

E' UTILE CONOSCERE LE β_2 -INTEGRINE?

Proposta per affrontare il difficile rapporto fra Endotelio e Ossigeno iperbarico

Prof. G. Vezzani

ARCHIVIO RUOCCO

Presidente S.I.M.S.I. - Primario Serv. Anestesia - Rianimazione Osp. Fidenza

Le attuali conoscenze circa le interazioni fra OTI e funzioni endoteliali permettono di distinguere tre aspetti diversi e intricati fra loro:

- 1) Funzione endocrina
- 2) Risposta anticoagulante dell'endotelio
- 3) Adesività endoteliale

Funzione endoteliale endocrina

La funzione protettiva dell'endotelio si compie, tra l'altro, con la sintesi in modo paracrino di sostanze quali Endotelina (ET), Prostaciclina (PGI_2) e ossido nitrico (NO). Mentre per queste sostanze è documentato un qualche legame con la OTI, per quanto ancora da confermare per le ET, la letteratura non offre dati circa il rapporto OTI e Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDRF), un presumibile metabolita labile dell'acido arachidonico formatosi dal P-450 (1).

L'endotelio pertanto produce almeno quattro sostanze di cui tre in grado di produrre rilassamento della muscolatura liscia perivascolare (PGI_2 , NO e EDHF) e una (ET) in grado di provocare contrazione di tale muscolatura.

I dati di Rocco (2), per quanto non confermati da Scardia, (3), (4) inducono a ritenere che l'esposizione all'iperossia iperbarica possa incrementare la sintesi delle ET almeno in volontari sani. Le ET (ET-1, ET 2, ET-3) sono peptidi vasoconstrictori consistenti in residui di 21 aminoacidi con due ponti sulfidrilici. Le ET sono prodotte da vari tessuti, le cellule endoteliali producono solo la ET-1 attraverso una via costitutiva tramite naturalmente un meccanismo trascrizionale. Le ET sono prodotte in pre-pro-forma, quindi per intervento proteolitico prima, e poi per intervento di una metallo-endopeptidasi, endothelin-converting enzyme (ECE), si crea la forma attiva. Gli stimoli attualmente noti per la produzione di ET sono l'adrenalina, le endotossine batteriche, trombina angiotensina II, TGF- β (Tra-

sforming Growth Factor), che agiscono con l'intermediazione di attivatori proteici quali AP-1, con l'intervento di proto-oncogeni C-Jun e C-Fos in un tipico TATAA box nell'up-stream genico. Da sottolineare fra i fattori modulanti la sintesi di ET-1, lo stress meccanico. Stimoli lievi di trazione e torsione, 5 dyne/cm², sono in grado di favorire l'espressione genica di ET-1, mentre stimoli più intensi di 20 dyne/cm², riducono la produzione di ET-1.

Sono stati identificati due recettori ET_A e ET_B specifici per le ET. Il primo specifico per le ET-1 e ET-2, con bassa affinità per ET-3, è distribuito in molti tessuti fra cui le cellule muscolari lisce perivascolari. ET_B lega ugualmente le tre ET, è presente nelle cellule endoteliali, e in altri tessuti. Si ritiene che ET_A nelle cellule muscolari perivascolari sia mediatore degli effetti vasoconstrictori paracrini di ET-1, mentre ET_B nelle cellule endoteliali sia mediatore degli effetti autocrini di ET-1 con rilascio di NO e PGI_2 .

A concentrazioni nanomolari ET attivano la fosfolipasi C, inducendo la formazione di inositolo trifosfato con conseguente temporaneo incremento della concentrazione di Ca^{2+} nel citosol. A ciò segue un duratura contrazione delle cellule muscolari perivascolari. Visto il significato complessivamente modulante dell'azione di ET sull'endotelio è indubbiamente difficile individuare in questa solo peptide l'agente primario della vasocostrizione iperossica.

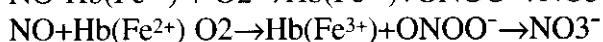
Nell'ambito della funzione endocrina dell'endotelio, fra le sostanze non peptidiche ad azione vasorilassante sono da includere NO e PGI_2 .

NO è un radicale libero (NO) allo stato gassoso, generato da ossido nitrico sintetasi (NOS) attraverso la ossigenazione di uno degli atomi di azoto del residuo guanidinico della L-arginina. La emivita di NO è di pochi secondi. E' inattivato da O_2 molecolare, emoglobina (5). E' potenziato da enzimi ad azione "scavenger" in partico-

lare superossido-dismutasi. Sono state identificate tre forme di NOS: cerebrale, endoteliale e inducibile (iNOS). Per le loro caratteristiche le prime due sono considerate costitutive (cNOS).

La struttura primaria di iNOS e cNOS si assomiglia solo nella sequenza ad azione reduttasica simile a quella del Cit. P-450 reduttasi. In particolare cNOS presenta le seguenti caratteristiche: a) il gruppo N-terminale interagisce con l'acido miristico (miristoilazione) e tramite questo si salda alla parete cellulare, b) NADPH dipendente, c) E' inibita da analoghi della L-arginina, d) Ca^{2+} /calmodulina dipendente, e) Rilascia NO nella quantità di picomoli, f) Ha azione di breve durata, g) Resistente all'azione dei glucocorticoidi.

La iNOS presenta solo le caratteristiche di cui alle lettere b,c, per cui si ritiene che l'azione di cNOS si svolga vicino alla membrana citoplasmatica, visto il processo di miristoilazione, e che iNOS sia citosolica. Caratteristiche peculiari di iNOS sono: rilascia NO nella quantità di nanomoli, e quindi è 1000 volte più attiva di cNOS, è inibita dai glucocorticoidi, ha azione di lunga durata, inoltre mentre cNOS è stimolata da molte sostanze Ach, bradichinina, 5-idrossitriptamina, trombina, etc, iNOS è stimolata essenzialmente da LPS e γ -IFN. Infatti mentre per cNOS lo stimolo ipotensivo (ad es. Ach) provoca ingresso di Ca^{2+} che aderisce alla calmodulina attivando in tal modo sia l'enzima ma anche una protein-chinasi Ca/calmodulina dipendente che fosforila la cNOS inattivandola, e pertanto si ottengono solo "pouf" di NO, la iNOS non è Ca/calmodulina sensibile e viene lentamente fosforilata da proteasi cellulari aspecifiche. Il meccanismo d'azione di NO si ritiene consista, sommariamente, nell'attivazione della guanilato ciclasi solubile, a cui è associato un incremento nella cellula muscolare liscia di GMP che a sua volta induce una sequenza di fosforilazioni proteiche associate a rilassamento delle cellule muscolari perivascolari. Compiuto, fra i tanti, questo compito di messaggero intercellulare, NO viene inattivato in vari modi:



naturalmente vi sono altre vie di inattivazione,

tuttavia quelle sopra riportate sembrano essere quantitativamente le più rappresentative e tutte portano al nitrato (NO_3^-). Il rapporto fra nitrati e NO è valutato nel paziente settico (6), e normalmente si verifica un incremento di nitrato plasmatico nel paziente rispetto a valori di riferimento in soggetti sani.

Nella letteratura medica NO è messo in relazione alla OTI come eventuale sostanza favorente la tossicità cerebrale dell'ossigeno (7), si sottolinea l'azione anti NO della OTI sul rilasciamento muscolare perivascolare (8) oppure viene dosato nell'espriato di ratti sottoposti ad iperossia iperbarica come indice di stress iperossico (in tal caso NO è di derivazione macrofagica) (9).

Abbiamo dosato i nitrati in 20 volontari sani, consenzienti, informati e esperti dell'ambiente iperbarico, tenuti a rigoroso digiuno nelle 12 ore precedenti. I volontari sono stati esposti a 2.8 ATA per 60', $Fi O_2 = 100\%$. Sono stati fatti prelievi di sangue per il dosaggio dei nitrati prima della compressione (T0), 30' e 60' dopo l'inizio della compressione (T1) e (T2) e 30' dopo la fine della compressione (T3).

I nitrati sono stati dosati con spettrofotometria mediante reattivo di Griess con banda massima di assorbimento a $\lambda_{max} = 540 \text{ nm}$.

Dal valore basale T0 di 29 $\mu\text{moles/ml}$, il valore dei nitrati è sceso a 19 $\mu\text{moles/ml}$ a T2 con $p < 0.05$, per risalire poi verso il valore basale a T3.

Noi riteniamo che questa riduzione dei nitrati plasmatici determinata a T2 sia da ricercare nella inibizione della sintesi di NO. I possibili meccanismi di inibizione, per il momento assolutamente ipotetici, possono riguardare:

1) Ossidazione dei gruppi sulfidrilici della cisteina nella struttura primaria proteica dell'enzima.

2) Incremento della secrezione dei glucocorticoidi come conseguenza dell'increzione di ACTH durante trattamento OTI, e blocco selettivo di iNOS.

3) Inibizione della sintesi di RNAm sia per cNOS che iNOS

4) Ossidazione dei doppi legami dell'acido miristico e incapacità della cNOS di aderire alla membrana periplasmatica e quindi sua inibizione.

Con questo dato, per adesso ottenuto solo in persone sane, è possibile aggiungere un elemen-

to conoscitivo in più sul fenomeno della vasocostrizione iperossica, oltrechè avere a disposizione un farmaco in grado di controllare, se il dato verrà confermato nei pazienti settici, la sintesi di NO. In una nostra sperimentazione tuttora in corso, in tre pazienti settici per infezioni gravi dei tessuti molli e in trattamento OTI, abbiamo potuto dimostrare che al termine del periodo iperossico i livelli di nitrati si riducevano sensibilmente nei due pazienti guariti, mentre il terzo paziente, deceduto per fascite necrotizzante, non solo presentava livelli molto elevati di nitrati ma questi erano del tutto insensibili al trattamento ossiperbarico.

Funzione endoteliale anticoagulante

Tutti i sistemi anticoagulanti endogeni sono resi attivi nell'endotelio. La PGI₂, il recettore eparinoide AT-III e il sistema recettoriale Trombomodulina.

Per quanto i dati riguardanti trombogenesi, trombolisi, emostasi e OTI non siano molto consistenti, è stata dimostrata in iperossia iperbarica un aumento dell'attività fibrinolitica (10), ma anche un incremento dei livelli di fibrinogeno (11), le interazioni fra NO, ET e PGI₂, meritano tuttavia un approfondimento.

PGI₂ ha azione vasodilatante, inibisce la espressione dei recettori piastrinici e la proliferazione delle cellule muscolari lisce perivascolari. Queste ultime due azioni sono sostenute sinergicamente con NO, ma non la vasodilatazione. PGI₂ può essere considerata filogeneticamente come modulatore più giovane di NO nel controllo del tono vascolare (12). Nella cellula endoteliale l'interazione tra ET e ET_B produce stimolazione della cicloossigenasi e sintesi di PGI₂ dall'acido arachidonico. PGI₂, fra l'altro, induce la sintesi di AMPc con inibizione di una protein-chinasi indispensabile per la espressione genica di ET-1 attivata da Trombina e Ang II con adesione all'apposito recettore endoteliale (13).

E' stato documentato un incremento dei livelli di PGI₂ sia nel circolo polmonare (14) che al di fuori del circolo polmonare a diverse esposizioni all'ossigeno iperbarico (15).

Oltre al ruolo endocrino e strettamente congiunto con questo, è compito fondamentale dell'endotelio controllare l'adesione e l'aggregabilità piastrinica, dei macrofagi e dei polimorfo-

nucleati.

Funzione dell'adesività endoteliale

Vi sono almeno tre classi di recettori che promuovono l'aderenza di varie cellule circolanti all'endotelio: le Integrine, le Glicoproteine Ig-like, e le Selectine.

Le Integrine costituiscono una famiglia di 14 eterodimeri appaiati in subunità α e β . La sottofamiglia delle β_2 -integrine è composta da tre complessi di adesione chiamati comunemente: CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18, altra nomenclatura prevede dal primo al terzo complesso: LFA-1, MAC-1 e GP150,95 rispettivamente. La catena β (CD/18) è comune ai tre gruppi, mentre varia la catena α . CD 11 a/CD 18 è tipicamente espresso sui linfociti ed è coinvolto nella adesività dei linfociti T. CD11b/CD18 è espresso sui neutrofili e quindi è recettore primario della loro adesività, e con le attuali conoscenze è considerato il recettore più importante. CD11c/CD18 è il recettore meno noto ma comunque implicato nella adesività leucocitaria di monociti e neutrofili. Le β_2 -integrine sono normalmente espresse nei leucociti, pertanto la loro comparsa sulla superficie cellulare potrebbe dipendere dal processo di attivazione della cellula sostenuto da chemotaxine, esteri del forbolo, frazione del complemento C5a. In particolare potrebbe esistere un meccanismo di rilascio di β_2 -integrine da granuli perossidasi negativi intracellulari verso la superficie cellulare (16). E' opportuno segnalare anche l'esistenza di β_1 -integrine, composte da una catena β e da una subunità definita α_4 che assieme assemblano la VLA-4, proteina di aggregazione (Very Late Activated), tipicamente espressa sui linfociti nei processi infiammatori cronici. Non sono noti al momento effetti dell'ossigeno iperbarico su VLA-4.

Le Glicoproteine Ig-like sono catene di 90-100 aminoacidi stabilizzate da legami sulfidrilici. Sono espresse solo dalle cellule endoteliali e sono note come Intercellular Adhesion Molecules 1 e 2, ICAM-1 e ICAM-2, quest'ultima è solo un frammento di ICAM-1, e Vascular Cell Adhesion Molecule 1, VCAM-1. La espressione sulla superficie endoteliale di queste proteine è incrementata da TNF, LPS, IL-1, e γ -INF. Vi sono dati (17) che documentano come ICAM 1 e 2 siano i ligandi naturali delle β_2 -integrine.

Le selectine sono così chiamate perchè contengono un gruppo con N-terminale simile a quello delle lectine. Si conoscono tre tipi di selectine: Leukocyte Adhesion Molecule, LAM-1, che si trova sulla superficie cellulare di neutrofili, monociti e linfociti, Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule, ELAM-1, è sintetizzata dalle cellule endoteliali in risposta alle citochine infiammatorie TNF e IL-1. Infine "granule membrane protein 140" (GMP 140) sono granuli proteici contenuti nelle piastrine e nelle cellule endoteliali, a seguito dello stimolo infiammatorio, soprattutto da parte della Trombina, i granuli si fondono con la membrana citoplasmatica e GMP-140 si distribuisce sulla superficie cellulare.

Alcune recenti ricerche (18, 19, 20, 21, 22) documentano una azione inibente della OTI sulla adesività dei polimorfonucleati, per inibizione della funzione delle β_2 -integrine. Il meccanismo viene interpretato(20) come la ossidazione di componenti la membrana leucocitaria con riduzione della sintesi di cGMP indispensabile per la funzione delle β_2 -integrine. Su questo dato viene spiegato anche l'effetto favorevole dell'impiego della OTI nella sindrome da ischemia/riperfusionne (21), oltrechè la sua azione protettiva nei confronti del microcircolo. Non è comunque ancora chiarito l'effettivo meccanismo di interazione dell'ossigeno iperbarico con la funzione delle β_2 -integrine. Infatti (23) è stato dimostrato che l'adesività leucocitaria non risente della deplezione di β_2 -integrine dai granuli endocellulari perossisomi negativi e pertanto può non essere necessaria una modificazione della loro espressione sulla superficie cellulare, mentre è stato documentato già da tempo (24) la possibile formazione di aggregati di CD11b/CD18 nel piano della membrana cellulare in risposta ai numerosi stimoli che attivano i neutrofili.

E' importantissimo sottolineare (18) come l'azione inibente dell'ossigeno sia strettamente legata alla sua posologia. Infatti in ratti intossicati da monossido di carbonio è possibile prevenire la liperossidazione di membrana cerebrale mediata dalla attivazione dei neutrofili via β_2 -integrine, solo mediante ossigeno iperbarico e *non con ossigeno normobarico*. E' utile ricordare che nella sindrome da ischemia ripersione, fra cui può essere collocata anche la intossicazione acuta da

monossido di carbonio, momento fondamentale è l'azione dell'elastasi nella conversione della Xantina deidrogenasi in Xantina ossidasi nella cellula endoteliale. L'adesione dei neutrofili attivati all'endotelio, può consentire all'elastasi secreta dai neutrofili, di raggiungere alte concentrazioni nei punti di più stretto contatto fra le membrane cellulari e quindi di penetrare nella cellula endoteliale, dove la conversione da Xantina deidrogenasi a Xantina ossidasi avviene in modo irreversibile per digestione enzimatica (25). L'aggressione dei polimorfonucleati neutrofili alla membrana endoteliale può essere interpretato come un "complicanza secondaria" al chemotropismo esercitato dal luogo della infiammazione sui neutrofili che, una volta attivati, si fanno rapidamente strada verso l'infiammazione aprendosi un varco attraverso la strato monocellulare dell'endotelio.

E' comunque utile ricordare che recentemente (26) è stato messo in evidenza nell'endotelio polmonare di ratti un incremento di ICAM-1, però dopo 3 ore di esposizione all'ossigeno a 3 ATA.

Pertanto per il momento si può concludere che esistono convincenti prove sperimentali che la OTI contrasta l'adesività dei polimorfonucleati neutrofili attivati all'endotelio. D'altra parte una vasta sperimentazione (27, 28, 29, 30, 31), ha documentato che il blocco della adesività mediata dalle β_2 -integrine contrasta il manifestarsi della insufficienza d'organo e incrementa la sopravvivenza in vari modelli sperimentali di shock.

Rimane ancora molto oscuro il rapporto fra NO e β_2 -integrine. In genere si ritiene che NO abbia un effetto antiaggregante piastrinico e di antiadesività leucocitaria, quest'ultimo effetto sembra essere mediato proprio dalle β_2 -integrine (32), tuttavia le sperimentazioni condotte sia in vivo che in vitro non accennano al dato sostanziale: qual'è l'origine del NO studiato?

La domanda è importante poichè la quantità di NO prodotta dalla ossido nitrico sintetasi costitutiva è 1000 volte inferiore a quella prodotta dalla ossido nitrico sintetasi inducibile specificamente attivata nel processo infiammatorio.

Senza una precisa definizione delle quantità e quindi del mezzo in cui si svolge la ricerca non è attualmente possibile trarre una conclusione definitiva su questo argomento.

BIBLIOGRAFIA

1. Vanhoutte PM et al: *Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibition*. Am J Cardiol Nov 24; 76(15): 3E:12E, 1995.
2. Rocco M et al: *Inflammatory mediators, sepsis and oxygen*. Min Anest vol 61, suppl 1 al N 9, 1995
3. Scardia M et al: *Endotelino ed OTI. Studio preliminare sulla variazione dell'ET-1 in pazienti sottoposti ad OTI*. Min Anest vol 60. Suppl 1, N 9, settembre, 1994.
4. Scardia M et al: *New frontiers: Endothelin-1 and HBO*. Handbook on Hyperbaric Medicine, Springer-Verlag, Milano, pag. 846-847, 1996.
5. Inagami T et al: *Endothelium as an endocrin organ*. Annu Rev Physiol 57:171-189, 1995.
6. Ochoa JB et al: *Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis*. Ann Surg 621626, november 1991.
7. Zhang J et al: *Inhibition of nitric oxide synthase does not decrease cerebral blood flow or brain oxygen tension in rats exposed to HBO*. Undersea & Hyperb Medicine, supplement vol 21, 1994.
8. Sugimori K et al: *Changes in vascular reactivities of isolated aorta and pulmonary artery following acute exposure to HBO and 18 hours of recovery in rats*. Undersea & Hyperb Medicine supplement vol 22, 1 1995 .
9. Ferrario L et al: *Effect of HBO exposure on exhaled nitric oxide in a septic rat model*. Undersea & Hyperb Medicine. Supplement vol 23, 1996.
10. Yamami N et al: *Effect of HBO exposure on fibrinolytic activity*. Undersea & Hyperb Medicine. Supplement vol 22, 1995.
11. Amin HM et al: *Effects of exposure to HBO on blood rheology in the rat*. Undersea & Hyperb medicine. Supplement vol 22, 1995.
12. Gryglewski RJ: *Interactions between endotelial mediators*. Pharmacol Toxicol, 77(1):1-9, Jul 1995.
13. Inagami T et al: *Endothelium as an endocrine organ*. Annu Rev Physiol 57: pag 183, 1995.
14. Ferrario L et al: *Acute exposure to hyperbaric oxygen increases prostacyclin release in the pulmonary circulation*. Undersea & Hyperb Medicine. Supplement vol 22.1995.
15. Amin HM et al: *Effect of different durations of exposure to hyperbaric oxygen on circulating prostacyclin in the rat*. Undersea & Hyperb Medicine. Supplement vol 23. 1996.
16. Sharar SR et al: *The role of β_2 -Leukocyte Integrins in vivo. Host Defense Dysfunction in trauma, shock and sepsis*. Springer-Verlag, Berlin.Pag 181-189, 1993.
17. Carlos TM: *Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium*. Immunol Rev 114:5-28, 1990.
18. Thom SR: *Functional inhibition of leukocyte β_2 integrins by HBO in carbon monoxide - mediated brain injury in rats*. Toxicol Appl Pharmacol, 123:248-256, 1993.
19. Thom SR et al: *Temporary inhibition of human neutrophil β_2 integrins function by HBO*. Clinical Research, 42: 130A, 1994.
20. Thom SR et al: *HBO inhibits membrane-associated enzyme functions on polymorphonuclear leukocytes: implications regarding β_2 integrins function*. Undersea & Hyperb Medicine. Supplement vol 22.1995.
21. Zamboni WA et al: *Ischemia/Reperfusion injury in skeletal muscle: CD18 dependent neutrophilendothelial adhesion*. Undersea & Hyperb Medicine. Supplement vol 21, 1994.
22. Thom SR et al: *Parenchymal lung injury following smoke inhalation: inhibition by HBO*. Undersea & Hyperb Medicine. Supplement vol 21, 1994.
23. Lo SK et al: *Transient adhesion of neutrophils to endothelium*. J Exp Med vol 169, 1779-1793, 1989.
24. Detmers PA et al: *Aggregation of complement receptors on human neutrophils in the absence of ligand*. J Cell Biol, 105: 1137, 1987.
25. Phan SH et al: *Mechanism of neutrophil-induced Xanthine dehydrogenase to Xanthine oxidase conversion in endothelial cells: Evidence of a role for elastase*. Am J Resp Cell Mol Biol, vol 6, 270278, 1992.
26. Shinomiya N et al: *Effect of HBO on the leukocyte function and expression of adhesion molecules in the murine lung*. Undersea & Hyperb Medicine. Supplement vol 23, 1996.
27. Hernandez LA et al: *Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury*. Am J Physiol 253:H699-H703, 1987.
28. Simpson PJ et al: *Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mol, anti CD11b) that inhibits leukocyte adhesion*. J Clin Invest 81:624629. 1988.
29. Vedder NB et al: *A monoclonal antibody to the adherence promoting leukocyte glycoprotein CD18 reduces organ injury and improves survival from hemorrhagic shock and resuscitation in rabbits*. J Clin Invest 81:939-944, 1988.
30. Vedder NB et al: *Role of neutrophils in generalized reperfusion injury associated with resuscitation from shock*. Surgery 106: 509-516, 1989.
31. Vedder NB et al: *Inhibition of leukocyte adherence by anti-CD18 monoclonal antibody attenuates reperfusion injury in the rabbit ear*. Proc Natl Acad Sci USA 87:2643-2646, 1990.
32. Kubes P et al: *Nitric Oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion*. Proc Natl Acad Sci USA, vol 88, 4651-4655, 1991.