Ruolo di alcuni fattori biochimici e metabolici nella patogenesi delle complicanze croniche del diabete mellito

Responsabile scientifico

Angela Maria Buongiorno (Laboratorio di Biochimica Clinica)

Sintesi dell'attività svolta

La ricerca si è articolata nei seguenti obiettivi:

- studio in ratti, resi diabetici, sulla correlazione tra iperglicemia e alterazioni biochimico-metaboliche nei tessuti e fluidi biologici;
- studio dell'effetto antagonista della D-lysina sulla formazione degli acidi grassi essenziali (AGE) nei tessuti e nei fluidi biologici con possibile riduzione del danno da iperglicemia;
- studio dell'effetto di un aumento del metabolismo della glucosamina sulla produzione, captazione e sul ciclo futile del glucosio in ratti diabetici e normali.

L'iperglicemia colpisce, virtualmente, tutti i tessuti e gli organi e può provocare alterazioni biochimiche strutturali tali da causare lo sviluppo di molte delle complicanze diabetiche.

È stata accertata la correlazione *in vivo* tra presenza di complicanze e concentrazione di AGE circolanti e tissutali in animali da esperimento, resi diabetici per pancreatectomia sub-totale (90%).

È stato, inoltre, verificato *in vivo*, ma in modo parziale, ciò che era stato già dimostrato *in vitro*, cioè la capacità della D-lysina di sottrarre attivamente le molecole di glucosio reattivo (forma aperta "aldoso" con i gruppi carbossilici liberi) ai siti di reazione proteici, riducendo l'estensione della glicazione non enzimatica. Infine, sono stati condotti nuovi esperimenti per approfondire i meccanismi di azione della glucosamina *in vivo*.

Ulteriori ricerche saranno necessarie per chiarire il suo ruolo farmacologico nella malattia diabetica.

Ruolo di fattori endogeni ed esogeni nello sviluppo di iperlipidemie e loro sequele cronico-degenerative

Responsabile scientifico

Alfredo Cantafora (Laboratorio di Metabolismo e Biochimica Patologica)

Sintesi dell'attività svolta

È stato portato a termine uno studio su individui affetti da calcolosi colesterolica in cui si dimostra che l'epitelio della cistifellea riduce di molto il riassorbimento di colesterolo e di fosfolipidi biliari.

Nell'ambito di questo progetto è stato anche studiato il ruolo del tocoferolo sul metabolismo di LDL ossidate (in cellule epiteliali) e il ruolo del 17 β -estradiolo sul metabolismo di chilomicroni ossidati (in cellule THP-1). Sono state inoltre studiate, in soggetti italiani, le mutazioni del gene ABCA1, che codifica una proteina di trasporto trans-membrana e causa un grave deficit familiare di HDL.

Studio dei meccanismi patogenetici della adrenoleuco-distrofia (ALD) e dei meccanismi che accelerano la mielinogenesi

Responsabile scientifico

Serafina Salvati (Laboratorio di Metabolismo e Biochimica Patologica)

Sintesi dell'attività svolta

Nell'ambito della linea di ricerca si è valutato il ruolo dello stress ossidativo nella patogenesi cerebrale dell'ALD. Si è studiato in 17 pazienti, suddivisi nei differenti fenotipi, l'ossidabilità delle lipoproteine plasmatiche a bassa densità (LDL).

I risultati ottenuti hanno dimostrato un'aumentata suscettibilità all'ossidazione delle LDL plasmatiche nei pazienti rispetto al controllo e il grado di ossidabilità si correla con la severità del fenotipo. I parametri ossidativi di alcuni pazienti sono stati rivalutati dopo tre mesi di trattamento con la simvastatina, uno dei più recenti approcci terapeutici dell'ALD.

L'efficacia di questa sostanza nel diminuire l'ossidabilità delle LDL plasmatiche nei pazienti in trattamento, mette in luce un ulteriore effetto di questa terapia farmacologica. Parallelamente studi *in vitro*, in colture di linee cellulari di glioblastoma di ratto (C6), hanno dimostrato che alcuni acidi grassi esogeni sono in grado di modulare l'espressione genica di alcune proteine della mielina.

I risultati ottenuti, oltre ad aggiungere importanti informazioni scientifiche, possono dare indicazioni per nuove proposte terapeutiche.

Studio di patologie croniche non infettive associate a risposte immunitarie con prevalente polarizzazione TH1 o TH2

Responsabile scientifico

Gabriella Di Felice (Laboratorio di Immunologia)

Sintesi dell'attività svolta

Il progetto si articola essenzialmente su due modelli patologici: le malattie allergiche e le malattie infiammatorie croniche intestinali.

- Malattie allergiche:
 - è stata completata la caratterizzazione biochimica e immunologica dell'allergene maggiore della specie *Cupressus arizonica*, incluso il ruolo dei glicani associati alla molecola;
 - è stato messo a punto e studiato un modello animale per la produzione di anticorpi IgE, IgG totali e sottoclassi IgG specifici per allergeni nativi e ricombinanti; in questo modello e in PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) di soggetti allergici sono state valutate le caratteristiche immunogeniche e allergeniche di un allergene ricombinante di *Parietaria judaica*.
- Malattie infiammatorie croniche intestinali:
 - si è approfondito l'aspetto della regolazione della risposta immunitaria mucosale;
 - valutando la produzione delle citochine regolatorie IL-10 e TGF- β e le relazioni fra queste due citochine, si è evidenziata una diversa modulazione della produzione di TGF- β nel morbo di Crohn rispetto alla colite ulcerosa.

La possibilità di modulare l'apoptosi e la produzione di citochine infiammatorie e regolatorie è stata valutata in modelli murini di colite sperimentale.

È stata dimostrata la capacità della subunità B della tossina colerica, somministrata per via orale, di prevenire l'induzione di colite e di indurre la remissione completa della colite in atto. A livello della mucosa intestinale dei topi trattati e guariti si evidenzia la riduzione della produzione delle citochine effettrici e un aumento dell'apoptosi dei linfociti T.

Studio di patologie endocrino-metaboliche su base autoimmune. Valutazione dei principali fattori di rischio familiari e ambientali

Responsabile scientifico

Mariella Sorcini (Laboratorio di Metabolismo e Biochimica Patologica)

Sintesi dell'attività svolta

L'attività del 2000 ha riguardato prevalentemente lo studio dell'associazione tra diabete e tireopatie autoimmuni in gravidanza e la stesura delle linee guida per la diagnosi precoce dell'ipotiroidismo congenito, data l'importanza che gli ormoni tiroidei svolgono sul metabolismo e sul normale sviluppo del sistema nervoso nella vita fetale e in epoca neonatale. In tale ottica, è stato possibile accertare che la presenza di diabete in gravidanza (diabete gestazionale) rappresenta un fattore di rischio per una condizione di ipofunzione tiroidea anche subclinica.

Tali risultati trovano immediata applicazione per la salute pubblica in quanto sottolineano l'importanza dello screening in gravidanza della funzionalità tiroidea materna al fine di garantire un normale sviluppo neuropsichico del nato. Per ciò che riguarda la stesura delle linee guida per l'ipotiroidismo congenito,

queste rappresentano un contributo importante per la standardizzazione e l'ottimizzazione delle procedure dello screening neonatale tiroideo che, da circa dieci anni, viene attuato in Italia sulla totalità dei nati.

AREA 7 - GENETICA UMANA

Difetti genetici dello sviluppo osseo: basi molecolari

Responsabile scientifico

Piero Augusto Battaglia (Laboratorio di Biologia Cellulare)

Sintesi dell'attività svolta

Il risultato di maggior impegno dell'Istituto nel campo della genetica umana è stato raggiunto anche grazie alla collaborazione con l'Università degli Studi di Verona. Infatti, mediante analisi di *linkage-disequilibrium*, basato su sequenze del DNA genomico di oltre 500 pazienti, è stato individuato sul cromosoma 11 umano un locus correlato geneticamente all'insorgenza dell'asma grave. È in corso l'analisi per individuare singoli geni implicati nei pathways genetici mutati alla base dell'insorgenza dell'asma.

Inoltre, è stato costruito un saggio, basato sulla Polymerase Chain Reaction (PCR) competitiva, in grado di misurare con grande sensibilità la quantità dell'RNA messaggero per i recettori dell'FGF implicati nelle craniosinostosi, sia nei tessuti umani che nelle cellule in coltura.

Epidemiologia genetica

Responsabile scientifico

Maria Antonietta Stazi (Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica)

Sintesi dell'attività svolta

È proseguita l'attività legata al Registro dei gemelli italiani. Sono attualmente in corso tre studi di popolazione che si avvalgono del Registro: il primo riguarda la sclerosi multipla e si avvale della collaborazione di centri di diagnosi dislocati su tutto il territorio nazionale, il secondo riguarda la celiachia e vede la partecipazione delle associazioni dei celiaci, il terzo riguarda la malattia di Alzheimer, con il coinvolgimento di gruppi di ricerca dell'Istituto e dei Registri relativi ai soggetti affetti (regioni Lazio e Toscana).

È stata ultimata l'analisi di uno studio sull'asma e sulle allergie che coinvolge la popolazione in età pediatrica tra i gemelli arruolati nello studio SIDRIA; utilizzando sistemi di equazioni strutturali si sta valutando la componente genetica e ambientale della patologia allergica.

Sono stati svolti, inoltre, diversi studi nell'area delle malattie cronico-degenerative, il cui obiettivo principale è quello di indagare sull'associazione familiare delle patologie e la relazione tra la suscettibilità genetica e altri fattori di rischio, in particolare riguardo a lupus eritematoso sistemico (LES) e leucemie.

Nell'ambito della collaborazione esistente con l'Ospedale Maggiore di Milano sulla emocromatosi genetica (Progetto "Storia naturale, terapia e prevenzione delle epatopatie acute e croniche"), è stato messo a punto il questionario per l'acquisizione dei dati relativa al case-only study per la valutazione dell'interazione tra condizione di eterozigosi per l'emocromatosi e infezione da *Hepatitis C Virus* (HCV) nello sviluppo dell'epatocarcinoma ed è stato condotto uno studio pilota al riguardo.

Identificazione di marcatori genetici per la diagnosi precoce di malattie ereditarie e di predisposizione a malattie poligenico-multifattoriali

Responsabile scientifico

Domenica Taruscio (Laboratorio di Ultrastrutture)

Sintesi dell'attività svolta

L'attività si è incentrata su tematiche inerenti la genetica umana e le malattie rare. In particolare:

- è stata effettuata la caratterizzazione molecolare del cromosoma umano 17p12: in questa regione è stato identificato il gene hPer1 e analizzato la regione regolativa. Inoltre, nelle regioni limitrofe a 17p12 è stato caratterizzato e mappato il gene VAMP2/SYB2;
- è stata effettuata un'analisi comparativa di genomi complessi con identificazione di aberrazioni cromosomiche in tumori rari;
- è stato attivato il progetto relativo all'standardizzazione e assicurazione di qualità dei test genetici (DL.vo 502/92): è stato riversato particolare impegno nella realizzazione di questo progetto (al quale partecipano 80 laboratori pubblici nazionali) con analisi molecolari e di citogenetica;
- è stato attivato il Registro Nazionale Malattie Rare (MR), istituito con DM del 24/4/2000 (GU n. 131 del 7/6/2000) il cui scopo è di ottenere informazioni accurate sulla epidemiologia delle MR;
- è stato attivato dalla Commissione Europea il progetto Network of Public Health Institutions on Rare Diseases (NEPHIRD) che prevede la realizzazione di una rete collaborativa fra i Paesi europei e EU-associati impegnati nelle MR;
- è assicurata la partecipazione mensile all'attività dell'EMA; presso di essa, infatti, è stato istituito il Comitato per la Valutazione dei Farmaci Orfani (COMP) (Regolamento 141/2000 Parlamento Europeo e Consiglio d'Europa), il cui compito è quello di designare un prodotto come "orfano".

Sindromi talassemiche: prevenzione, diagnosi e nuovi approcci terapeutici

Responsabile scientifico

Adriana Massa (Laboratorio di Ematologia e Oncologia)

Sintesi dell'attività svolta

Nel corso del 2000 l'attività di ricerca si è sviluppata prevalentemente nel settore relativo ai nuovi approcci per il trattamento della β -talassemia. Sono stati resi noti i dati degli studi *in vitro* in condizioni controllate sugli effetti dei fattori di crescita, in particolare del *kit ligand* (KL), sulla riattivazione dell'emoglobina fetale in età adulta (HbF). È stato dimostrato che il KL esercita invece un'azione dose-dipendente sulla riattivazione della HbF, che viene potenziata in maniera significativa da inibitori delle deacilasi degli istoni, come il Na Butirrato o il tricostatina (TSA). In continuità con questo argomento sono iniziati studi in cui l'effetto del KL viene saggiato in associazione a corticosteroidi: i dati preliminari indicano una potenziale applicazione nella terapia della β -talassemia.

Sono stati resi noti i risultati di uno studio, effettuato in collaborazione con la Divisione di Ematologia dell'Ospedale S. Eugenio di Roma, in cui è stato evidenziato che una sostanza chimica, la idrossiurea (HU), si dimostra efficace nel trattamento di pazienti con ematopoiesi extramidollare recidivi alla radioterapia. Nel corso del trattamento con idrossiurea si aveva un miglioramento del quadro clinico, un significativo aumento della emoglobina totale e della emoglobina fetale, una diminuzione della eritropoiesi inefficace e una regressione delle masse midollari con un recupero della qualità di vita.

Studio di malattie ereditarie causate da difetti nel catabolismo degli sfingolipidi

Responsabile scientifico

Anna Maria Vaccaro (Laboratorio di Metabolismo e Biochimica Patologica)

Sintesi dell'attività svolta

È proseguita la ricerca sulla patogenesi delle malattie lisosomiali (in particolare, malattie di Gaucher, Krabbe e Nieman-Pick), caratterizzate dall'accumulo lisosomiale di sfingolipidi per un blocco nella loro degradazione causato da mutazioni degli enzimi idrolitici, le sfingolipidi-idrolasi, o dei loro attivatori, le saposine A, B, C e D. A causa della loro eterogeneità clinica e della sintomatologia estremamente variabile, è di fondamentale importanza conoscere le basi biochimiche e molecolari di queste malattie per caratterizzare le specifiche alterazioni correlate alle diverse varianti cliniche. Le ricerche hanno evidenziato nuove proprietà delle sfingolipidi-idrolasi e delle saposine, che hanno permesso sia di ricavare nuovi modelli per la degradazione degli sfingolipidi che di elaborare metodologie avanzate per l'identificazione di queste proteine in vari tessuti umani al fine di eseguire diagnosi precoci di malattie lisosomiali. In questo

ambito è stata svolta una vasta attività di consulenza diagnostica per le suddette malattie in collaborazione con gli IRCCS, le cliniche neurologiche e gli ospedali pediatrici.

È stato infine aggiornato e ampliato il Registro Nazionale Gaucher, che fu istituito per raccomandazione del “Gruppo di lavoro sugli interventi terapeutici per la malattia di Gaucher”, ricostituito presso il Ministero della Sanità con DM 11/1/1995.

AREA 8 - SANGUE

Anemie emolitiche ereditarie associate a difetti enzimatici e di membrana dei globuli rossi: diagnosi e prevenzione

Responsabile scientifico

Anna Salvati (Laboratorio di Biochimica Clinica)

Sintesi dell'attività svolta

Il progetto riguarda le anemie emolitiche associate ai difetti enzimatici e di membrana più comuni nella popolazione:

- deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD);
- sferocitosi (HS) ed ellissocitosi (HE) ereditarie.

Gli studi sono stati condotti in collaborazione con centri universitari e ospedalieri su pazienti affetti da anemia emolitica acuta o cronica.

Sono stati elaborati protocolli diagnostici con diversi livelli di efficienza, basati su test biochimici e molecolari. In particolare, per il deficit di G6PD è stata valutata la sensibilità clinica del saggio enzimatico per le varianti comuni G6PD Mediterranea e G6PD Seattle, e sono stati messi a punto metodi di screening molecolare (amplificazione allele-specifica) per le stesse varianti. Il protocollo elaborato è stato convalidato su 92 casi, dei quali 60% con la G6PD Mediterranea, 20% con la G6PD Seattle e 20 % con diverse varianti molecolari meno comuni. Nell'ambito della stessa casistica sono state anche caratterizzate due varianti mai descritte nella popolazione italiana.

Per l'HS e l'HE è stato messo a punto un protocollo comprendente:

- analisi morfologica e di fragilità osmotica;
- valutazione elettroforetica delle proteine del membranoscheletro;
- studio dell'equilibrio di associazione della spettrina;
- analisi della mappa peptidica della spettrina.

L'applicazione del protocollo a 42 casi ha consentito di valutare l'efficienza diagnostica ai diversi livelli e di caratterizzare anomalie strutturali e funzionali della membrana eritrocitaria associate ad HS e HE o alla combinazione di tali difetti genetici con altre malattie ereditarie dei globuli rossi (per esempio, talassemia e deficit di G6PD).

Basi cellulari e molecolari della megacariocitopoiesi e trombocitopoiesi in condizioni fisiologiche e patologiche

Responsabile scientifico

Cristiana Chelucci (Laboratorio di Ematologia e Oncologia)

Sintesi dell'attività svolta

Nell'ambito di questo progetto finalizzato si è concluso lo studio del ruolo svolto dalla chemochina SDF-1a sulla differenziazione/maturazione megacariocitaria. Progenitori ematopoietici CD34+ coltivati in presenza di trombopoietina (TPO) e SDF-1a danno origine ad una popolazione megacariocitaria pura che mostra un aumento del contenuto di DNA (poliploidia) e del numero di lovi nucleari significativamente maggiore rispetto alle colture con il solo TPO. L'effetto osservato è dose-dipendente e non influenza la proliferazione. Inoltre SDF-1a induce un significativo aumento della formazione di “propiastri” e promuove la migrazione delle cellule megacariocitarie. Inoltre SDF-1a non modula l'espressione dei

marcatori di membrana specifici megacariocitari, a dimostrazione che la differenziazione e la poliploidizzazione sono eventi indipendentemente regolati.

È stato inoltre avviato lo studio del ruolo di vascular endothelial growth factor (VEGF) sulla modulazione dell'espressione di mRNA e di proteine, di fattori anti- e angiogenici nella differenziazione/maturazione dei *lineage* megacariocitario, eritroide, monocitario e granulocitario.

Basi cellulari e molecolari della megacariocitopoiesi e trombopoiesi in condizioni fisiologiche e patologiche

Responsabile scientifico

Hamisa Jane Hassan (Laboratorio di Biochimica Clinica)

Sintesi dell'attività svolta

Sono stati effettuati studi *in vitro* sulla megacariocitopoiesi e la trombopoiesi, con l'obiettivo di identificare strategie alternative o di supporto alla trasfusione di concentrati piastrinici nei pazienti trombocitopenici. In particolare, è stata valutata la capacità di generare megacariociti maturi e piastrine.

Lo schema sperimentale adottato ha previsto:

- purificazione di cellule staminali e progenitrici emopoietiche da sangue periferico e cordonale attraverso tecniche di separazione immuno-magnetica;
- allestimento di colture liquide *serum-free* contenenti trombopoietina (Tpo), il fattore di crescita specifico per il *lineage* megacariocitario;
- analisi fenotipica delle cellule a vari giorni di coltura tramite studio della morfologia in microscopia ottica e studio dei marcatori di membrana specifici e dei livelli di ploidia in citometria a flusso;
- indagini quantitative e qualitative sulle piastrine rilasciate nel mezzo di colture attraverso citometria a flusso previa marcatura con anticorpi specifici e attivazione con trombina;
- valutazione dei principali modulatori proteici della megacario-citopoiesi attraverso dosaggio immunoenzimatico nel mezzo di coltura di: Fattore piastrinico 4 (PF4), β -tromboglobulina (β -TG) e Fattore di von Willebrand (vWF);
- analisi del ciclo cellulare mediante microscopia in fluorescenza previa marcatura con anticorpi specifici diretti contro proteine coinvolte in tale processo (Ciclina D3 e Ciclina B1);
- studio dell'espressione di alcuni geni coinvolti nel differenziamento megacariocitario (GATA-1 e NF-E2) attraverso estrazione degli RNA e RT-PCR;
- studio della migrazione cellulare con l'impiego di SDF-1 α , una chemochina stromale implicata nei processi di rilascio in circolo delle cellule mature e di *homing* nel midollo delle cellule trapiantate, e attraverso colture di cellule umane endoteliali (HUVEC).

I risultati ottenuti hanno evidenziato che i livelli di ploidia e di produzione piastrinica nei megacariociti derivati da cordone sono inferiori ai corrispondenti valori riscontrati nelle cellule derivate da periferico. È stato, inoltre, dimostrato che queste ultime, coltivate in presenza di SDF-1 α , aumentano il loro contenuto di DNA attraverso un segnale mediato dal CXCR4. È stata, quindi, ipotizzata una correlazione tra queste due osservazioni. Le ricerche sono state indirizzate sulle basi molecolari del differenziamento megacariocitario e proseguiranno per l'anno 2001.

Le cellule staminali e i progenitori ematopoietici normali e neoplastici: sviluppo di modelli innovativi di ricerca di base e applicativa

Responsabili scientifici:

Cesare Peschle, Mauro Valtieri (Laboratorio di Ematologia e Oncologia)

Sintesi dell'attività svolta

Il punto critico per la esecuzione del progetto è risultato essere l'isolamento delle cellule CD34+KDR+ a partire dai tessuti compromessi dal processo leucemico, cioè midollo osseo e sangue periferico. È stata

recentemente messa a punto una strategia di purificazione in due fasi che permette di raggiungere una purezza del 85-95% di cellule staminali ematopoietiche CD34+KDR+. Questa metodologia consiste in una fase di arricchimento mediante colonnine Miltenyi, anticorpo anti-KDR biotinilato, anticorpi antiobiotina coniugati a microbiglie magnetiche e successivo *cell sorting* delle cellule ottenute dopo ulteriore marcatura con streptoavidina FITC. Le cellule staminali ottenute possono quindi venire analizzate per FISH allo scopo di definire, in modo inequivocabile, la loro compromissione leucemica, nel caso risultassero positive per il marcatore molecolare specifico, oppure la loro normalità, quando si dimostrassero negative per il marcatore molecolare stesso. La definizione della compromissione o normalità del compartimento staminale nei differenti tipi di leucemia porterà alla definizione di approcci terapeutici differenziati e ottimizzati per la totale eradicazione delle patologie specifiche. Ad esempio, se nel caso delle leucemie mieloidi croniche le cellule staminali ematopoietiche risultassero compromesse, la terapia dovrebbe focalizzarsi su trapianti allogenici o su autotrapianti dopo la separazione delle cellule staminali ematopoietiche normali. Nel caso di leucemie acute, in cui la componente staminale ematopoietica risultasse normale, si potrebbe adottare una chemioterapia ablativa seguita da autotrapianto delle cellule staminali normali.

Colture unilinea di cellule dendritiche, monocito/macrofagiche e linfocitarie derivate da progenitori emopoietici umani

Responsabili scientifici:

Elisabetta Montesoro, Elvira Pelosi (Laboratorio di Ematologia e Oncologia)

Sintesi dell'attività svolta

- Differenziamento *unilineage* dendritico
Le caratteristiche delle cellule dendritiche (DC) derivate da progenitori ematopoietici, secondo il protocollo differenziativo, sono state confrontate con quelle di DC ottenute per differenziazione *in vitro* di monociti maturi isolati da sangue periferico o dei loro precursori. Le tre popolazioni cellulari mostrano la stessa attività di Antigen Presenting Cells (APC), nonostante quella derivata da monociti maturi risulti contenere una percentuale maggiore di cellule positive per le molecole costimolatorie (CD40, CD80, CD86). Anche relativamente alla produzione e al rilascio di citochine non è stata rilevata una differenza significativa tra le tre popolazioni, ad eccezione del TNF α che risulta maggiormente prodotto dalle DC ottenute per differenziazione secondaria dai monociti.
- Differenziamento *unilineage* monocitario
È stato utilizzato il sistema differenziativo macrofagico per la realizzazione di studi relativi al metabolismo del ferro. In particolare, le ricerche hanno consentito di mostrare, durante il differenziamento da monocita a macrofago, un'induzione dell'espressione e dell'attività delle due proteine *iron regulatory protein 1* e *2*, che agiscono da controllori dell'espressione delle varie proteine implicate nel metabolismo del ferro (ferritina, recettore della transferrina, Nramp2 e ferroproteina). Tali osservazioni hanno delle implicazioni potenziali per la comprensione del ruolo svolto dai macrofagi nello stoccaggio e riciclaggio del ferro in condizioni fisiologiche e patologiche.

Il danno ossidativo nell'invecchiamento dell'eritrocita: studio metabolico e strutturale

Responsabile scientifico

Patrizia Caprari (Laboratorio di Biochimica Clinica)

Sintesi dell'attività svolta

Lo scopo della ricerca era di valutare il danno ossidativo dell'eritrocita in diverse condizioni di invecchiamento, sia fisiologico che *in vitro*, per chiarire i meccanismi cellulari che determinano la rimozione dal circolo.

In particolare, è stata studiata la sensibilità allo stress ossidativo di globuli rossi con deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD), un difetto ereditario del globulo rosso associato ad episodi di anemia emolitica acuta indotti da farmaci, infezioni e fave. Sono stati studiati eritrociti con difetti di G6PD dovuti

a diverse mutazioni genetiche: G6PD Mediterranea, una variante di classe II con grave carenza di attività enzimatica associata a rischio rilevante di crisi emolitiche, e G6PD Seattle, una variante di classe III con attività enzimatica più alta ed espressione clinica minore. Gli eritrociti con G6PD Med risultano essere particolarmente danneggiati dallo stress ossidativo sia per quanto riguarda le capacità ossidoriduttive, in quanto presentano livelli costantemente diminuiti di GSH, sia per l'integrità della membrana eritrocitaria poiché, oltre alle modificazioni della spettina, è anche evidente una degradazione della proteina integrale banda 3. Gli eritrociti con G6PD Seattle presentano livelli di GSH più elevati e una minore sensibilità agli agenti ossidanti confrontabile con quella dei controlli.

Inoltre, è stato effettuato uno studio su pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare grave per valutare la denaturazione ossidativa degli eritrociti in presenza o meno del trattamento di LDL-afèresi. Sono stati osservati un aumento della ossidabilità delle LDL nei pazienti rispetto ai controlli e una significativa riduzione di ossidabilità dopo trattamento con LDL-afèresi. È stata riscontrata una diminuzione del danno ossidativo in seguito al trattamento e l'attivazione dei sistemi di detossificazione, come l'aumento del contenuto di GSH intraeritrocitario.

Manipolazione *in vivo* e/o *in vitro* della cellula staminale emopoietica per migliorare l'attecchimento nel trapianto con sangue perinatale o in assenza di mieloablazione

Responsabile scientifico

Anna Rita Franco Migliaccio (Laboratorio di Biochimica Clinica)

Sintesi dell'attività svolta

La cellula staminale emopoietica, con la sua capacità autoreplicativa e di differenziazione in tutti gli elementi del sangue, è al centro della terapia trasfusionale e del trapianto di midollo. Per quanto riguarda strettamente il campo della terapia trasfusionale, è particolarmente importante identificare i meccanismi che regolano la produzione di emazie e di piastrine.

Queste due linee differenziate condividono molti elementi di controllo. Nel corso del 2000 è stato dimostrato che questi elementi coinvolgono la generazione di un precursore comune bipotente eritromegacariocitario. Questo precursore è stato identificato sia nei tessuti normali che durante il differenziamento indotto *in vitro* ed è coinvolto nella risposta dell'animale allo stress anemico, alla stimolazione eritroide con l'ormone specifico eritropoietica, nonché nel meccanismo di compensazione del deficit genetico da insufficiente trascrizione del fattore eritroide-specifico Gata-1.

Nell'ambito dei meccanismi molecolari, che accompagnano il differenziamento della cellula staminale in cellule eritroidi, è stato caratterizzato che la subunità trasducente del recettore per l'interleuchina 3 ha una regolazione bifasica e che è attivata dall'eritropoietica in cellule non differenziate mentre ne è inibita in cellule in fase di maturazione.

Nell'ambito dei trapianti con sangue di cordone, è proseguita l'attività di ricerca ormai pluriennale in questo campo dimostrando che il parametro che meglio correla con la velocità di attecchimento mieloide e piastrinico è la dose di cellule progenitrici trapiantate per unità di peso corporeo. Questa dimostrazione è stata possibile mettendo a punto una tecnica estremamente standardizzata di saggio clonogenetico, che ha consentito una valutazione costante nel tempo di questo parametro in laboratorio con una deviazione standard della media dei valori inferiori al 10%.

Il paragone del recupero dopo scongelamento delle cellule progenitrici e dei loro precursori ha, inoltre, consentito di stabilire che le tecniche di criopreservazione usate attualmente dalle banche di cordone potrebbero ancora essere migliorate, permettendo l'utilizzo di unità che sono ora classificate come contenere una dose cellulare non soddisfacente per il trapianto. Sempre nell'ambito del trapianto con sangue di cordone, un ulteriore risultato ottenuto è costituito dalla dimostrazione che il repertorio di cloni T presenti alla nascita è oligoclonale, fornendo una base cellulare per bassa immunogenicità di questa sorgente di cellule staminali.

**Meccanismi cellulari e molecolari dell'ematopoiesi:
indagini su cloni di progenitori umani in colture unicellulari unimultilinea***Responsabile scientifico*

Marco Gabbianelli (Laboratorio di Ematologia e Oncologia)

Sintesi dell'attività svolta

Lo studio su cloni di progenitori umani purificati generati da colture unicellulari eritroidi ha dimostrato, in maniera inequivocabile, che è possibile, utilizzando contemporaneamente *kit ligand* (KL) e sodio butirato (NaB), ottenere una riattivazione delle sintesi di HbF nell'adulto normale fino quasi al 50%, aprendo così la strada ad un possibile impiego clinico nella terapia delle β -emoglobinopatie. Sulla base dei risultati ottenuti, è stato avviato uno studio sui possibili fattori trascrizionali coinvolti (TAL-1, ELKF, FLKF), tuttora in corso, nell'intento di analizzare i meccanismi molecolari alla base di questa riattivazione.

È stato, inoltre, messo a punto un sistema di trasfezione genica sulle singole cellule utilizzando vettori retrovirali con il gene per la *Green Fluorescence Protein* (GFP), la cui espressione permette il monitoraggio delle cellule trasfettate al microscopio a fluorescenza. In questo modo, sono stati effettuati esperimenti di trasfezione con il gene per le proteine di fusione PML/RAR α nei progenitori ematopoietici normali; i risultati indicano che l'espressione di questo gene è in grado di indurre un fenotipo leucemico promielocitico indipendentemente dal programma differenziativo intrapreso.

**I segnali di trasduzione della proliferazione e del differenziamento ematopoietico:
(I) dissezione e isolamento di domini glicolipidici di membrana,
(II) studio biochimico-funzionale di complessi proteici trascrizionali***Responsabili scientifici:*

Massimo Sargiacomo, Isabella Parolini, Luigi Vitelli (Laboratorio di Ematologia e Oncologia)

Sintesi dell'attività svolta

Gli studi biochimici/disettivi sui microdomini e le caveole di plasma membrana hanno aggiunto nuove informazioni su segnali chiave della regolazione funzionale di vari modelli cellulari:

- i risultati sul ruolo dei gangliosidi e dell'Ick nei microdomini durante l'attivazione dei linfociti T consolidano ulteriormente le conoscenze sull'argomento;
- la dimostrazione di una interazione diretta tra un dominio della caveolina -3 (muscolo specifica) e il distroglicano;
- le modifiche trasduzionali in caveole cardiache attraverso lo stimolo norepinefrinico.

**Studi *in vitro* e *in vivo* dei meccanismi di controllo cellulari e molecolari
delle capacità autoreplicative e proliferative della cellula staminale ematopoietica***Responsabile scientifico*

Giovanni Migliaccio (Laboratorio di Biologia Cellulare)

Sintesi dell'attività svolta

Durante il 2000 l'attività di ricerca si è articolata in numerosi progetti ruotanti intorno al controllo della proliferazione delle cellule staminali sia adulte che neonatali. Un modello *in vivo* di recupero dopo anemia indotta da fenil-idrazina ha permesso di purificare l'ultimo progenitore comune alla linea eritroide e megacariocitaria e di caratterizzarne la capacità proliferativa.

L'eterogeneità del patrimonio T linfocitario in sangue neonatale è stata analizzata mediante RT-PCR e SSCP del *T-Cell Receptor*. La presenza di uno spettro di espressione del *T-Cell Receptor*, che varia da oligoclonale a fortemente policlonale ed equivalente ad un adulto, indica che il numero totale di cloni linfocitari presenti nel periodo neonatale è estremamente variabile. Questa potrebbe essere una delle cause sia della bassa allorreattività che della eterogeneità nella risposta linfocitaria contro l'ospite del sangue cordonale rispetto al midollo osseo adulto.

La stabilità nel tempo di geni trasferiti in linee cellulari (K562) mediante vettori retrovirali è stata analizzata allo scopo di valutare i rischi e la fattibilità di terapie geniche che propongano la trasfezione della cellula staminale. Il progressivo silenziamento dei geni trasferiti sottolinea la necessità di modificare i vettori utilizzati per la terapia genica.

La regolazione dei recettori per l'interleuchina 3, durante il differenziamento eritroide, è stata studiata in un modello di differenziamento murino composto da un pannello di linee cellulari (32D) fattore dipendente. La comparsa del fenotipo eritroide è legata all'attivazione del recettore per l'eritropoietina e alla selettiva scomparsa della catena β (comune), ma non di quella α (specificità) del recettore per l'IL-3.

L'esperienza di citofluorimetria e di separazione cellulare si è concretizzata in studi in collaborazione con altri laboratori, che riguardano sia l'apoptosi che il metabolismo lipidico in cellule neuronali.

Valutazione della qualità e sicurezza delle immunoglobuline umane ad uso terapeutico

Responsabile scientifico

Giuliano Gentili (Laboratorio di Immunologia)

Sintesi dell'attività svolta

L'attività di ricerca si è indirizzata verso tre tematiche principali:

- standardizzazione di metodiche di amplificazione di acidi nucleici (NAT):
- organizzazione di due studi di valutazione esterna di qualità delle metodiche NAT, indirizzati alle ditte che commercializzano emoderivati in Italia; partecipazione a uno studio collaborativo internazionale, organizzato dal National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC), per la calibrazione di sei preparazioni di HCV RNA di diverso genotipo contro lo standard internazionale; partecipazione a due studi di *proficiency* organizzati dall'European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM) per valutare la competenza degli Official Medicines Control Laboratories (OMCL) rispetto all'applicazione del NAT per la ricerca di HCV RNA nei plasma pool destinati al frazionamento;
- studi di convalida: convalida delle metodiche analitiche utilizzate nel controllo dei plasma pool per i marcatori virali HBsAg, anti-HIV 1/2, anti-HCV e HCV RNA; messa a punto e convalida di una metodica per la ricerca di B19 DNA;
- studi di sicurezza virale: proseguimento dello studio per la valutazione della presenza di HHV-8 nel plasma raccolto in regioni italiane ad alta prevalenza di anticorpi diretti contro questo virus erpetico; conduzione di un'ulteriore indagine per valutare la reale prevalenza di virus TT nei donatori italiani.

AREA 9 - SALUTE DELLA POPOLAZIONE E SERVIZI SANITARI

Abuso e dipendenza da tabacco e sostanze stupefacenti

Responsabile scientifico

Piergiorgio Zuccaro (Laboratorio di Biochimica Clinica)

Sintesi dell'attività svolta

Per tutto l'anno 2000 sono proseguite le ricerche riguardanti la messa a punto, la standardizzazione e il confronto di metodiche per l'analisi di farmaci e sostanze d'abuso in matrici biologiche convenzionali e non convenzionali.

In particolare:

- è proseguito il campionamento e l'analisi di capelli di soggetti con un episodio di overdose. I risultati mostrano interessanti correlazioni fra l'episodio di overdose e fattori di rischio;
- sono stati eseguiti, in collaborazione con l'ospedale Policlinico Borgo Roma di Verona, i dosaggi ematici e urinari della cotinina su soggetti fumatori attivi e passivi per valutare il grado di esposizione al fumo di sigarette. L'analisi dei risultati ha dimostrato che la concentrazione ematica

di cotinina è risultata direttamente proporzionale al numero di sigarette fumate. Un altro studio, in collaborazione con l'Ospedale Bambino Gesù di Roma, è stato eseguito su "Fumo passivo come fattore di rischio della bronchiolite". È in corso l'elaborazione statistica dei dati;

- è stata effettuata la messa a punto di un metodo per l'analisi del lorazepam nel plasma e nelle urine in GC/MS;
- una metodica in LC/MS ha permesso l'analisi contemporanea dell'eroina e di tutti i suoi metaboliti;
- sono stati elaborati metodi analitici al fine di accertare l'eventuale stato di tossicodipendenza, disporre di metodi di riferimento, individuare possibili indicatori biochimici utili negli studi epidemiologici.

Costituzione di una base di dati sanitari

Responsabile scientifico

Riccardo Capocaccia (Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica)

Sintesi dell'attività svolta

Le principali attività svolte sono state le seguenti:

- acquisizione e organizzazione dei dati sulla mortalità per tumore nei Paesi europei;
- analisi, progettazione e sviluppo di una base di dati di sopravvivenza dei pazienti di tumore in relazione ai progetti EURO CARE e ITACARE.

Epidemiologia della salute riproduttiva

Responsabile scientifico

Angela Spinelli (Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica)

Sintesi dell'attività svolta

Si è analizzato il fenomeno dell'abortività spontanea in Italia dal 1980 al 1993.

Ogni anno sono notificati in Italia circa 50.000 aborti spontanei e, da un punto di vista temporale, il fenomeno è in leggero aumento. Nel periodo 1983-93 la proporzione nazionale è passata, infatti, da 8 a 9 aborti spontanei per 100 concepimenti noti.

Da un punto di vista geografico, si nota un gradiente decrescente da Nord a Sud (rispettivamente, da 11-12 a 6-8 aborti spontanei per 100 concepimenti noti nel 1993).

Globalmente, la frequenza dell'aborto spontaneo risulta leggermente più elevata tra le donne con un livello di istruzione basso: 9,0 per 100 concepimenti noti tra le donne senza titolo di studio o con licenza elementare; 8,8 per quelle con diploma di scuola media inferiore; 7,8 per quelle con licenza media superiore; 8,3 per quelle con laurea (nel 1991).

Per quanto riguarda l'attività lavorativa, non risultano grandi differenze. L'età della donna risulta essere la variabile più importante nel determinare la frequenza del fenomeno: 6-7 aborti per 100 concepimenti conosciuti nelle donne sotto i 30 anni rispetto a 20 per 100 nelle donne di 40 anni o più.

È stata inoltre effettuata un'analisi preliminare dei dati dello studio sull'aborto spontaneo in una coorte di donne lavoratrici in serra, da cui è risultato un leggero aumento del fenomeno tra queste donne.

La medicina di laboratorio in ambito preventivo, occupazionale e ambientale: indicatori biologici e fattori protettivi

Responsabile scientifico

Antonio Menditto (Laboratorio di Biochimica Clinica)

Sintesi dell'attività svolta

Nell'ambito del progetto sono state svolte attività per lo sviluppo e la standardizzazione di metodi analitici, tenendo conto delle raccomandazioni e delle norme internazionali in tema di incertezza di

misura. In particolare, è stato messo a punto un procedimento per la valutazione dell'incertezza di misura in un metodo per la determinazione dell'Al nel siero mediante spettrometria di assorbimento atomico.

È stato affrontato il tema del monitoraggio dell'esposizione e degli effetti di sostanze di interesse tossicologico, in particolare per quanto riguarda l'esposizione a piombo e a benzene, utilizzando rispettivamente come indicatori biologici il piombo nel sangue e l'acido t,t-muconico nelle urine. Nell'ambito di studi epidemiologici su popolazioni non professionalmente esposte, è stato eseguito il dosaggio di lipidi, glucosio, creatinina, vitamine antiossidanti e elementi in traccia, in fluidi biologici di circa 400 soggetti; è stata iniziata la valutazione delle correlazioni tra questi parametri e altri fattori di rischio cardiovascolare quali età, indice di massa corporea, pressione arteriosa e frequenza cardiaca. I risultati di laboratorio sono stati utilizzati per stimare il loro valore predittivo per la mortalità totale e specifica per causa. È stata anche valutata la relazione tra fattori di rischio cardiovascolare e la condizione sociale.

In collaborazione con il Dipartimento di Biochimica Patologica dell'Università di Glasgow, sono stati resi noti i risultati relativi al contenuto di alcuni elementi di interesse tossicologico (Cd, Pb, Sb) nel tessuto epatico ottenuto *post mortem* da 157 soggetti deceduti tra 0 e 6 anni, dei quali più del 90% al di sotto del primo anno di età, allo scopo di valutare l'effettivo assorbimento di elementi durante la fase prenatale e nell'infanzia. Il confronto tra le concentrazioni di Sb ottenute nei 97 soggetti deceduti per la sindrome della morte improvvisa in culla (SIDS) e quelle ottenute nei restanti 60 soggetti, deceduti per altre cause, ha permesso di escludere un ruolo dell'Sb, a volte usato come agente ignifugo nei materassi, nella eziopatogenesi della SIDS.

Sono stati resi noti i risultati relativi allo sviluppo di metodologie originali di preparazione di materiali di riferimento nei settori: elementi di interesse nutrizionale o tossicologico nel plasma seminale; metaboliti di composti organici quali acido t,t-muconico per il benzene e 1-idrossipirene per gli idrocarburi policiclici aromatici; seminologia e immunologia della riproduzione.

Per quanto riguarda la valutazione delle prestazioni di laboratorio nel campo della fisiopatologia della riproduzione maschile, sono stati resi noti i risultati di programmi pilota di valutazione esterna della qualità (VEQ) nel settore della seminologia e immunologia della riproduzione. Sono stati effettuati sei esercizi collaborativi ai quali hanno partecipato, in totale, oltre 20 centri. I parametri valutati sono stati: la motilità e la morfologia spermatozoale; la presenza di cellule della spermatogenesi e di cellule della serie leucocitaria; la determinazione degli anticorpi antispermatozoo. Sono stati resi noti i risultati di un primo studio collaborativo pilota per il dosaggio di alcuni metalli in traccia e ultratraccia (Zn, Fe, Cu, Se, Pb, Cd, Cr) nel plasma seminale, a cui hanno partecipato 13 centri. Questo studio ha confermato le difficoltà analitiche connesse con matrici diverse e la necessità di programmi di VEQ mirati per ciascuna coppia matrice/analita. La produzione di materiali di riferimento specie/matrice specifici e per matrici biologiche inusuali è un primo passo verso la produzione di materiali di riferimento certificati ed è indispensabile per garantire almeno la comparabilità delle misure.

Prevenzione di patologie correlate all'insufficienza renale e all'emodialisi

Responsabile scientifico

Giancarlo Severini (Laboratorio di Biochimica Clinica)

Sintesi dell'attività svolta

La pianificazione dei programmi e dei servizi necessari per soddisfare i bisogni di salute della popolazione e la valutazione dell'efficacia e dell'efficienza operativa con cui questi raggiungono i loro obiettivi sono esigenze frequentemente richiamate nelle leggi che regolano l'organizzazione del Servizio Sanitario Nazionale (SSN).

A fronte di queste esigenze, sempre più diffuse e articolate, emerge con maggiore evidenza la necessità di sviluppare un'efficace strategia di ricerca finalizzata a fornire le conoscenze scientifiche su cui basare le politiche sanitarie atte a perseguire gli obiettivi dell'SSN.

Nell'ambito di questi obiettivi e, in particolare, di quello che si propone di contrastare le principali patologie attraverso interventi di prevenzione primaria e/o secondaria, la ricerca si è sviluppata nel settore dello studio e della prevenzione delle patologie renali.

Gli argomenti sviluppati sono stati i seguenti:

- identificazione e ruolo di sostanze definite "medio-molecole" nei fenomeni di immunosoppressione presenti nel paziente uremico. La imperfetta immunoreattività sembra essere

in relazione alla ritenzione di questo tipo di sostanze nel corso dell'insufficienza renale con la successiva assunzione, da parte di cellule immunocompetenti, di una incapacità a produrre una risposta normale;

- coinvolgimento di fattori esterni alla dialisi come le membrane, i bagni di dialisi, ecc., nella produzione di interleuchine favorevoli al differenziamento cellulare;
- identificazione di indicatori biochimici più sensibili e specifici di adeguatezza di dialisi rispetto a quelli attualmente in uso;
- studio dello stress ossidativo dovuto ad accumulo di sostanze ossidanti e ruolo di enzimi quali GST (glutazione- s- transferasi) e SOD (superossido dismutasi).

Il risultato più importante raggiunto nel corso della ricerca è stato quello di aver identificato, e quindi proposto, agli operatori del settore un sistema di analisi biochimiche efficienti e duttili in grado di migliorare il controllo dell'adeguatezza del trattamento emodialitico.

Da ciò è conseguita la possibilità di pervenire più precocemente alla identificazione di alcune patologie correlate al trattamento e ad una migliore comprensione di alcuni meccanismi patogenetici del danno renale, risultato questo che potrà permettere una migliore opera di prevenzione della malattia rallentando o evitando il ricorso all'emodialisi.

Alcune patologie, come ad esempio i processi emolitici e la conseguente anemia tipica di questi pazienti, si sono rivelate essere in relazione con i valori intraeritrocitari di enzimi quali la glutazione-s-transferasi e la glutazione reduttasi.

L'attività di difesa contro l'accumulo di sostanze antiossidanti, tipico di questi pazienti, è stata studiata anche in ratti sottoposti a danno renale e trattati con dieta ricca di sostanze antiossidanti; questo tipo di dieta contribuisce ad attenuare sensibilmente il danno ossidativo e a mantenere stabili importanti parametri chimico-clinici.

Sostanze d'abuso a scopo ricreazionale: identificazione, quantificazione, diffusione e valutazione di indicatori di danno acuto e cronico

Responsabile scientifico

Teodora Macchia (Laboratorio di Biochimica Clinica)

Sintesi dell'attività svolta

Nel corso del 2000 sono state ulteriormente sviluppate le tematiche principali del progetto afferenti all'uso di sostanze ricreative e all'abuso alcolico. In particolare, oltre ad incrementare le applicazioni della procedura in HPLC fluorimetria per il dosaggio di amfetamino diossidi derivati (MDA, MDMA, MDE, MBDB), già messa a punto, sono stati effettuati studi comparativi con GC/MS.

Sono state inoltre studiate e messe a punto nuove procedure in Spazio di Testa GC/MS per la determinazione di amfetamino diossidi derivati, amfetamina, metamfetamina, cocaina e cannabinoidi nei capelli e nella saliva.

Per quanto riguarda i problemi relativi all'abuso alcolico, è stata messa a punto la procedura in HPLC fluorimetria per la determinazione di tiamina e suoi esteri fosforici nel sangue per lo studio e la valutazione di danno neurologico in pazienti alcolisti.

La procedura in HPLC, allestita in laboratorio per i diossiderivati amfetaminici, è stata fornita, su richiesta, alle 19 Regioni facenti parte del Gruppo tecnico Istituto-Regioni sulle droghe sintetiche.

AREA 10 - SALUTE E AMBIENTE

Le acque di falda: nuovi indicatori di qualità e rischio sanitario

Responsabile scientifico

Laura Volterra Veca (Laboratorio di Igiene Ambientale)

Sintesi dell'attività svolta

Lo studio, condotto in varie regioni italiane, ha evidenziato che acquedotti alimentati con acque di falda, ritenute naturalmente protette da fenomeni di inquinamento, sono soggetti a periodiche presenze indesiderate di microrganismi e di forme di vita superiore.

Questi indicatori biologici di vulnerabilità sono correlati a parametri di vulnerabilità fisico-chimici e chimici come conducibilità, COD, TOC, ossidabilità, pH e concentrazioni Ca^{+2} . Lo studio ha consentito la formulazione di un modello predittivo dei momenti di maggiore scadimento della qualità di acque di falda di un suolo carsico.

La diffusione di enterococchi vitali ma non coltivabili e di batteri emolitici e antibioticoresistenti anche in acquiferi di grande profondità ha messo in rilievo nuovi e interessanti interrogativi di rischio sanitario.

Aspetti igienico-sanitari della disinfezione delle acque*Responsabile scientifico*

Massimo Ottaviani (Laboratorio di Igiene Ambientale)

Sintesi dell'attività svolta

Il progetto ha permesso di verificare la possibilità dell'uso del P.A.A. nella disinfezione delle acque, sia dal punto di vista igienico-sanitario che tecnico-economico. In particolare, oltre a determinare l'efficienza nei confronti di diversi microrganismi ambientali e di origine antropica, è stata valutata la potenziale formazione di by-products della disinfezione stessa.

Inoltre, ha avuto inizio una ricerca sperimentale sulle potenzialità disinfettanti del biossido di cloro. Gli obiettivi della ricerca fanno particolare riferimento alla neoformazione del composto clorito e clorato e alla possibilità di ridurne la presenza nelle acque.

Culture cellulari in tossicologia: sviluppo di appropriati modelli di screening e studio di meccanismi specifici di tossicità*Responsabile scientifico*

Annalaura Stamatì (Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia)

Sintesi dell'attività svolta

È stato caratterizzato il pattern enzimatico relativo all'ossido nitrico sintasi in cellule Caco-2, sia in condizioni basali che dopo trattamento con diverse molecole pro-infiammatorie, evidenziando l'attivazione specifica dell'isoforma inducibile.

È stata inoltre analizzata la capacità di queste cellule di essere modulate nella produzione di ossido nitrico (NO) anche in relazione con il grado di differenziamento. Ad un'analisi preliminare le Caco-2 sembrano esprimere in maniera costitutiva le interleuchine IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10.

Per quanto riguarda l'espressione di beta recettori, questa sembra essere assente nelle cellule in crescita (5 giorni di coltura), contrariamente a quanto avviene nelle cellule differenziate. Le fosfatasi PP1 e PP2A sono espresse in maniera costitutiva e risultano diversamente modulate dopo trattamento con acido ocaidaico e DTX-1.

Il trattamento con acido ocaidaico provoca in cellule Caco-2 un'alterazione del foglietto epiteliale già dopo quattro ore di esposizione alla tossina. L'effetto è reversibile se le cellule vengono esposte per tempi brevi (4/6 ore) mentre diventa irreversibile quando l'esposizione è protratta nel tempo (24 ore).

Destino nella biosfera e impatto sull'uomo di microcontaminanti chimici tossici di elevato interesse igienico-sanitario*Responsabile scientifico*

Alessandro di Domenico (Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia)

Sintesi dell'attività svolta

Ai fini della definizione/verifica di procedure analitiche, sono state effettuate numerose determinazioni mediante HRGC-(HR)MS dei microcontaminanti organici persistenti d'interesse in varie matrici (es. sedimento marino, matrici di riferimento ambientali, emissioni termiche gassose, particolato Diesel, fluidi dielettrici, biota marino, prodotti alimentari, aria ambientale, campioni umani). Allo scopo sono state impiegate primariamente *la supercritical fluid extraction (SFE)* con CO₂, e *l'accelerated solvent extraction (ASE)*. Sono continuate le prove per la ricerca di condizioni operative ottimali per il rilevamento di PCB, pp'-DDE, HCB e altri eventuali microcontaminanti tossici in materiali biologici. Sono state definite e verificate procedure per il rilevamento di contaminanti organici volatili (es. benzene, toluene, xileni, aldeidi, chetoni) negli scarichi gassosi di motori a combustione interna per autotrazione.

L'Istituto ha partecipato al programma comunitario identificato dalla Direttiva 93/5/EEC (EU Scientific Co-operation - Task 3.2.5), giunto a completamento nel 2000; in accordo con gli impegni di collaborazione, numerosi dati d'esposizione umana a PCB diossina-simili, PCDD, e PCDF tramite la dieta sono stati elaborati e trasmessi, nel corso di circa due anni, al coordinatore del programma presso il RIVM (Bilthoven, The Netherlands). Obiettivo primario dello studio era la raccolta esaustiva d'informazione pertinente per consentire una valutazione affidabile dell'esposizione della popolazione dell'Unione Europea ai tossici predetti. Sulla base dei dati raccolti, la Task Force "Dioxin" dello Scientific Committee on Food (EC-SCF), istituita alla fine del 1999, ha eseguito uno studio approfondito sui livelli ricorrenti di contaminazione negli alimenti prodotti in Europa occidentale. Lo studio dello SCF ha riguardato anche una valutazione ulteriore della tossicologia dei contaminanti predetti, una nuova definizione del TDI (o t-TWI), e l'individuazione di criteri di gestione/riduzione del rischio.

Effetti molecolari e cellulari di UVA e UVB e della loro interazione con agenti fotosensibilizzanti*Responsabile scientifico*

Orazio Sapora (Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia)

Sintesi dell'attività svolta

Sono state impiegate due differenti linee cellulari umane in grado di reagire in maniera differente all'induzione di stress ossidativo prodotto o da agenti fisici o da agenti chimici o dalla loro interazione, quattro linee stabilizzate di Hamster Cinese e due linee primarie umane.

Come agenti fisici sono stati impiegati le radiazioni ionizzanti e gli UVR sul campo di UVA e UVB. Come agenti chimici sono state impiegate sostanze di impiego in farmacopea, come i fluorochinoloni e il furazolidone, ed estratti vegetali, come gli oli essenziali di timo, citronella ed eucalipto.

Le tecniche impiegate sono quelle relative alla valutazione di: effetto tossico, sopravvivenza; effetto mutageno, selezione di cloni HGPRN negativi; effetto sulle membrane cellulari, tempi di vita e *frame-shift* di fluorofori specifici; effetto sul DNA cellulare, mediante le tecniche di elettroforesi PFGE e *Comet Assay*.

- Farmaci

Sono continuati gli studi sui meccanismi cellulari e molecolari dell'azione fotosensibilizzante di fluorochinoloni. È stato chiarito il meccanismo che porta alla lisi e alla morte cellulare. Il farmaco si intercala nella membrana cellulare alterandone la fluidità. Questa alterazione in assenza di UVA è transitoria e dopo circa due ore il farmaco viene progressivamente rimosso. Quando le cellule vengono invece esposte a UVA la membrana mostra un forte aumento, non reversibile, di rigidità e quindi di fragilità. Si è inoltre studiato l'effetto del furazolidone sul DNA cellulare. Si è dimostrato che il danno aumenta al diminuire della concentrazione di ossigeno e che almeno parte della riparazione è *Nucleotide Excision Repair (NER)* dipendente. Il farmaco agisce attraverso due differenti meccanismi in presenza e in assenza di ossigeno. In presenza produce danni indiretti mediante specie reattive dell'ossigeno, in sua assenza producendo addotti;

- Estratti di oli essenziali

Sono state messe a punto differenti metodiche per confrontare gli effetti tossici su differenti tipi cellulari come le HL60, una linea tumorale umana linfoblastoide che cresce in sospensione, e fibroblasti umani primari. Queste tecniche valutano: la sopravvivenza cellulare, mediante l'analisi di curve di crescita; le variazioni del ciclo cellulare e l'apoptosi, mediante tecniche combinate di

citofluorimetria di flusso e di elettroforesi; variazioni morfologiche mediante l'impiego di fluorofori e microscopia in epifluorescenza. I risultati hanno dimostrato che dei tre oli essenziali impiegati (citronella, timo e eucalipto) i primi due sono tossici a concentrazioni micromolari e che il timo agisce inducendo apoptosi, mentre la citronella blocca la duplicazione cellulare producendo cellule morfologicamente alterate;

- Modelli di differenziamento cellulare *in vitro*

Questi sistemi sono non solo in grado di andare incontro *in vitro* a differenziamento, ma anche di mimare processi tipici dell'invecchiamento cellulare. Sono state messe a punto metodiche per lo studio degli effetti di farmaci e di stress ossidativo in funzione dei differenti stati fisiologici della cellula. Tali metodi comprendono il rilevamento di danni sulle membrane, sul DNA cellulare e sulle strutture cellulari mediante impiego di fluorofori specifici.

Elementi e salute: aspetti tossicologici, ecotossicologici e terapeutici

Responsabile scientifico

Sergio Caroli (Laboratorio di Tossicologia Applicata)

Sintesi dell'attività svolta

Un notevole impegno è stato dedicato alle attività derivanti dalle funzioni assegnate all'Istituto in qualità di Laboratorio Comunitario di Riferimento per i residui negli animali vivi e nei loro prodotti (Direttiva 1999/23/CE del 29/4/1996 e DL.vo n. 336 del 4/8/1999). Nel corso del 2000 ciò ha comportato principalmente:

- la continuazione dell'azione di verifica e armonizzazione delle prestazioni dei laboratori nazionali di riferimento negli stati membri dell'Unione Europea per quanto concerne elementi in traccia in carne bovina e miele in soluzioni simulanti matrici reali, nonché la ricognizione preliminare delle capacità operative per organoclorurati, carbammati, piretroidi, organofosforici, policlorobifenili, policlorodibenzodiossine e policlorodibenzofurani.
- Sono stati, inoltre, approntati nuovi materiali di riferimento multielementari in matrice di carne bovina e miele, avviati nuovi circuiti per il controllo di qualità delle determinazioni analitiche di elementi in traccia in matrici biologiche e ambientali e messe a punto nuove metodologie per la speciazione chimica di elementi in fluidi biologici e tessuti animali;
- il supporto permanente, informativo e sperimentale, ai laboratori nazionali (manuali, basi di dati, documentazione varia, valutazione di metodi, preparazione e analisi di campioni);
- la consulenza costante ai servizi della Commissione Europea per le attività relative ai residui sia nei confronti degli stati membri che dei Paesi non comunitari.

È proseguita intensamente la partecipazione dell'Istituto agli impegni derivanti dalla verifica della applicazione dei principi di buona pratica di laboratorio presso i centri di saggio, sia in sede OCSE che comunitaria (Direttive 1999/11/CE e 1999/12/CE, 8/3/1999) e nazionale (DM 5 /8/1999).

È stato svolto un intenso lavoro per la programmazione, conduzione e valutazione del Piano esecutivo annuale del Programma nazionale di ricerca in Antartide, in accordo a quanto previsto dalla Legge n. 380 del 27/11/1991 e della Legge n. 266 del 7/8/1997.

Infine, l'impiego diagnostico dell'analisi dei capelli umani per la valutazione dell'esposizione professionale e ambientale ad elementi potenzialmente tossici è stato esteso a categorie specifiche (settore orafa, spedizioni antartiche).

È stata studiata l'azione del platino in farmaci antitumorali anche in associazione a trattamenti radioterapici o ad altri farmaci.

L'esposizione a platino, rodio e palladio in conseguenza dell'uso di marmitte catalitiche per veicoli a motore è stata oggetto di indagini che hanno permesso di accertare l'effettivo impatto dei tre metalli sulla salute e sull'ambiente.