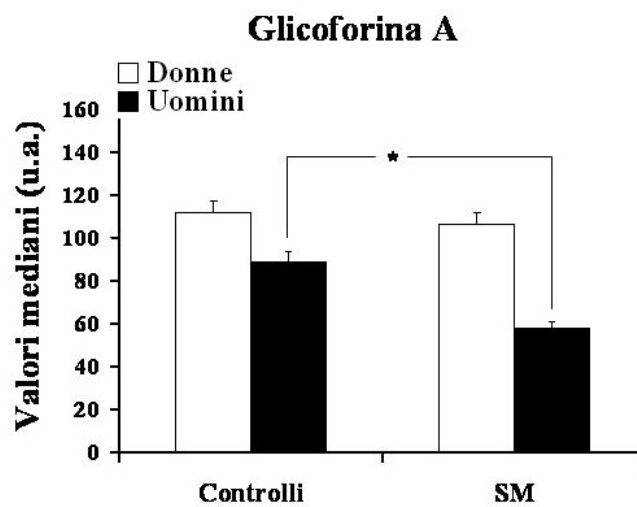
Il globulo rosso presenta sulla sua superficie una proteina, il CD47, che ha un ruolo di "marker of self" in quanto assicura alla cellula la sopravvivenza. Infatti, quando la sua espressione tende a diminuire fino a ridursi totalmente, la cellula non è più riconosciuta come elemento del nostro corpo ed è così fagocitata dai macrofagi attivati. Il CD47, conosciuto anche come proteina associata alle integrine, è una glicoproteina con un peso molecolare di 50 kDa, costituita da un dominio

glicosilato extracellulare immunoglobulinico (IgV), da 5 domini transmembrana e da una coda citoplasmatica.

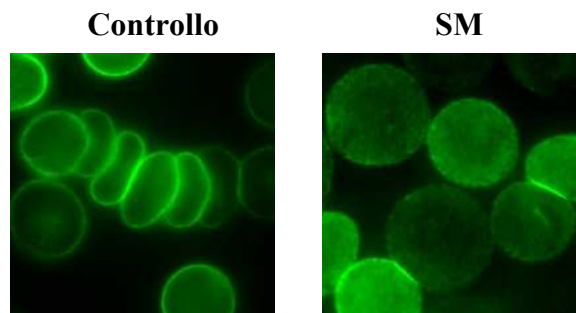
I primi dati ottenuti hanno evidenziato come l'espressione della Glicoforina A nei globuli rossi diminuisce in modo significativo negli uomini con SM rispetto ai donatori sani, mentre non si evidenzia alcuna differenza in quelli delle donne. Invece, l'espressione del CD47 diminuisce significativamente negli eritrociti degli uomini con SM rispetto a quelli delle donne. Infine, negli uomini con SM la fosfatidilserina esternalizzata risulta più alta rispetto ai donatori sani e rispetto alle donne.

Questi primi risultati suggeriscono che negli uomini con SM il globulo rosso non solo invecchia (diminuisce l'espressione di Glicoforina A, **Fig. 2A, B**), ma viene eliminato dal circolo o per fagocitosi (dovuta alla diminuzione sulla superficie della proteina self CD47, **Fig. 3A, B**) o secondo meccanismi correlati con l'apoptosi (aumento dell'espressione della fosfatidilserina, **Fig. 4**). In particolare, l'aumento dell'esternalizzazione della fosfatidilserina è maggiore nei globuli rossi dell'uomo (**Fig. 4**). Tali alterazioni mettono in evidenza un globulo rosso più invecchiato che, in questi pazienti, potrebbe contribuire alla formazione della placca ateromatosa.

**A**



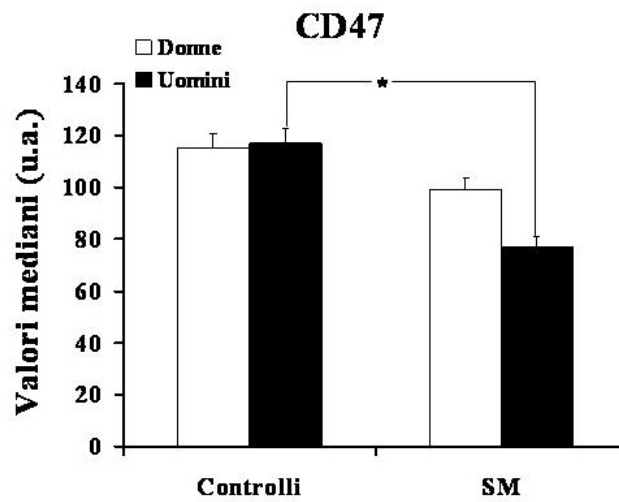
**B**



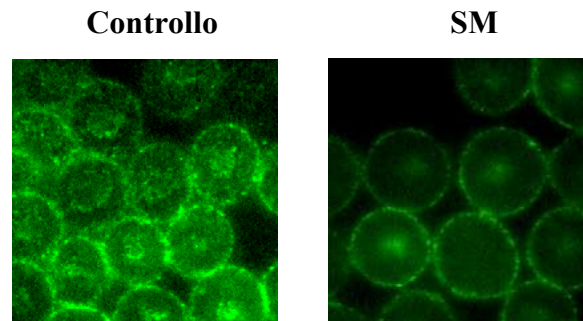
**Fig. 2.** (A) Istogramma dell'espressione della Glicoforina A sugli eritrociti, in cui si evince una diminuzione significativa ( $p < 0,01$ ) nei pazienti con SM rispetto ai controlli. Inoltre, questi dati evidenziano anche una differenza di genere. (B) Due immagini rappresentative ottenute al microscopio a fluorescenza di eritrociti provenienti da un donatore sano e da un paziente con SM (1500x).



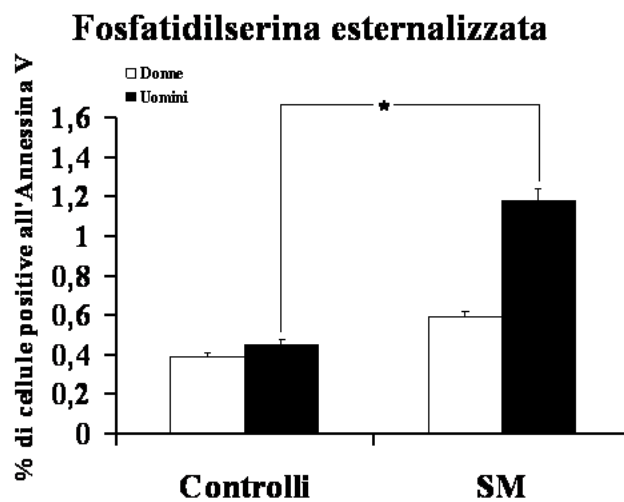
A



B



**Fig. 3.** (A) Istogramma dell'espressione della proteina CD47. Negli uomini con SM l'espressione di CD47 sugli eritrociti diminuisce significativamente ( $p < 0,01$ ). (B) Due immagini rappresentative ottenute al microscopio a fluorescenza di eritrociti provenienti da un donatore sano e da un paziente con SM (1500x).



**Fig. 4.** Fosfatidilserina esternalizzata. Negli uomini con SM la positività all'Annexina degli eritrociti aumenta significativamente ( $p < 0,01$ ) rispetto ai controlli e rispetto alle donne con SM.

Sulla base di questi dati preliminari si può concludere sottolineando l'importanza della differenza di genere nell'evoluzione della sindrome metabolica e delle patologie cardiovascolari, considerando il

globulo rosso come valido bioindicatore di progressione di tali patologie. Tuttavia, verranno effettuati approfondimenti ulteriori al fine di identificare biomarker utili come strumenti di predizione e di stratificazione della popolazione a forte rischio di patologie con complicanze cardiovascolari.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Alberti KG, Zimmet PZ. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its implications. Part 1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*; 15:539-53.
- Berg CP, Engels IH, Rothbart A, Lauber K, Renz A, Schlosser SF, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S. (2001). Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ*; 8:1197-1206.
- Boas FE, Forman L, Beutler E. (1998). Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95:3077-81.
- Cohen NS, Ekholm JE, Luthra MG, Hanahan DJ. (1976). Biochemical characterization of density-separated human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*; 419:229-42.
- De Jong K, Emerson RK, Butler J, Bastacky J, Mohandas N, Kuypers FA. (2001). Short survival of phosphatidylserine-exposing red blood cells in murine sickle cell anemia. *Blood*; 98:1577-84.
- Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C. (2004). Definition of the metabolic syndrome. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation*; 109:433-8.
- Haffner SM. (1992). Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes*; 41:715-22.
- Kaplan NM. (1989) The Deadly Quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med*; 149:1514-20.
- Lutz HU, Fehr J. (1979). Total sialic acid content of glycoporphins during senescence of human red blood cells. *J Biol Chem*; 254:11177-80.
- Minetti M, Agati L, Malorni W. (2007). The microenvironment can shift erythrocytes from a friendly to a harmful behaviour: pathogenetic implications for vascular diseases. *Cardiovasc Res*; 75:21-8.

- Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Brohee D, Piro P, Carlier E, Vincent JL, Lejeune P, Vanhaeverbeek M. (2003). Alterations of red blood cell shape and sialic acid membrane content in septic patients. *Crit Care Med*; 31:2156-62.
- Reid ME, Storry JR. (2004). Low-incidence MNS antigens associated with single amino acid changes and their susceptibility to enzyme treatment. *Immunohematol*; 13:76-81.
- Schlegel RA, Williamson P. (2001). Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Diff*; 8:551-63.
- Steinberg MH, Brugnara C. (2003). Pathophysiological-based approaches to treatment of sickle cell disease. *Annu Rev Med*; 54:89-112.

### **PARTECIPAZIONI A CONVEGNI E SEMINARI**

1. Convegno PREVENIRE LE COMPLICANZE DEL DIABETE: DALLA RICERCA DI BASE ALL'ASSISTENZA organizzato da ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'; Roma, 18 e 19 Febbraio 2010.
2. International Congress RARE DISEASES AND ORPHAN DRUGS organizzato da ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA' (Centro Malattie Rare); Roma, 22- 25 Febbraio 2010.
3. Seminario: "Manteniamoci (i mitocondri) in forma! Una questione di vita o di morte" tenuto dal Prof. Luca Scorrano presso l'Università degli Studi di Roma "La Sapienza"; Roma, 4 Maggio 2010.
4. Seminario: "The Role of Aldosterone in Vascular Function and Disease: Lessons from Clinical Trials" and "The Power and Promise of Proteomics and Biomarker Discovery". Tenutosi presso l'IRCCS San Raffaele Pisana di Roma, il 12 Maggio 2010.
5. Convegno "Contributi delle Microscopie allo Sviluppo delle Nanotecnologie in Campo Biomedico: Nanodrug Delivery". Organizzato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) in collaborazione con la Società Italiana di Scienze Microscopiche (SISM); tenutosi presso l'Istituto Superiore di Sanità di Roma, il 12 Maggio 2010.
6. Convegno "Resveratrolo e dintorni: prospettive terapeutiche future". Organizzato dal Dip. di Tecnologie e Salute – Istituto Superiore di Sanità di Roma, il 22 Giugno 2010.

## **PUBBLICAZIONI**

1. Straface E, Lista P, Gambardella L, Franconi F, Malorni W. Gender-specific features of plasmatic and circulating cell alterations as risk factors in cardiovascular disease. *Fundam Clin Pharmacol*. 2010 Jul 15. [Epub ahead of print]
2. Straface E, Gambardella L, Canali E, Metere A, Gabrielli N, Arcieri R, Mattatelli A, Lista P, Agati L, Malorni W. P-Selectin as a new gender associated biomarker in patients with metabolic syndrome. *Int J Cardiol*. 2010 Jun 13. [Epub ahead of print]