



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari
Dipartimento Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche
(STEBICEF)
BIO/10 - Biochimica

STUDIO DEL MECCANISMO ERIPTOTICO DI OSSISTEROLI

DOTTORE
Dott. ANNA FRAZZITTA

COORDINATORE
Prof.ssa PATRIZIA DIANA

TUTOR
Prof.ssa LUISA TESORIERE

CO TUTOR
Dott. ALESSANDRO ATTANZIO

CICLO XXXII
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2020

Nel buio cercavi la luce. Adesso sei tu la Luce.

Alla più bella Stella in cielo che mi guida e mi protegge.

INDICE

1.INTRODUZIONE	5
1.1 Gli Eritrociti	5
1.1.1 Origine, proprietà e funzioni	5
1.1.2 La membrana degli eritrociti	6
1.1.3 Stress ossidativo negli eritrociti.....	9
1.1.4 Meccanismi di difesa antiossidanti negli eritrociti	10
1.1.5 Fonti di specie ossidanti negli eritrociti.....	12
1.1.6 Senescenza degli eritrociti	28
1.1.7 Eriptosi: la morte programmata degli eritrociti	30
1.2 Gli Ossisteroli.....	41
1.2.1 Vie di formazione degli ossisteroli.....	42
1.2.2 Fonti di ossisteroli	45
1.2.3 Livelli tissutali di ossisteroli.....	45
1.2.4 Funzioni fisiologiche degli ossisteroli.....	47
1.2.5 Citossicità degli ossisteroli	51
1.3 Background del mio progetto di ricerca	57
2. OBIETTIVO DELLA RICERCA	58
3. MATERIALI E METODI	59
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	63
4.1 Il 7-KC attiva l'RBC-NOX	63
4.2 Il TRIOLO attiva l'RBC-NOS	67
4.3 Il TRIOLO induce l'ossidazione dell' emoglobina e perdita dell'eme	71

4.4 7-KC, TRIOLO e XOR	73
4.5 7-KC e TRIOLO in combinazione inducono la simultanea attivazione di RBC-NOX e RBC-NOS.....	75
5.CONCLUSIONE.....	77
6. BIBLIOGRAFIA.....	78

1.INTRODUZIONE

1.1 Gli Eritrociti

1.1.1 Origine, proprietà e funzioni

I globuli rossi (RBC) o eritrociti rappresentano la popolazione cellulare più abbondante nel sangue; in condizioni fisiologiche, gli eritrociti in circolo sono approssimativamente pari a 4×10^{12} / L, quasi la metà del volume totale di sangue. Negli individui adulti si formano circa 2 milioni di eritrociti al secondo, in un processo noto come eritropoiesi, a partire dalle cellule staminali ematopoietiche, progenitrici di tutti gli elementi figurati del sangue e soggetto al controllo ormonale dell'eritropoietina. Da queste cellule pluripotenti si forma la cellula progenitrice della linea mieloide, che va incontro a differenti stadi differenziativi e di maturazione che portano alla perdita dei mitocondri, del nucleo e di altri organuli citoplasmatici. Dal disfacimento del nucleo si forma un reticolo che caratterizza lo stadio differenziativo dei reticolociti il quale precede la formazione del globulo rosso. Al termine dell'eritropoiesi l'estrusione di questo reticolo porta alla formazione dei globuli rossi maturi, con un elevato contenuto di emoglobina ossigenata (nell'uomo la concentrazione corpuscolare media di emoglobina (MCHC) varia tra 32 e 36 g / dl) che conferisce loro il caratteristico colore rosso, un diametro di circa 7,4 μm e un'altezza media di 2,5 μm e dalla peculiare forma a disco biconcavo, con un elevato rapporto superficie/volume che favorisce gli scambi gassosi. Gli eritrociti sono inoltre caratterizzati da elevata elasticità e deformabilità che ne permette il passaggio attraverso la fitta rete capillare [1,2]. La principale funzione dei globuli rossi è di assicurare lo scambio di ossigeno (O_2), anidride carbonica (CO_2) e sostanze nutritive a livello del microcircolo, costituito dalle arteriole distali, il sistema capillare e le venule prossimali. Il diametro dei capillari è significativamente inferiore al diametro dei globuli rossi. Quindi la capacità dei globuli rossi di deformarsi è cruciale per il passaggio attraverso i capillari e il mantenimento della microcircolazione fisiologica [3]. Le proprietà meccaniche intrinseche dei globuli rossi influenzano infatti la reologia e le proprietà emodinamiche del sangue. Gli eritrociti sono anche essenziali nel controllo del pH fisiologico del sangue e nel mantenimento dell'equilibrio acido-base sistemico. Recentemente è stato osservato che i globuli rossi partecipano

attivamente al benessere del sistema cardiovascolare. Ai globuli rossi è stata attribuita una funzione eritrocina (endocrina) di rilascio di molecole bioattive, quali ossido nitrico (NO) e ATP due importanti modulatori dell'omeostasi vascolare, durante lo shear stress e l'ipossia, rispettivamente [2].

1.1.2 La membrana degli eritrociti

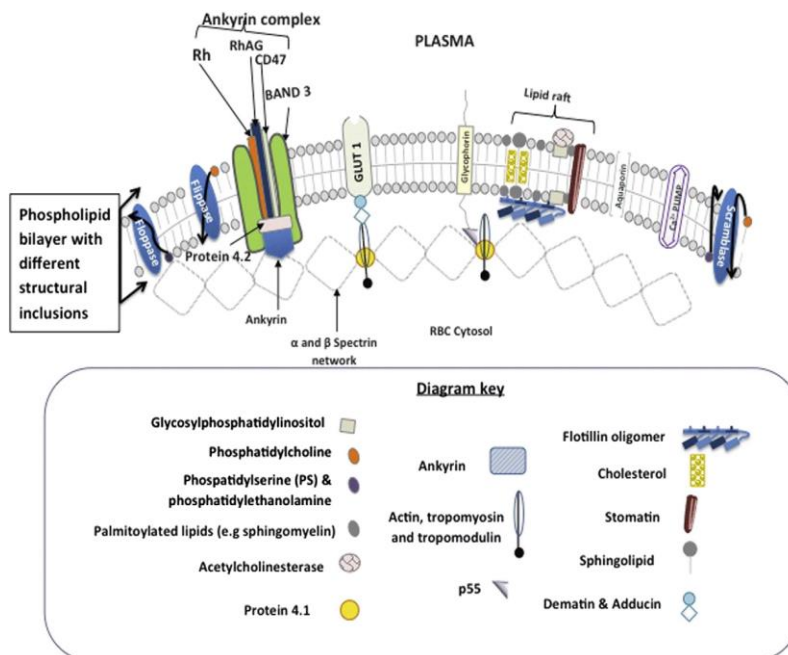


Fig.1. Struttura della membrana degli RBC. Da: Erythrocytes and their role as health indicator: Using structure in a patient-orientated precision medicine approach [29].

Le proprietà della membrana eritrocitaria derivano dalla composizione del doppio strato lipidico, nel quale sono inserite le proteine integrali di membrana con attività enzimatiche, di trasporto o recettoriali, collegato ad una struttura citoscheletrica tale da permettere alle cellule di subire grandi deformazioni reversibili pur mantenendo le loro proprietà fisiologiche durante i 120 giorni di vita in circolo. I lipidi di membrana, sono fosfolipidi, glicolipidi e colesterolo. Il colesterolo è equamente distribuito tra lo strato interno e quello esterno della membrana, mentre i fosfolipidi presentano una distribuzione asimmetrica: gli amino fosfolipidi, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina (PS e PE) sono prevalentemente distribuiti all'interno e i fosfolipidi contenenti colina fosfatidilcolina e sfingomieline (PC e SM) all'esterno. La sfingomieline è lo sfingolipide più abbondante ed è costituita dal ceramide, porzione idrofobica ed elemento base di tutti gli sfingolipidi, dal fosfato e dalla colina come

testa polare [4]. Questa specifica composizione garantisce ai globuli rossi una certa fluidità della membrana, necessaria per modulare le funzioni cellulari e ne influenza il comportamento reologico [5]. La perdita di asimmetria dei fosfolipidi di membrana conduce all'esposizione della PS sul versante extracellulare della membrana eritrocitaria, un evento cruciale per la rimozione dei globuli rossi danneggiati, infetti o invecchiati da parte del sistema reticoloendoteliale. Tre proteine di membrana mantengono la distribuzione asimmetrica dei fosfolipidi di membrana e sono la flippasi, la floppasi e la scramblasi (Fig.1). La floppasi (ATP-dipendente) controlla il trasferimento aspecifico contro gradiente di concentrazione dei fosfolipidi dal monostato interno a quello esterno. La flippasi (amino-fosfolipide-translocasi) è una ATPasi che pompa specificamente gli amino fosfolipidi dall'esterno all'interno. La scramblasi (Ca^{2+} dipendente) effettua un trasporto passivo bidirezionale dei fosfolipidi lungo gradiente di concentrazione attraverso la membrana, forma un poro idrofilo che facilita la migrazione delle teste polari attraverso le code idrofobe del doppio strato mantenendo le catene aciliche all'interno. Il catione bivalente Ca^{2+} gioca un importante ruolo nella distribuzione dei fosfolipidi di membrana. L'omeostasi del Ca^{2+} negli eritrociti è mantenuta attraverso l'azione concertata di un meccanismo di estrusione ATP-dipendente del Ca^{2+} citosolico (pompe del Ca^{2+}), e l'ingresso del Ca^{2+} extracellulare attraverso i canali del calcio. In presenza di elevate concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare questa distribuzione viene meno, sia per inibizione della flippasi, che consente il mantenimento dell'asimmetria di membrana, sia per attivazione della scramblasi, che facilita la perdita dell'asimmetria di membrana con conseguente comparsa della PS sulla superficie esterna della membrana [4]. Strutture lipidiche, principalmente colesterolo e sfingolipidi e proteine di membrana, quali flotillina, stomatina, proteine G e recettori β adrenergici, si trovano aggregate in microdomini della membrana chiamati rafts lipidici formando aree specializzate nella trasduzione del segnale (Fig.1). La membrana eritrocitaria è inoltre attraversata da alcune proteine con funzione strutturale o di trasporto quali pannessina1 (Pnx 1), banda3 o glicoforine (Fig.1). La Pnx1 sembra essere coinvolta nel rilascio di ATP [6] mentre la banda 3 e le glicoforine sono necessarie per la connessione del doppio strato fosfolipidico al citoscheletro. La proteina banda 3, in particolare regola la struttura e alcune funzioni dei globuli rossi. È una proteina integrale di membrana presente in forma tetramerica che funge da canale passivo per lo scambio di anioni attraverso la membrana, lega

l'emoglobina e costituisce un importante sito di ancoraggio per il citoscheletro. L'anidride carbonica dai tessuti diffonde attraverso la membrana dei globuli rossi dove l'anidrasi carbonica 2(CAII), catalizza la sua idrolisi per produrre bicarbonato (HCO_3^-) e un protone (H^+). Il bicarbonato intracellulare viene scambiato con il cloruro extracellulare in un rapporto stechiometrico di 1:1, attraverso la banda 3. La conseguente riduzione del pH promuove il rilascio dell'ossigeno dall'emoglobina ai tessuti in un processo noto come effetto Bohr. Questo processo è invertito nei polmoni. Il tetramero di banda 3 ancora il doppio strato fosfolipidico al citoscheletro mediante l'interazione tra il suo dominio citoplasmatico e una proteina chiamata ankirina che a sua volta interagisce con la spettina [4] (Fig.1). La trasformazione da reticolociti a globuli rossi maturi e l'invecchiamento di questi ultimi è associato a riorganizzazioni radicali della membrana plasmatica. La riduzione della superficie della membrana cellulare mediante esocitosi durante la maturazione dei reticolociti consente alle cellule di ridurre o eliminare completamente un certo numero di recettori e trasportatori ionici che svolgono un ruolo attivo nella differenziazione delle cellule precursori della linea eritroide ma che non sono più richieste nel globulo rosso maturo. Tra i più noti vi è il recettore per la transferrina. Anche il numero di copie della Na^+/K^+ -ATPasi, del trasportatore Na^+ /glicina e del cotrasportatore K^+/Cl^- viene ridotto riducendo il dispendio energetico della cellula e rendendola più stabile. Numerosi trasportatori ionici che non sono estrusi negli esosomi durante il processo di maturazione del globulo rosso subiscono un'inattivazione dipendente dall'età. L'attività del canale di Gardos si riduce con l'invecchiamento. Analogamente, anche il numero di copie dei recettori dell'N-metil D-aspartato (NMDA), dei canali cationici non selettivi per il Ca^{2+} e l'attività della pompa del Ca^{2+} diminuiscono con l'età cellulare [7]. Lo stress ossidativo correlato all'invecchiamento è un evento localizzato sulla membrana eritrocitaria, un facile bersaglio per radicali liberi e reazioni ossidative. Le fonti cellulari di radicali liberi sono compartimentalizzate. La maggior parte di esse è localizzata all'interno della membrana o ancorata alle proteine di membrana sul lato citosolico, mentre gli enzimi che le detossificano e il GSH sono distribuiti casualmente all'interno del citosol. Nei globuli rossi invecchiati, l'accumulo di emoglobina sulla superficie di membrana e la sua auto-ossidazione porta alla formazione di anione superossido che non può essere neutralizzato dalle componenti citosoliche antiossidanti. L'ossidazione dei lipidi

insaturi di membrana può provocare cambiamenti di fluidità del doppio strato, aumento della permeabilità agli ioni, reticolazione covalente dei costituenti proteici e lipidici della membrana, alterazione degli enzimi e dei recettori di membrana. Malondialdeide e idrossinonenale, prodotti della perossidazione dei lipidi di membrana, possono inoltre ulteriormente reagire con proteine e lipidi ed esercitare notevoli effetti tossici [8].

1.1.3 Stress ossidativo negli eritrociti

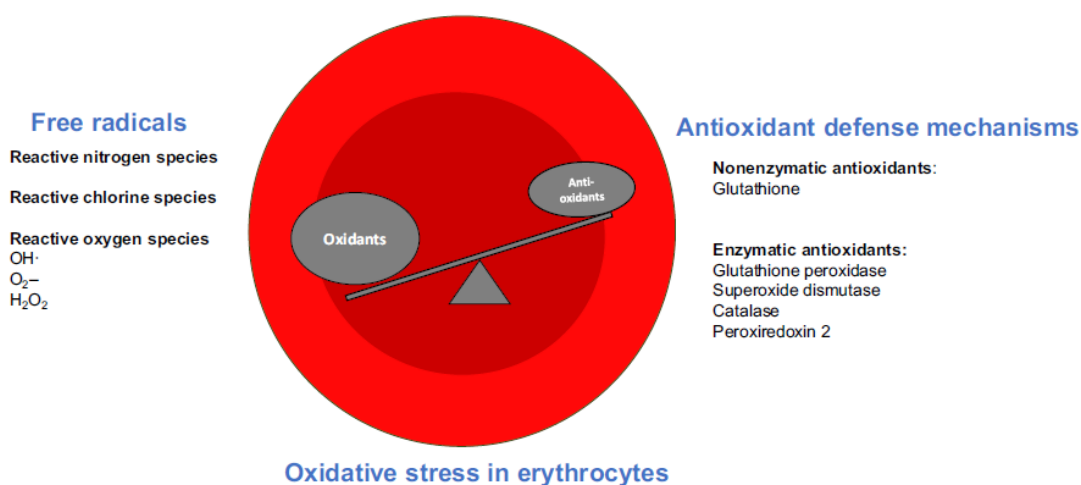


Fig.2. Stress Ossidativo negli RBC. Da *Oxidative stress, eryptosis and anamia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases* [33].

In generale, i radicali liberi possono essere raggruppati in specie reattive dell'ossigeno ROS, specie reattive dell'azoto (RNS) e specie reattive di cloro (RCS) (Fig.2). Lo stress ossidativo è definito come una produzione aumentata e/o una ridotta eliminazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). L'equilibrio tra la rimozione e la produzione di ROS cellulare è definito come "stato redox". I radicali liberi sono considerati utili in piccole quantità come secondi messaggeri o poiché servono a combattere i virus e i patogeni. Tuttavia, se prodotti in eccesso, possono essere deleteri per le cellule poiché provocano l'ossidazione di varie molecole e componenti cellulari. Specie reattive dell'ossigeno o dell'azoto possono essere prodotte dal globulo rosso per via enzimatica ed anche una pronunciata auto-ossidazione dell'emoglobina può contribuire allo stress ossidativo negli eritrociti. Inoltre nel flusso sanguigno, gli eritrociti circolanti sono continuamente esposti a specie reattive

dell'ossigeno. Un danno ossidativo esteso può inficiare l'integrità del globulo rosso e causare emolisi, contribuendo alle complicanze associate a gravi patologie tra cui la disfunzione endoteliale. Pertanto, queste cellule sono provviste di un efficiente sistema di difesa antiossidante, che mantiene inalterate la loro funzione e struttura processando e disattivando le specie reattive dell'O₂ e dell'N₂.

1.1.4 Meccanismi di difesa antiossidanti negli eritrociti

I globuli rossi sani sono molto resistenti al danno ossidativo attraverso un efficiente sistema di difesa antiossidante che include antiossidanti non enzimatici come il glutatione (GSH), la vitamina C (acido ascorbico), la vitamina E (α-tocoferolo) e antiossidanti enzimatici, tra cui la glutatione perossidasi, la superossido dismutasi (SOD), la catalasi e la perossiredossina 2. Tra questi il glutatione, un tripeptide formato da glutammato cisteina e glicina (γ-glutamyl-cisteinil-glicina) che presenta una forma ridotta (GSH) e una forma ossidata (GSSG) e gli enzimi del ciclo redox del GSH, la glutatione perossidasi (G-Px) e la glutatione reduttasi (G-Red), sono molto importanti [9]. Il rapporto tra glutatione ridotto (GSH) e glutatione ossidato (GSSG) è un marker affidabile dello stato redox intracellulare [7]. Quando l'equilibrio redox dei globuli rossi è mantenuto, la concentrazione di GSH è molto superiore alla concentrazione di GSSG. Nei globuli rossi sani il 90%-95% del GSH si trova in forma ridotta, utilizzabile per ridurre lipidi o proteine ossidate [10]. La glutatione perossidasi (G-Px) catalizza la riduzione di perossidi come l'H₂O₂ ad H₂O con ossidazione del GSH ridotto. La forma ossidata GSSG, un omodimero costituito da molecole di GSH legate da un ponte disolfuro, è quindi rapidamente ridotta a due molecole di glutatione (GSH) dall'enzima glutatione reduttasi (G-Red) che richiede nicotinamide adenina dinucleotide fosfato, NADPH, come agente riducente, fornito dalla degradazione del glucosio attraverso la via dei pentosi fosfati. Il sistema di difesa antiossidante è strettamente connesso allo stato energetico dei globuli rossi. Il GSH non attraversa la membrana passivamente e la sintesi di GSH è l'unica fonte di GSH negli eritrociti. La sintesi di glutatione richiede ATP. La produzione di energia nei globuli rossi dipende dalla glicolisi anaerobia data la mancanza di mitocondri. L'NADH prodotto dalla glicolisi è inoltre necessario per il mantenimento dell'emoglobina allo stato ferroso in una reazione catalizzata dall'enzima citocromo b5 metaemoglobina reduttasi NADH

dipendente. I livelli di GSH intracellulari diminuiscono durante la trasformazione dei reticolociti negli eritrociti maturi, dopodiché la sua concentrazione rimane pressoché costante in quanto rimangono invariate le attività della γ -glutamylcisteina sintasi e quella della GSH sintasi, i due principali enzimi coinvolti nella sintesi del glutatione. L'attività degli enzimi chiave della glicolisi esochinasi, piruvato chinasi e glucosio 6-P deidrogenasi così come l'attività dell'aspartato amino transferasi che serve a formare il glutammato per la sintesi del GSH diminuiscono progressivamente durante l'invecchiamento cellulare. Anche il trasporto di glucosio attraverso la membrana degli eritrociti diminuisce con l'invecchiamento cellulare. Gli eritrociti giovani metabolizzano 2,5 volte più glucosio rispetto quelli vecchi. I livelli di ATP intracellulari si riducono del 30-40% a seguito della meno efficiente glicolisi anaerobia, contribuendo alla minore produzione di GSH negli eritrociti più vecchi [7]. Oltre alla glutatione perossidasi, altri enzimi utilizzano il GSH come fonte di equivalenti riducenti. La glutaredossina utilizza il GSH come cofattore per ridurre le proteine ossidate e l'ascorbato. Inoltre, la glutatione-S-transferasi utilizza GSH per la detossificazione da xenobiotici [11]. La superossido dismutasi è una metalloproteina che dismuta $O_2^{\cdot-}$ in H_2O_2 e O_2 . La famiglia degli enzimi SOD comprende tre isoforme con differenti caratteristiche strutturali del gruppo prostetico (contenente manganese o rame e zinco) e differente compartimentalizzazione e significato funzionale. L'isoforma SOD1 contenente rame o zinco è molto importante nell'RBC maturo e catalizza la dismutazione dell'anione superossido formato prevalentemente durante l'auto-ossidazione dell'emoglobina [10]. A pH 7,4 la velocità con cui avviene questa reazione è $\sim 2 \times 10^9 M^{-1} sec^{-1}$, circa 10^4 volte più veloce della dismutazione spontanea dell'anione superossido [8]. Successivamente l'eme proteina catalasi neutralizza l' H_2O_2 con formazione di acqua e ossigeno. Il perossido di idrogeno può essere neutralizzato anche dalla glutatione perossidasi o dalla perossiredossina. La glutatione perossidasi ha una costante di Michaelis-Menten, K_m per il perossido di idrogeno inferiore rispetto alla catalasi, essendo maggiore la sua affinità per il substrato quindi può neutralizzare il perossido di idrogeno ad una concentrazione inferiore [8]. In condizioni fisiologiche la glutatione perossidasi degrada la maggior parte dell' H_2O_2 ossidando il GSH in GSSG. In caso di sovrapproduzione di anione superossido e quindi di elevate concentrazioni di perossido di idrogeno interviene la catalasi. Anche le attività di SOD e catalasi diminuiscono durante l'invecchiamento [7].

L'associazione della perossiredossina, che partecipa alla riduzione dei perossidi organici (ROOH), alla membrana eritrocitaria rende questo enzima particolarmente importante per la protezione contro la perossidazione lipidica. La perossiredossina, perossidasi dipendente dalla tioredossina, utilizza gli equivalenti riducenti della tioredossina un altro enzima antiossidante presente nei globuli rossi, che riduce i ponti disolfuro delle proteine ossidate. La tioredossina è mantenuta nella sua forma ridotta dalla tioredossina reduttasi, che utilizza NADPH come agente riducente. Infine, i globuli rossi possono assumere grandi quantità di vitamina C e vitamina E, utilizzati per proteggere la membrana dai danni ossidativi.

1.1.5 Fonti di specie ossidanti negli eritrociti

1.1.5.1 Denaturazione ossidativa dell'emoglobina

Il principale ruolo funzionale dei globuli rossi è il trasporto di ossigeno dai polmoni ai tessuti fornendo l'ossigeno richiesto a tutte le cellule dell'organismo. Il contenuto di emoglobina (Hb) all'interno degli RBC, pari al 95-97% delle proteine citosoliche e il legame reversibile dell'ossigeno all'Hb, sono alla base di tale funzione.

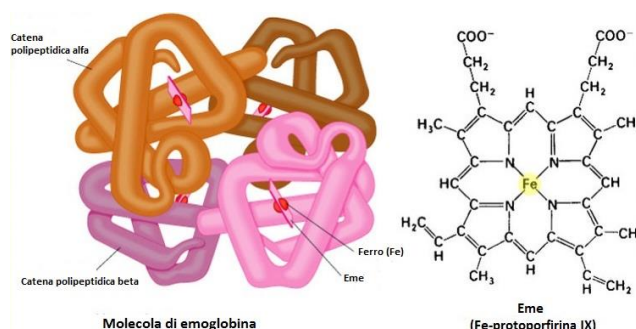
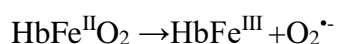


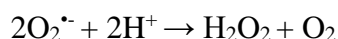
Fig.3. Struttura dell'emoglobina (Hb) e del gruppo eme.

L'emoglobina (Hb) è una proteina tetramerica, formata da quattro subunità proteiche, le globine (2 α e 2 β), ciascuna delle quali contiene un gruppo prostetico eme, che interagisce con la globina mediante il legame con un residuo di istidina (Fig.3). Ciascun gruppo eme contiene al centro un atomo di ferro allo stato ferroso (Fe^{2+}), in grado di formare sei legami di coordinazione, quattro con i quattro anelli pirrolici dell'eme e allo stato deossigenato, due con le istidine delle globine (Fig.3). Nell'Hb ossigenata (HbO_2) un legame viene mantenuto con una molecola di istidina ed il secondo legame viene contratto con una molecola di O_2 . Ogni molecola di Hb è

pertanto in grado di legare 4 molecole di ossigeno. Il ferro ferroso di ciascun gruppo eme può ossidarsi e passare allo stato ferrico (Fe^{3+}) ma solamente il Fe^{2+} è in grado di legare e rilasciare O_2 : di conseguenza l'emoglobina ossidata, detta metaemoglobina (Met-Hb) non è più funzionale. La Met-Hb è dunque la forma nella quale il Fe^{2+} è ossidato a Fe^{3+} che perde la capacità di trasportare ossigeno. Malgrado il ferro ferroso dell'eme sia protetto dall'ossidazione dalla struttura globulare della globina, avviene tuttavia una continua e lenta auto-ossidazione dell'Hb quando questa lega l'ossigeno con produzione di anione superossido. Sebbene l'emoglobina ossigenata [$\text{Hb}(\text{Fe}^{\text{II}})\text{O}_2$] sia considerata una molecola relativamente stabile, può infatti fisiologicamente auto ossidarsi in metaemoglobina [$\text{Hb}(\text{Fe}^{\text{III}})$] secondo la reazione:

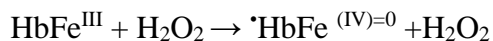
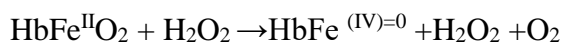


in quantità pari allo 0,5–3% al giorno [10,11]. Una piccola quota di Met-Hb si forma quindi continuamente ma non eccede mai l'1% dell'Hb circolante per opera del sistema enzimatico della metaemoglobina reductasi presente nel globulo rosso. L'auto-ossidazione è più pronunciata in caso di condizioni di ipossia e in alcune condizioni patologiche quali l'anemia falciforme e la β -talassemia in cui le molecole di emoglobina sono altamente instabili [11]. Gli ioni superossido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) prodotti dall'auto-ossidazione dell'Hb sono rapidamente convertiti in perossido di idrogeno (H_2O_2) per dismutazione spontanea o enzimatica (SOD) del superossido [11,12]:

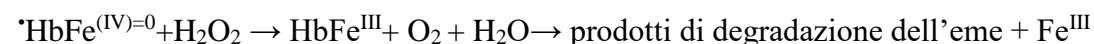
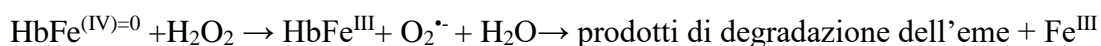


In condizioni fisiologiche lo ione Fe^{3+} della Met-Hb viene ridotto a Fe^{2+} dalla metaemoglobina reductasi e il H_2O_2 e l'anione superossido, sono neutralizzati dall'efficiente sistema antiossidante dei globuli rossi. Normalmente quindi il globulo rosso è in grado di proteggersi da una potenziale importante fonte di stress ossidativo. Gli unici ROS che non vengono neutralizzati dal sistema antiossidante del globulo rosso sono generati dalla piccola frazione di Hb che si lega alla membrana degli RBC. I ROS generati vicino alla membrana sono meno accessibili al sistema antiossidante cellulare, che si trova principalmente nel citoplasma. Inoltre, questi ROS vengono generati dove possono danneggiare la membrana degli RBC e/o essere rilasciati dalla cellula e danneggiare altre cellule e tessuti. La potenziale fonte di stress ossidativo dovuta al legame dell'Hb con la membrana è tuttavia limitata dal fatto che in condizioni ottimali meno dell'1% dell'Hb intracellulare interagisce con la membrana momento per momento [12]. Il perossido di idrogeno potrebbe però dare luogo a

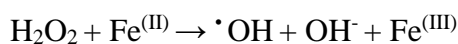
reazioni ossidative secondarie, reagendo sia con l'emoglobina ossigenata che con la metaemoglobina per formare ferril-Hb ($\text{HbFe}^{(\text{IV})=0}$) e ossiferril-Hb ($\text{HbFe}^{(\text{IV})=0}$) rispettivamente[10,11]:



Ferril e ossiferril-emoglobina possono successivamente reagire con il perossido di idrogeno per formare metaemoglobina e causare il susseguente rilascio dei prodotti di degradazione dell'eme e del ferro.



L'eme ha infatti una minore affinità per le globine nella Met-Hb, e questo si traduce in un'aumentata dissociazione dell'eme. L' H_2O_2 può successivamente reagire con l'eme libero con conseguente degradazione dell'eme e rilascio di ferro. Inoltre, in seguito alla reazione della ferril-Hb con H_2O_2 si ottiene la produzione di $\text{O}_2^{\cdot-}$, che promuove ulteriormente la degradazione dell'eme e il successivo rilascio dei suoi prodotti di degradazione e del ferro [$\text{Fe}^{(\text{III})}$]. L'eme e il ferro sono agenti altamente ossidanti. Il ferro in forma libera o legato all'eme e all'Hb, può agire come reagente di Fenton nella reazione di Haber-Weiss, e generare il radicale idrossile (OH^{\cdot}).



A differenza di $\text{O}_2^{\cdot-}$, il radicale idrossile non può essere eliminato enzimaticamente e può quindi promuovere un esteso danno ossidativo. L'impiego di agenti chelanti del ferro ha determinato una riduzione della perossidazione lipidica nelle membrane degli RBC suggerendo che la produzione di ROS e il danno ossidativo sono parzialmente dipendenti dal ferro. L'eme è una molecola idrofobica a basso peso molecolare che può interagire con lipidi e proteine di membrana inducendo reazioni di ossidazione. L'eme può anche attraversare le membrane cellulari e interagire con le proteine plasmatiche e con i lipidi. Può reagire con le lipoproteine a bassa densità (LDL) per produrre LDL ossidate più tossiche o associarsi alle proteine plasmatiche come l'albumina ed essere traslocato in vari tessuti dove può generare effetti tossici. L'eme può infatti legarsi a recettori, fattori di trascrizione ed enzimi. Queste interazioni possono alterare le funzioni cellulari, il metabolismo e la trascrizione genica. Eme e ossiferrile hanno entrambi mostrato avere un effetto pro-infiammatorio che si aggiunge al loro effetto pro-ossidante. Il potenziale pro-ossidante dei prodotti di

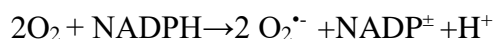
ossidazione dell'emoglobina può essere correlato ad una serie di condizioni patologiche tra cui l'aterosclerosi, la disfunzione renale, l'anemia falciforme e la malaria, quando le reazioni di ossidazione secondarie dell'emoglobina prendono il sopravvento [11,12]. Modifiche nella struttura e nella funzione della membrana degli RBC sono anche causate dalla precipitazione diretta di emoglobina denaturata o delle catene globiniche. L'anemia falciforme e la β -talassemia sono caratterizzate dalla presenza di molecole di emoglobina instabili. Nella β -talassemia tale instabilità è attribuita ad un'alterata produzione di catene globiniche con eccesso di α -globine, mentre nell'anemia falciforme la mutazione colpisce la struttura terziaria e quaternaria dell'emoglobina. In entrambi i casi l'emoglobina instabile tende ad auto-ossidarsi denaturarsi e precipitare come emicromo. L'emicromo è una struttura costituita da tutti i prodotti della denaturazione ossidativa dell'emoglobina, a partire dalla Met-Hb fino alla sua completa dissociazione e al rilascio di eme e ferro. Gli emicromi hanno un'alta affinità per il dominio citoplasmatico della banda 3 e ne inducono la clusterizzazione e dissociazione dalle proteine citoscheletriche attraverso l'interruzione del legame con l'ankyrina. La risultante vescicolazione della membrana è un segnale caratteristico degli eritrociti nell'anemia falciforme e nella β -talassemia [11].

1.1.5.2 Generazione enzimatica di ROS/RNS nei globuli rossi

1.1.5.2.1 NADPH ossidasi

In un recente studio di George et al. [13] è stato dimostrato che negli eritrociti di soggetti affetti da anemia falciforme, oltre all'auto-ossidazione dell'Hb e alla reazione di Fenton, una significativa quota di ROS è generata enzimaticamente dall'attività dell'NADPH ossidasi, la cui subunità catalitica è stata identificata negli RBC umani, sotto il controllo di una PKC e di una Rac-GTPasi. Le NADPH ossidasi sono enzimi appartenenti alla famiglia NOX, nel genoma umano sono stati individuati 7 omologhi NOX: dalla NOX1 alla NOX5 e DUOX1 e DUOX2. Le isoforme NOX, individuate negli RBC sono la NOX1,-2 e -5 [13]. Tutte le isoforme condividono la capacità di trasportare elettroni attraverso la membrana plasmatica e di generare anione superossido e altri ROS. Le funzioni fisiologiche degli enzimi NOX comprendono la difesa antimicrobica, la modifica post-traduzionale delle proteine, la segnalazione

redox cellulare, la regolazione dell'espressione genica e il differenziamento cellulare. I meccanismi di attivazione e la distribuzione tissutale dei diversi membri della famiglia NOX sono notevolmente differenti. Ad eccezione della NOX4, costitutivamente attiva e della NOX5 calcio dipendente, diversi meccanismi omologo-specifici controllano l'attività delle isoforme NOX, tra cui l'attivazione sequenziale mediante fosforilazione di varie proteine e l'interazione proteina-proteina. In generale la NADPH ossidasi è un complesso enzimatico multimerico, il cui centro catalitico chiamato NOX1-NOX5 e DUOX1 e 2 come isoforma enzimatica rispettivamente corrispondente, è ancorato alla membrana (Fig.4). Questa proteina transmembrana è inattiva in forma monomerica. NOX1, NOX2, NOX3 e NOX4 interagiscono con una seconda proteina transmembrana la p22 phox, mentre la NOX 5 dà luogo alla formazione di omodimeri. La p22phox svolge una funzione di scaffold per consentire il corretto assemblaggio del complesso enzimatico cataliticamente attivo. Essa, attraverso una regione ricca di prolina, costituisce un'impalcatura per l'interazione con le proteine attivatrici citosoliche indispensabili per l'attivazione di NOX1, NOX2 e NOX3. La p22phox non è indispensabile per l'attività della NOX4 e NOX5 mentre DUOX1 e 2 richiedono come scaffold per il loro corretto funzionamento due diverse subunità, DUOXA1 e DUOXA2 [14]. L'NADPH ossidasi leucocitaria NOX2, presente nei fagociti professionali e nei linfociti è l'isoforma più studiata. In condizioni di riposo, la NADPH ossidasi fagocitica è inattiva. La stimolazione dei recettori per il peptide formilato di origine batterica o dei recettori per il frammento cristallizzabile Fc anticorpale, attiva l'ossidasi con produzione di $O_2^{\bullet -}$ utilizzando il NADPH come donatore di elettroni. L'ossidasi estrae una coppia di elettroni dal NADPH trasformandolo in $NADP^+$ e li cattura in una catena di elettroni (due gruppi eme e una FAD della gp91) che ha come nucleo il flavocitocromo b, fino a scaricarli su una molecola di ossigeno per formare l'anione superossido:



L' $O_2^{\bullet -}$ formato funge da iniziatore di una vasta gamma di reazioni ossidanti. Per l'attivazione della NOX2 è necessaria sia l'interazione con la subunità citoplasmatica p67phox che con la Rac-GTPasi.

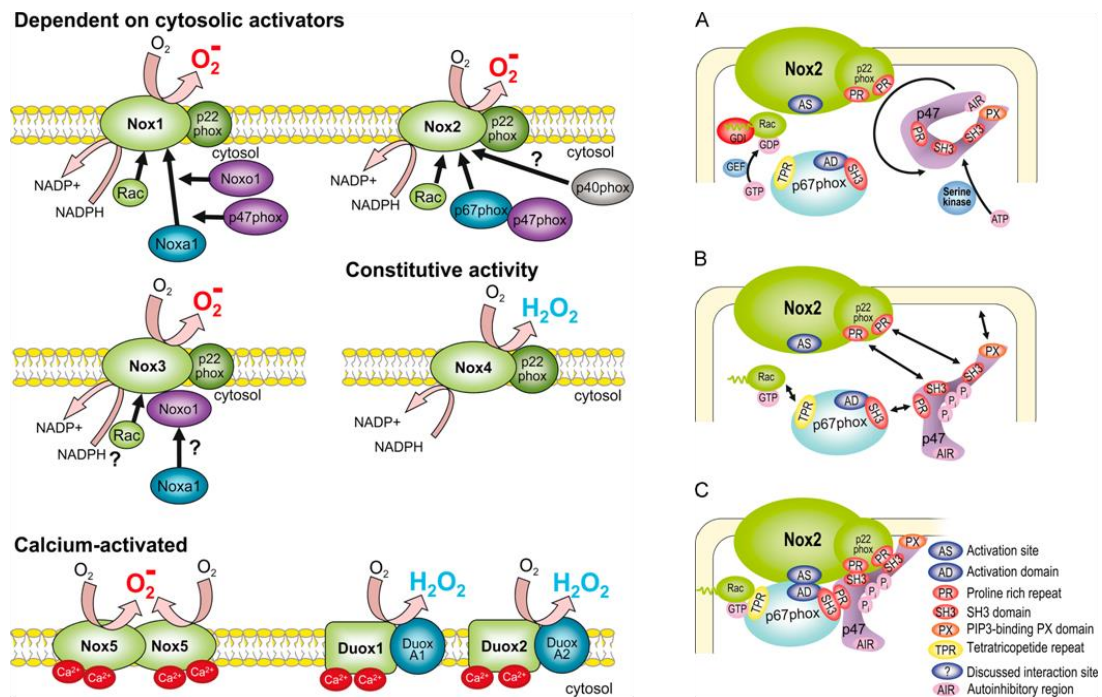


Fig.4. Isoforme NOX e meccanismo di attivazione della NOX2 (A,B,C). Da: Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation [14].

L'attivazione di NOX2 (Fig.4) da parte della p67phox avviene attraverso l'interazione con un dominio situato vicino alla regione N-terminale della p67phox, questa interazione tuttavia non è abbastanza forte da consentire un'associazione stabile delle due molecole. È quindi facilitata dalla p47phox, che funge da proteina adattatrice. In breve, la p47phox attivata lega la p22phox e avvicina la p67phox alla NOX2. In forma non fosforilata la p47phox non interagisce con la membrana cellulare né con le altre subunità dell'enzima in quanto il suo dominio PX di interazione con la membrana e il dominio SH3 di interazione con la p22phox sono nascosti dalla regione inibitoria AIR. La fosforilazione dei residui di serina in posizione 303, 304 e 328 induce una variazione conformazionale della p47phox che espone i domini di interazione in modo tale che il dominio SH3 della p47phox interagisce con la regione ricca di prolina PR della p22phox mentre il dominio PX ancora la p47phox alla membrana. Inoltre un dominio PR ricco di prolina, presente nella regione C-terminale della p47phox, interagisce con il dominio SH3 C-terminale della p67phox. Anche la Rac-GTPasi svolge un ruolo critico per l'attivazione dell'enzima. La proteina Rac appartiene alla famiglia delle Rho GTPasi ed è attivata dal fattore di scambio dei nucleotidi guanilici GEF, mentre la sua disattivazione avviene ad opera della proteina

che attiva la GTPasi denominata GAP. L'interazione con la RhoGDI (Rho GDP-dissociation inhibitor) la mantiene in forma inattiva legata a GDP nel citosol e la sua partecipazione nell'assemblaggio della forma attiva dell'enzima avviene nel seguente modo: il complesso RacGDP-RhoGDI trasloca sulla membrana, Rac-GDP si dissocia da RhoGDI ed avviene lo scambio del GDP con GTP mediato da GEF. La Rac legata a GTP interagisce con il dominio TPR presente nella regione N-terminale della p67phox e ne induce una variazione conformazionale che ne promuove l'interazione con la NOX2. L'attività GTPasica porta la Rac-GTP a riconvertirsi in Rac-GDP che si riassocia con RhoGDI tornando nel citosol. Nel loro insieme queste interazioni consentono il corretto collocamento del dominio di attivazione AD presente nella p67phox in corrispondenza del sito di attivazione AS della NOX2, permettendo l'attivazione dell'enzima.

La NOX1 è particolarmente espressa nelle cellule epiteliali del tratto gastrointestinale ed è stato recentemente osservato che è presente anche negli eritrociti umani insieme alla NOX2, NOX 4 e NOX 5. La NOX1 presenta alcune similitudini con la NOX2. Le proteine citosoliche che interagiscono con NOX1 sono l'omologo della p67phox , Noxa1 e l'omologo della p47phox, Noxo1. Come la NOX2, la NOX1 forma un complesso proteico trans-membrana con la p22phox essenziale per la formazione dell'anione superossido. Diversamente dalla NOX2, tuttavia, la NOX1 presenta un'attività basale dovuta alla mancanza della regione inibitoria AIR nella subunità Noxo1. Ciò si traduce nel fatto che la Noxo1 si trova perennemente ancorata attraverso il suo dominio PX ad alcune strutture lipidiche della membrana plasmatica. La Noxo1 funge da scaffold e lega sia la Noxa1 che la p22phox, aumentando così l'efficienza con cui la Noxa1 interagisce con NOX1. Quest'ultima interazione è un prerequisito fondamentale per l'attivazione di NOX1. Nonostante presenti un'attività costitutiva, la formazione di ROS dipendente da NOX1 è mantenuta sotto controllo da alcuni elementi. Come la NOX2, l'attività di NOX1 dipende dalla Rac-GTPasi, in particolare dalla Rac 1, espressa tutti i tessuti, mentre la Rac 2 è espressa solo nei leucociti. Similmente alla p47phox, la Noxo1 interagisce attraverso i suoi domini SH3 con p22phox ma l'interazione tra Noxo1 e p22phox è notevolmente più debole e potrebbe costituire un meccanismo di controllo autoinibitorio. Anche l'interazione di Noxo1 con Noxa1 è più debole di quella tra p47phox e p67phox. È stato osservato che l'attivazione della proteina chinasi C (PKC) con l'estere del forbolo incrementa la

formazione di ROS dipendente dalla NOX1 nell'uomo. E' stato ipotizzato che la PKC promuova un evento di fosforilazione del complesso enzimatico NOX1 umano che rafforza il legame delle subunità di membrana con i fattori di attivazione citosolici [14].

1.1.5.2.2 Ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS)

In passato la sintesi di ossido nitrico (NO) nel sistema circolatorio era stata attribuita esclusivamente all'endotelio vascolare. Dato il loro elevato contenuto di emoglobina, che notoriamente funge da scavenger di NO, si è da tempo ritenuto che uno dei ruoli dei globuli rossi fosse quello di assorbire e neutralizzare l'NO derivato dall'endotelio attraverso una rapida reazione con l'ossiemoglobina per formare metemoglobina e nitrato, limitando così l'NO disponibile per la vasodilatazione. Sebbene fosse stata identificata nei globuli rossi una ossido nitrico sintasi (NOS), essa fu considerata un enzima non funzionale a causa dell'inattivazione chimica del NO dovuta all'alta concentrazione di emoglobina. Si suppose che l'enzima degli RBC maturi derivasse dalle cellule staminali ematopoietiche e si concluse che avesse perso la sua funzionalità nel corso della differenziazione e maturazione dell'eritrocita (prima dell'emoglobinizzazione dei globuli rossi). Più recentemente, è stato visto che i globuli rossi sono in grado, invece, di legare, trasportare e rilasciare NO in modo reversibile e che quindi sono potenzialmente coinvolti nel controllo della biodisponibilità sistemica di NO e del tono vascolare. Infine è stato dimostrato che i globuli rossi umani esprimono una NOS di tipo endoteliale attiva e funzionale (RBC-NOS), che produce costitutivamente NO in condizioni normossiche, contribuendo in modo significativo al pool di NO intravascolare [15,16]. Inoltre l'attività di questo enzima è compromessa nei pazienti con malattia coronarica [17,18]. L'RBC-NOS è localizzata sul versante interno della membrana plasmatica e nel citoplasma dei globuli rossi, e la sua attività è controllata dal suo substrato L-arginina, dal calcio e dalla fosforilazione dipendente dalla chinasi PI3K [15]. Tuttavia, i meccanismi regolatori e le implicazioni cliniche della NOS eritrocitaria non sono esaustivamente note.

NO è una molecola di segnalazione di grande importanza presente in vari tipi di cellule. Viene generato dalla conversione dell'aminoacido L-arginina in citrullina, per

ossidazione del suo nitro gruppo guanidinico terminale in una reazione catalizzata dagli enzimi appartenenti alla famiglia dell'NO sintasi (NOS), in presenza di diversi cofattori. Esistono tre diverse isoforme di NOS: NOS neuronale (nNOS o NOS I), NOS inducibile (iNOS o NOS II) e NOS endoteliale (eNOS o NOS III) con una struttura dimerica comune; ciascun monomero contiene un dominio riducente e un dominio ossidante. Il dominio riducente presenta i siti di legame per alcuni cofattori, la flavina adenina dinucleotide (FAD), la flavina mononucleotide (FMN) e la nicotinamide adenina dinucleotide fosfato (NADPH). Il dominio ossidante contiene un centro eme e presenta i siti di legame per L-arginina e la tetraidrobiopterina (BH₄). Un sito di legame per il complesso Ca²⁺-calmodulina, che regola il trasferimento degli elettroni dalla subunità riducente alla subunità ossidante si trova tra le due regioni. La differenza principale tra le tre isoforme è legata alla loro dipendenza dal Ca²⁺: diversamente dalla iNOS, nNOS ed eNOS sono dipendenti dal Ca²⁺ e per la loro attivazione sono richiesti elevati livelli di Ca²⁺ intracellulare. Nell'endotelio, NO è sintetizzato dalla NOS endoteliale costitutiva e agisce come un potente vasodilatatore a livello dei vasi di resistenza in modo autocrino o paracrino. Diffonde rapidamente attraverso la membrana cellulare dell'endotelio alle sottostanti cellule muscolari lisce dove attiva la guanilato ciclastasi reagendo con il suo gruppo eme. Ne consegue un aumento di guanosina monofosfato ciclico (cGMP), che induce il rilassamento delle cellule muscolari lisce attivando una proteina chinasi in grado di ridurre la concentrazione intracellulare di Ca²⁺ libero. Oltre alla vasodilatazione l'NO determina l'inibizione dell'aggregazione piastrinica, della proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce, dell'espressione delle molecole di adesione, dell'adesione dei monociti e della sintesi di endotelina, sostanze e meccanismi coinvolti nella patogenesi della trombosi e dell'aterosclerosi. Pertanto, NO svolge un ruolo importante nel controllo dell'omeostasi vascolare e una ridotta biodisponibilità di NO porta alla "disfunzione endoteliale", condizione patologica caratterizzata da una ridotta vasodilatazione e da un'attività pro-coagulante e pro-infiammatoria [19]. L'attività di eNOS è determinata dalla sua localizzazione, come mostrato in Figura 5 a. All'interno della cellula l'eNOS risiede nel complesso del Golgi, dove è ancorata alla membrana (Fig.5 a-i). Mediante trasporto vescicolare, l'eNOS viene trasferito nella membrana plasmatica (Fig.5 a-ii), dove si trova associato alle caveole, invaginazioni della membrana plasmatica ricche di colesterolo e sfingolipidi (Fig.5 a-

iii). Nelle caveole, l'eNOS si trova legata alla caveolina-1 (cav-1) che inibisce l'attività catalitica di eNOS interferendo nel legame con il complesso Calcio/calmodulina quando la concentrazione di Ca^{2+} citosolico è bassa. Un aumento intracellulare di Ca^{2+} , consente il legame Calcio/calmodulina-eNOS (Fig.5 a-iv), interrompendo così l'interazione eNOS-cav-1, che porta all'attivazione dell'enzima e alla sua traslocazione nel citosol (Fig.5 a-v). La proteina chinasi B (PKB), nota anche come Akt, fosforila eNOS nel residuo amminoacidico serinico in posizione 1177, con ulteriore attivazione dell'enzima. L'associazione di eNOS con la proteina Hsp90 (Heat Shock Protein), facilita il legame con il complesso Calcio/calmodulina e media l'interazione tra eNOS e Akt (Fig.5 a-vi). La fornitura del substrato dell'enzima l-arginina è assicurata dall'attività del trasportatore degli amminoacidi cationici (CAT1) localizzato nelle caveole. Una riduzione della concentrazione di Ca^{2+} e la defosforilazione di eNOS ne determina la riassociazione con cav-1 seguita dal ritrasferimento dell'enzima nel complesso del Golgi (Fig.5 a-vii).

L'RBC-NOS presenta un meccanismo di regolazione comune ma sotto vari aspetti diverso rispetto all'eNOS presente a livello endoteliale. Anche l'attività dell'RBC-NOS dipende dai livelli di Ca^{2+} intracellulare e dalla fosforilazione della serina in posizione 1177 ad opera dall'asse di segnalazione fosfatidilinositol-3 chinasi /proteina chinasi B (PI3K/Akt). I globuli rossi sembrano essere però privi di alcuni meccanismi regolatori alla base dell'attivazione di eNOS data la mancanza di organelli citosolici quali, nucleo, reticolo endoplasmatico e complesso del Golgi. Alcuni dati recenti hanno rivelato che l'attività costitutiva dell'RBC-NOS nei globuli rossi è stereospecificamente potenziata dalla supplementazione con l-arginina, che si trova in un'ampia varietà di alimenti, tra cui latticini, carne di manzo, noci, semi e cioccolato, ed è endogenamente sintetizzata nel ciclo dell'urea epatico. Il trasportatore CAT1 sembra inoltre essere altamente espresso nelle cellule della linea eritroide relativamente mature ed è probabilmente coinvolto nella fase terminale del processo di maturazione dei globuli rossi attraverso una modulazione nella formazione di NO. L'aumentato trasporto di l-arginina nei globuli rossi potrebbe spiegare la differente dipendenza dall'l-arginina tra l'eNOS presente nelle cellule endoteliali e nei globuli rossi.

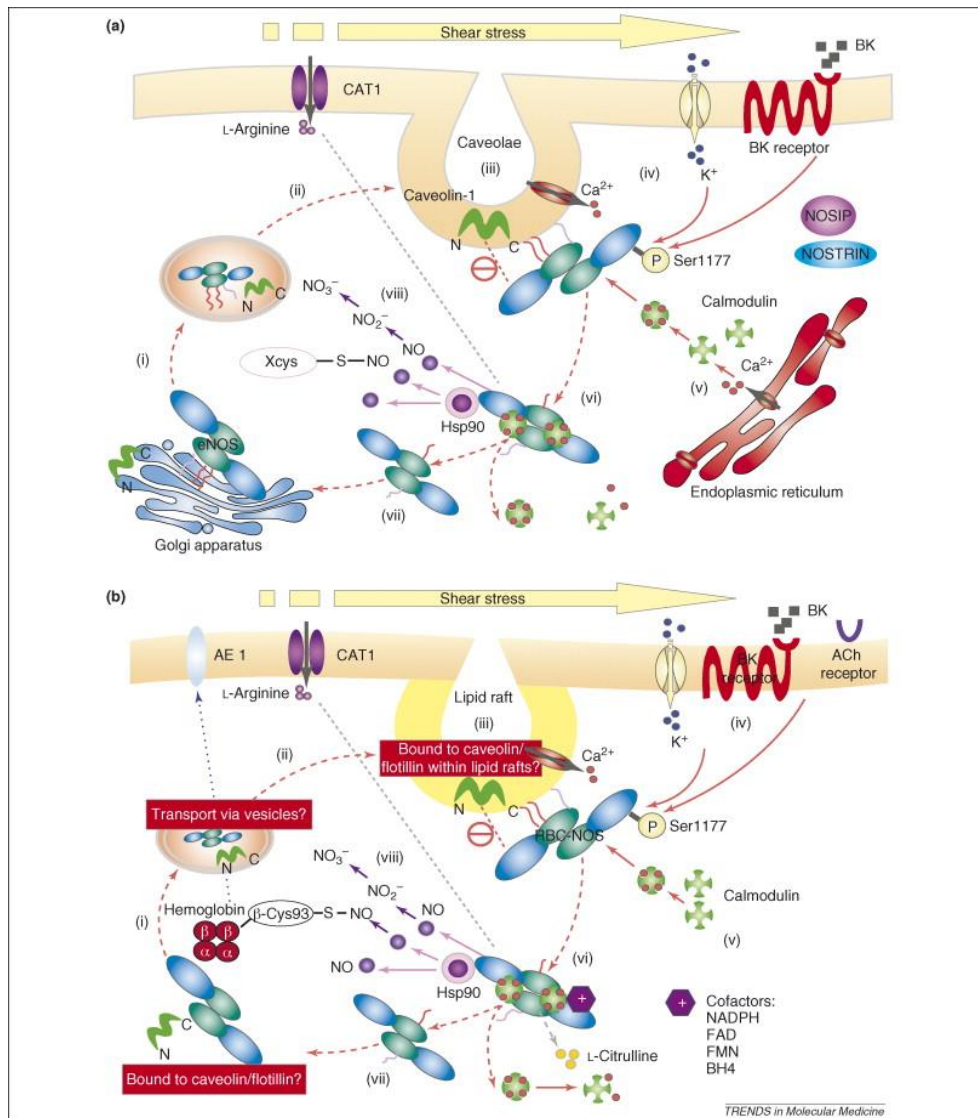


Fig.5. Meccanismo di regolazione dell'eNOS (a) e dell'RBC-NOS(b). Da: RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects [19].

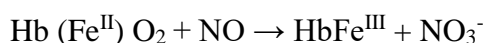
Regolazione dell'RBC-NOS

L'RBC-NOS è stata identificata nel citoplasma e nella membrana plasmatica dei globuli rossi, dove è maggiormente espressa, esclusivamente sulla faccia interna del doppio strato fosfolipidico. Nel dettaglio i processi di trasduzione del segnale associati alla membrana eritrocitaria non sono ancora ben noti, in particolare per quanto riguarda le dimensioni e il contenuto proteico delle zattere lipidiche. Le proteine integrali più abbondanti trovate sono: la stomatina, la flotillina-1 e la flotillina-2, presenti sul versante citoplasmatico delle zattere lipidiche eritrocitarie. Le flotilline sono coinvolte nel traffico vescicolare e nel riarrangiamento del citoscheletro

e interagiscono con molte proteine. La funzione della stomatina non è ancora stata chiarita, ma la sua perdita porta alla stomatocitosi. La presenza della cav-1 recentemente osservata consente di ipotizzare che l'RBC-NOS possa essere localizzato in corrispondenza delle zattere lipidiche. Il meccanismo di regolazione dell'RBC-NOS (Fig.5 b) potrebbe presentare diverse similitudini con quello descritto per l'enzima presente nelle cellule endoteliali, ma ad oggi l'esatto meccanismo rimane poco noto. Si potrebbe pensare che l'RBC-NOS si trovi in forma inattiva associato alla cav-1 / flotillina. Attraverso il loro flusso lungo le pareti vasali nel microcircolo, i globuli rossi sono esposti a stress meccanici che potrebbero indurre variazioni del potenziale di membrana e l'apertura dei canali cationici per il Ca^{2+} . In seguito all'aumento dei livelli di Ca^{2+} intracellulari, l'interazione tra l'RBC-NOS e la cav-1 / flotillina potrebbe essere indebolita e spostata dal legame dell'RBC-NOS con il complesso calcio/calmodulina. In questo stato, l'RBC-NOS diventerebbe enzimaticamente attivo [19].

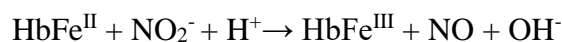
Ruolo funzionale dell'RBC-NOS: I globuli rossi nel controllo del pool di NO vascolare

È noto che l'NO prodotto dall'endotelio dei vasi sanguigni può essere assorbito dai globuli rossi e degradato attraverso una rapida reazione con Hb (Fe^{II}) O_2 per formare HbFe^{III} e nitrato (NO_3^-), limitando quindi l'NO disponibile per la vasodilatazione [18].



La velocità di questa reazione è limitata dalla diffusione dell'NO nella tasca dell'eme, inoltre la compartimentalizzazione dell'emoglobina nei globuli rossi limita la distruzione dell'NO presente a livello endoteliale. Infine l'ossidazione dell'emoglobina con formazione di metaemoglobina nel corso della reazione con NO può impedire l'ulteriore formazione di nitrato [20]. Recentemente sono stati individuati diversi meccanismi attraverso i quali l'emoglobina può preservare e controllare l'attività dell'NO mediante la conversione dell'NO in altre forme di deposito. I meccanismi di rilascio e le potenziali fonti di NO nei globuli rossi sono ancora oggetto di dibattito ma includono la ferro-nitrosil-emoglobina (Hb-NO) e l'S-nitroso-emoglobina (SNO-Hb) [18]. L'NO può anche reagire con l'ossigeno molecolare per formare nitrito NO_2^- che può essere riconvertito in NO attraverso la

reazione di riduzione con la deossiemoglobina (HbFe^{II}) (2). In questo caso, tuttavia l'NO formato potrebbe successivamente interagire con l'emoglobina ossigenata/deossigenata [20].



L'NO prodotto dagli RBC per via enzimatica dall'RBC-NOS può incrementare la concentrazione di NO in prossimità della membrana in modo tale da prevenire il consumo di NO proveniente da altre fonti e mantenere costante il livello basale di NO in circolo [19]. Inoltre, si ritiene che i globuli rossi contribuiscano alla regolazione della biodisponibilità sistemica di NO rilasciando ATP in condizioni di ipossia o quando sottoposti a stress meccanici, inducendo il rilassamento dei vasi eNOS-dipendente e un aumento del flusso sanguigno [18,21]. L'NO prodotto dagli RBC per via enzimatica ha anche la funzione di modulare la deformabilità della membrana degli RBC in modo tale da favorirne il passaggio attraverso la fitta rete capillare e migliorare il flusso sanguigno nel microcircolo [15].

1.1.5.2.3 Xantina ossidoreduttasi

Il nitrito costituisce un importante fonte di ossido nitrico per il sistema circolatorio specialmente in condizioni di ipossia. La xantina ossidoreduttasi (XOR) svolge un importante ruolo nella riduzione del nitrito nel cuore e nei reni. In un recente studio è stata indentificata la xantina ossidoreduttasi nella membrana dei globuli rossi [22]. In questo studio è stato inoltre osservato che la riduzione del nitrito ad NO nei globuli rossi può avvenire non solo attraverso la reazione di riduzione con la deossiemoglobina ma in condizioni ipossiche è incrementata dall'azione enzimatica dell'RBC-NOS e della XOR, il cui ruolo diviene predominante in condizioni di acidosi. Sia l'RBC-NOS che RBC-XOR contribuiscono alla produzione di NO ad azione vasodilatatoria intravascolare per riduzione del nitrito durante episodi ischemici.

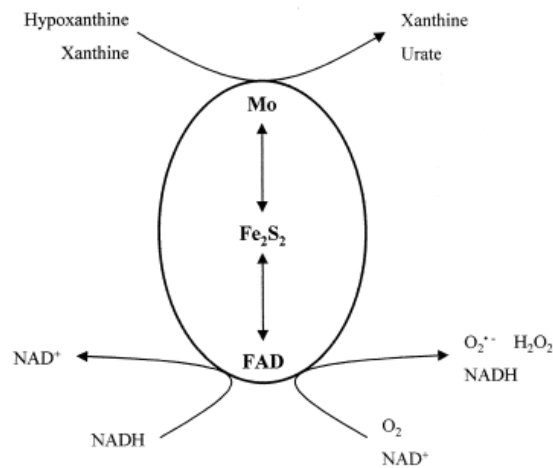


Fig.6. Diagramma schematico che mostra l'ossidazione catalizzata da XOR di xantina e ipoxantina. Da **Structure and Function of Xanthine Oxidoreductase: Where are we now?** [23].

La XOR è una metallo-flavoproteina dimerica, costituita da due subunità identiche ciascuna delle quali contiene un cofattore FAD, un cofattore molibdopterina contenente molibdeno e due centri redox ferro-zolfo. L'enzima catalizza l'ossidazione dell'ipoxantina in xantina e della xantina in acido urico, prodotto finale del catabolismo delle purine, con concomitante riduzione di NAD^+ o dell'ossigeno molecolare. L'ossidazione della purina avviene in corrispondenza del cofattore che contiene l'atomo di molibdeno. Gli elettroni sottratti alla purina vengono trasferiti rapidamente attraverso una serie di complessi ferro-zolfo al FAD che li trasferisce infine al NAD^+ o all'ossigeno molecolare [23] (Fig.6). Diversi metaboliti endogeni e xenobiotici possono essere ossidati dalla XOR. L'espressione di questa proteina è altamente regolata sia a livello trascrizionale che post-traslazionale. Nei mammiferi è presente in tutti i tessuti ma nella maggior parte dei casi l'attività della XOR è molto scarsa tranne che nel fegato, nell'intestino, nel rene, nelle ghiandole mammarie, nelle cellule epiteliali e nelle cellule endoteliali vascolari. L'espressione della XOR può essere incrementata da diversi stimoli, ormoni, fattori di crescita, citochine infiammatorie e basse pressioni parziali di ossigeno. Nei mammiferi una modulazione peculiare dell'attività della XOR consiste nella conversione della forma deidrogenasica a quella ossidasica, transizione che avviene in molte condizioni patologiche. Questo enzima presenta infatti due forme intercambiabili, la xantina deidrogenasi (XDH, NAD^+ dipendente) e la xantina ossidasi (O_2 dipendente) codificate dallo stesso gene [24]. La conversione può avvenire in modo reversibile o

irreversibile, mediante proteolisi limitata o ossidazione chimica o enzimatica dei gruppi tiolici della XDH. È stato osservato in esperimenti condotti sul fegato di ratto e sul latte bovino che durante la conversione della XDH in XOR quattro residui di Cisteina sono modificati per formare due ponti disolfuro. L'ossidazione dei primi due residui di cisteina porta alla formazione di un legame disolfuro nella prima fase rapida della transizione reversibile da XDH a XOR seguita da una seconda fase, molto più lenta, associata alla modifica di altri due residui di Cisteina [25]. Quando l'accettore finale di elettroni è l'ossigeno molecolare l'attività dell'enzima XOR porta alla formazione di specie reattive di ossigeno ROS, anione superossido $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 in seguito al trasferimento di un elettrone o due rispettivamente. Il pH acido e la bassa pressione parziale di ossigeno conseguenti ad una condizione ischemica riducono l'affinità della XOR per la xantina e ne aumentano l'affinità per i nitriti che competono con la purina a livello del cofattore molibdopterinico e che vengono ridotti a NO [24]. Nelle stesse condizioni la quota di $O_2^{\cdot-}$ prodotta dall'enzima è sufficiente a reagire con NO per generare specie reattive dell'azoto (RNS) in particolare perossinitrito ($ONOO^-$) che contribuiscono allo stress ossidativo. XOR può dunque catalizzare la riduzione di nitriti a ossido nitrico (NO), fungendo da fonte di NO e perossinitrito [23] (Fig.7).

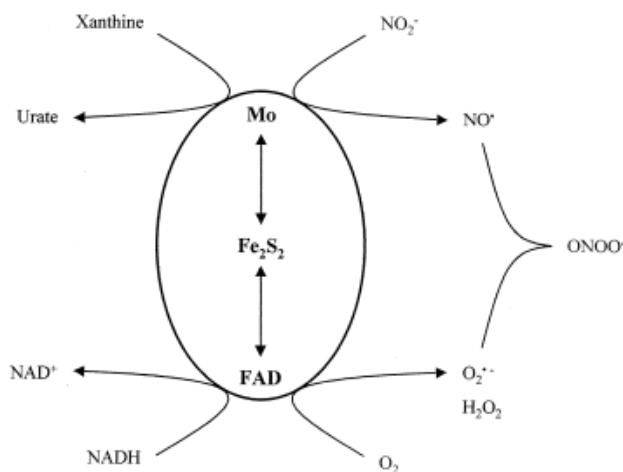


Fig.7. Diagramma schematico che mostra la produzione catalizzata da XOR di NO e perossinitrito. Da Structure and Function of Xanthine Oxidoreductase: Where are we now? [23].

La produzione di queste specie ossidanti è responsabile dell'azione citotossica e pro infiammatoria della XOR. L'allopurinolo, inibisce competitivamente il cofattore molibdopterinico [24]. La funzione di XOR ampiamente distribuita e altamente

regolata in grado di generare sia ROS che NO è interessante sia in termini fisiologici che in contesti patologici. Attraverso la produzione di ROS, NO e RNS l'enzima è coinvolto nei principali percorsi di segnalazione cellulare redox dipendenti. L'attività della XOR è aumentata durante le malattie infettive in cui la produzione di specie ossidanti è utile per la difesa contro i batteri. L'attività della XOR aumenta anche in risposta alle citochine infiammatorie che inducono la conversione della XDH in XOR determinando un aumento dei livelli di XOR plasmatici e suggerendo un ruolo per questo enzima nell'immunità innata [24]. Infatti i ROS derivanti dall'attività di XOR promuovono l'adesione dei leucociti alle pareti endoteliali e inducono un'ulteriore produzione di citochine amplificando la risposta infiammatoria e la chemiotassi, causando l'accumulo di granulociti polimorfo nucleati nei vasi. Le specie ossidanti prodotte dalla XOR svolgono un ruolo battericida insieme alla fagocitosi dei microrganismi patogeni operata dai leucociti. L'attività pro-infiammatoria esercitata dai ROS XOR-derivati può inoltre determinare un aumento della permeabilità dell'endotelio vasale, che innesca sia la cascata fisiologica della risposta immunitaria sia gli eventi patologici che conducono alla formazione di placche aterosclerotiche. Pertanto, non sorprende che sia l'attività della XOR sia la sua inibizione da parte dell'allopurinolo possano indurre disfunzione endoteliale e favorire l'aggregazione piastrinica, nonché aggravare l'ipertensione e le complicanze associate alle malattie cardiovascolari. Le specie ossidanti prodotte dalla XOR insieme agli ossidanti generati da altre fonti enzimatiche quale NOS possono anche modulare un'altra funzione delle cellule endoteliali, vale a dire la regolazione del tono arteriolare attraverso la produzione di NO, con attività vasodilatatoria locale e sistemica. Poiché le attività di questi enzimi nell'endotelio sono interdipendenti, il risultato finale è dato da un equilibrio fisiopatologico tra le loro attività. Pertanto in generale gli effetti positivi o nocivi correlati all'attività della XOR sono difficilmente prevedibili in quanto dipendono dall'equilibrio o dallo squilibrio tra le attività di vari enzimi coinvolti nello stress ossidativo [25]. La citotossicità e i danni tissutali causati dalla produzione di specie radicaliche dovuta ad un'aumentata attività della XOR sono stati intensamente studiati e valutati negli ultimi anni in varie condizioni patologiche. I livelli sierici di XOR sono normalmente molto bassi ma in alcune condizioni patologiche possono aumentare in seguito al rilascio in circolo dell'enzima a causa di un danno tissutale. In particolare, l'attenzione è stata focalizzata sul ruolo dei ROS

derivati dalla XOR nella patogenesi delle lesioni tissutali indotte dalla riperfusione dopo ischemia. Livelli plasmatici elevati di XOR sono stati trovati anche in pazienti con epatite virale acuta e cronica, mononucleosi infettiva, reumatica e malattie autoimmuni, polmonite, sindrome dell'intestino irritabile, schizofrenia, diabete di tipo 1 e anemia falciforme [24]. Come già accennato molti studi indicano il coinvolgimento della XOR sulla funzionalità dell'endotelio vasale poiché la produzione di specie ossidanti XOR-dipendente può attivare processi pro-infiammatori e pro-trombotici. L'aumentata attività di XOR in circolo è associata a ipertensione, dislipidemia, diabete e fumo di sigaretta e può contribuire alla patogenesi dell'aterosclerosi [25]. Le specie ossidanti prodotte dalla forma ad attività ossidativa circolante possono infatti causare lesioni delle cellule endoteliali dei vasi, ossidazione del colesterolo trasportato dalla LDL e formazione di cellule schiumose, concorrendo alla formazione della placca ateromatosa e compromettendo il microcircolo [26].

1.1.6 Senescenza degli eritrociti

Essendo privi di nucleo, mitocondri e altri organuli citoplasmatici, gli eritrociti sono incapaci di sintetizzare proteine e di autoripararsi. Per questa ragione hanno un rapido turn over, il loro ciclo vitale dura approssimativamente 120 giorni, durante i quali mentre svolgono il loro ruolo di trasporto e scambio di gas respiratori sono sottoposti a continui stress fisici e chimici che includono deformazione e sollecitazioni meccaniche della membrana mentre transitano attraverso i capillari (shear stress) e ai danni chimici derivanti da specie ossidanti e radicali liberi [27,28]. Durante l'invecchiamento, negli eritrociti circolanti si verificano una serie di alterazioni biochimiche e strutturali. L'invecchiamento cellulare è accompagnato dalla microvescicolazione della membrana e dal restringimento del volume cellulare. I globuli rossi compromessi espongono sulla membrana la fosfatidilserina, presentano una riduzione del contenuto di acido sialico delle glicoforine, di colesterolo e dei fosfolipidi. L'integrità della membrana plasmatica viene meno, la funzionalità delle proteine di membrana e il trasporto ionico vengono compromessi. Le attività enzimatiche degli eritrociti vengono alterate, gli antiossidanti endogeni si vanno esaurendo e si ha un graduale accumulo di proteine irreversibilmente ossidate e

denaturate in particolare di metaemoglobina, essendo l'emoglobina la più abbondante proteina presente negli eritrociti e il principale target di danno ossidativo. Anche la composizione lipidica della membrana viene alterata poiché l'ambiente ossidante induce perossidazione dei lipidi di membrana. I cambiamenti che si verificano nella membrana eritrocitaria e nell'equilibrio ionico determinano una maggiore densità dei globuli rossi invecchiati. Un'altra importante alterazione è costituita dal clustering della proteina di membrana banda 3 che può avvenire attraverso meccanismi multipli tra cui la denaturazione dell'emoglobina e l'ossidazione delle proteine. L'emoglobina ossigenata si auto-ossida e si forma metaemoglobina che non viene più riconvertita alla sua forma funzionale dal sistema enzimatico della metaemoglobina riduttasi perchè non più efficiente. Un cambiamento in questo l'equilibrio provoca un aumento dei livelli di metaemoglobina, che può formare emicromi. L'accumulo di derivati dell'emoglobina ferrica non in grado di legare e trasportare l'ossigeno può compromettere la funzionalità respiratoria. Man mano che il danno ossidativo si accumula nei globuli rossi, una rimozione efficiente e controllata degli RBC senescenti mal funzionanti è quindi essenziale per garantire l'efficienza del sistema circolatorio. La rimozione dei globuli rossi invecchiati dalla circolazione è mediata dai macrofagi localizzati nella milza o nel fegato, in grado di riconoscere le cellule senescenti in modo IgG-dipendente. L'esatto contributo di questi due organi nell'emocateresi è tutt'ora dibattuto. In alcuni studi è stato osservato che l'eliminazione degli eritrociti da parte dei macrofagi nel fegato potrebbe essere più associata a condizioni di stress ossidativo o infiammatorie. Tuttavia, sia i macrofagi della milza che le cellule di Kupffer del fegato sono dotate di meccanismi adeguati per degradare grandi quantità di eme e metabolizzare il ferro in modo efficiente e senza causare effetti tossici [2]. Sono stati proposti diversi meccanismi con cui i macrofagi riconoscono e fagocitano i globuli rossi senescenti. Fra questi la fagocitosi mediata dai recettori per il frammento cristallizzabile Fc γ anticorpale (Fc γ Rs) o dai recettori del complemento (CRs) attraverso cui i macrofagi riconoscono il dominio Fc dell'IgG o il fattore del complemento C3, rispettivamente, esposti sulla superficie della cellula bersaglio. Oltre a svolgere una funzione essenziale nella struttura e nel trasporto anionico negli RBC, la banda 3 ha il ruolo di segnalare i globuli rossi senescenti per la clearance attraverso la fagocitosi mediata dai macrofagi. L'opsonizzazione ovvero il rivestimento della superficie cellulare con componenti del

sistema immunitario, quale l'Immunoglobulina G sierica (IgG) è essenziale per il riconoscimento di globuli rossi senescenti. Questi "autoanticorpi" IgG si legano selettivamente ai globuli rossi senescenti e sono diretti contro la banda 3. L'emoglobina parzialmente denaturata si lega alla regione N terminale della banda 3, ne induce la clusterizzazione aumentando l'affinità di legame con l'autoanticorpo IgG e l'interazione con il fattore del complemento C3. Entrambi i componenti del sistema immunitario, autoanticorpo anti-Band 3 e complemento C3, sono richiesti per la fagocitosi da parte dei macrofagi [2,28]. Un altro meccanismo addizionale proposto per la clearance dei globuli rossi senescenti è il riconoscimento da parte dei macrofagi della PS esposta sulla superficie degli RBC in seguito alla perdita di asimmetria dei fosfolipidi di membrana [2]. In questo modo il sistema reticoloendoteliale elimina dal sangue le cellule invecchiate.

1.1.7 Eriptosi: la morte programmata degli eritrociti

Durante il loro ciclo vitale i globuli rossi possono essere sottoposti a vari insulti con compromissione della loro integrità, funzionalità e sopravvivenza. In passato si pensava che essendo privi di nucleo e mitocondri, organuli importanti nell'esecuzione del processo apoptotico, gli eritrociti non andassero incontro a morte cellulare programmata. Recentemente invece è stato dimostrato che i globuli rossi maturi potenzialmente danneggiati, infetti o invecchiati possono intraprendere un programma di morte cellulare chiamato eriptosi, prevenendo l'emolisi intravasale. Tranne la depolarizzazione delle membrane mitocondriali e la condensazione della cromatina, l'eriptosi mostra tutti gli altri segni morfologici caratteristici dell'apoptosi nelle cellule nucleate: riduzione del volume cellulare, vescicolazione della membrana cellulare e perdita di asimmetria dei fosfolipidi di membrana con esposizione della fosfatidilserina sulla superficie cellulare. Come le cellule apoptotiche anche gli eritrociti eriptotici sono riconosciuti dai macrofagi, fagocitate e degradate ed eliminate dal sistema circolatorio [2].

1.1.7.1 Meccanismo dell'eritrosi

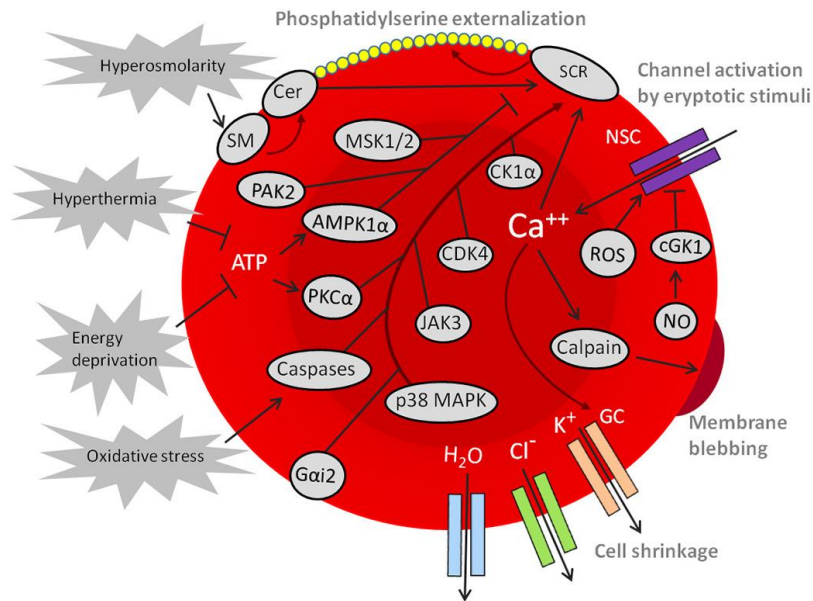


Fig.8. Percorsi di segnalazione coinvolti nell'eritrosi. Da: Eryptosis in health and disease: A paradigm shift towards understanding the (patho)physiological implications of programmed cell death of erythrocytes [2].

L'eritrosi è un processo fisiologico soggetto ad un complesso meccanismo di regolazione (Fig.8), principalmente innescato dall'ingresso del Ca^{2+} all'interno della cellula attraverso i canali cationici non selettivi permeabili al Ca^{2+} , la cui apertura può essere stimolata o inibita da diversi mediatori endogeni quali la prostaglandina E2 (PGE2) o l'eritropoietina, rispettivamente [1]. I canali cationici non selettivi permeabili al Ca^{2+} coinvolgono il recettore canale TRPC6 (*transient receptor potential channel 6*) e sono inibiti dagli anticorpi diretti contro TRPC6 [2]. L'aumento della concentrazione citosolica di Ca^{2+} porta ad alterazioni della forma e del volume dei globuli rossi. Sia il restringimento del volume cellulare che la perdita di asimmetria dei fosfolipidi di membrana con esposizione della PS all'esterno della membrana, sono dovute all'interazione del Ca^{2+} citosolico con vari target molecolari quali (Fig.8): i canali del K^+ calcio dipendenti, alcune proteine del citoscheletro e i fosfolipidi di membrana. L'aumento del Ca^{2+} citosolico stimola l'apertura dei canali del K^+ calcio dipendenti, chiamati anche canali di Gardos. Ciò comporta l'efflusso di K^+ che iperpolarizza la membrana cellulare. Come conseguenza parallelamente al K^+ anche gli ioni Cl^- escono dalla cellula. La perdita netta di KCl conduce ad un flusso osmotico obbligato di acqua che provoca la riduzione del volume cellulare, uno dei

tipici segnali degli eritrociti eriptotici. L'ingresso del Ca^{2+} inoltre determina attivazione delle scramblasi e inibizione delle flippasi con traslocazione della PS sulla superficie esterna degli eritrociti [1,2,4]. L'aumento del Ca^{2+} citosolico infine modifica il citoscheletro e attiva un gran numero di enzimi quali calpaine e proteine chinasi. La cisteina endopeptidasi calpaina trasloca dal citosol alla membrana dove si attiva per auto proteolisi. Una volta attivata essa degrada la pompa del Ca^{2+} , il complesso costituito dalla banda3 e l'ankirina e alcune proteine del citoscheletro, importanti per il mantenimento dell'integrità della membrana, determinando la vescicolazione della membrana (Fig.9) [4]. La formazione di vescicole è accompagnata dalla degradazione della proteina banda 3, Il dominio citoplasmatico della banda 3 svolge un ruolo centrale nel mantenimento dell'integrità strutturale della membrana eritrocitaria. Essa è associata ad una fosfotirosina fosfatasi che in condizioni normali è attiva e previene l'eccessiva fosforilazione della banda 3. Nella forma fosforilata infatti la banda 3 ha una ridotta affinità per l'ankirina, ciò determina il distacco dalle proteine del citoscheletro e la vescicolazione. La fosforilazione dei residui di tirosina della banda 3 può avvenire in risposta a diversi stimoli, tra cui l'invecchiamento cellulare, la riduzione del volume cellulare e lo stress ossidativo [4,29]. Indipendentemente dall'aumento del Ca^{2+} citosolico l'eriptosi può avvenire attraverso l'interruzione dell'interazione tra il citoscheletro e la membrana in seguito alla scissione idrolitica della sfingomieline e alla formazione di ceramide. Una volta formata la Ceramide può agire parallelamente al Ca^{2+} rendendo gli eritrociti più sensibili agli incrementati livelli di Ca^{2+} citosolico durante l'eriptosi [2].

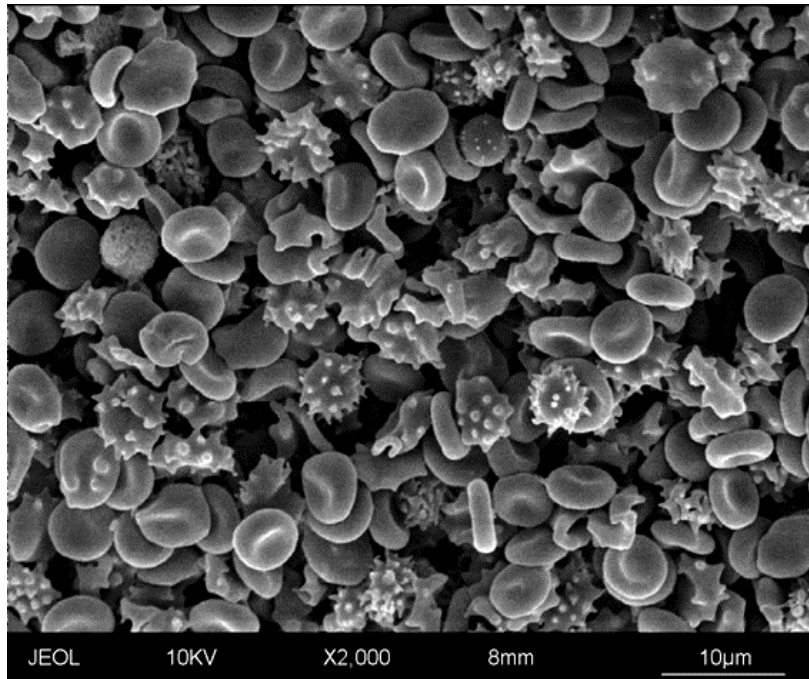


Fig.9. Vescicolazione della membrana di eritrociti eriptotici osservata mediante microscopia elettronica a scansione (SEM). Le barre di scala e i valori di ingrandimento sono riportati nel pannello.

1.1.7.2 Fattori che inducono l'eriptosi

Stress ossidativo. E' tra le principale cause di eriptosi (Fig.8). Lo sbilancio redox dovuto ad un aumento delle specie ossidanti o ad una riduzione delle difese antiossidanti, porta ad un accumulo di ROS i quali inducono eriptosi stimolando l'apertura dei canali cationici con conseguente ingresso del Ca^{2+} . Gli eritrociti esprimono caspasi 3 e 8, il cui ruolo nell'eriptosi è ancora poco chiaro. E' stato osservato che l'attivazione della caspasi 3 dipende dalla 8, da parte di alcuni induttori quali leucotrieni, acido α -lipoico e stress ossidativo [30], provoca la proteolisi della banda 3 e innesca l'esposizione della fosfatidilserina negli eritrociti. Tuttavia, l'aumento del Ca^{2+} intracellulare in seguito all'apertura dei canali del calcio e la perdita di asimmetria di membrana dipendente dal Ca^{2+} , non richiedono l'attivazione delle caspasi [1,2].

Deplezione energetica. La ridotta attività della Ca^{2+} -ATPasi, dovuta ad uno stato di carenza energetica porta alla riduzione dell'efflusso di Ca^{2+} con conseguente aumento della concentrazione di Ca^{2+} citosolico, efflusso di KCl e di acqua e riduzione del volume cellulare (Fig.8). Si riduce anche l'attività enzimatica della glutatione riduttasi che rigenera il glutatione ridotto (GSH) con conseguente calo delle difese

antiossidanti degli eritrociti. Inoltre fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina sono mantenute sul versante interno della membrana mediante l'attività ATP-dipendente della flippasi. Di conseguenza una diminuzione dell'attività di questo trasportatore può indurre l'esposizione della PS. Diverse chinasi espresse nei globuli rossi partecipano alla regolazione dell'eritrosi. La janus chinasi JAK3 eritrocitaria, attivata mediante la fosforilazione di un residuo tirosinico (Tyr 980) in seguito all'esaurimento di ATP, prende parte alla perdita di asimmetria della membrana cellulare. La deplezione energetica può anche portare all'attivazione della proteina chinasi C (PKC α) che dal citosol trasloca sulla membrana degli RBC dove va a fosforilare proteine di membrana con conseguente perdita di asimmetria di membrana ed eritrosi. L'eritrosi da carenza energetica è invece inibita dalla proteina chinasi attivata dall'AMP, (AMPK α 1). La casein-chinasi (CK1 α) espressa nei globuli rossi è un importante modulatore del processo eritrotico, sia indotto da stress ossidativo che da deplezione energetica. Gli inibitori della CK1 α riducono l'aumento del Ca²⁺ intracellulare mentre l'attivazione farmacologica della CK1 α stimola i canali cationici non selettivi del Ca²⁺ portando all'aumento del Ca²⁺ intracellulare [1,2].

Shock osmotico. Il restringimento degli eritrociti in condizioni iperosmotiche determina l'attivazione della fosfolipasi A₂, con rilascio di acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana e sintesi della prostaglandina PGE₂, mediata dalla ciclossigenasi (COX), che stimola l'apertura dei canali per il Ca²⁺ (Fig.8). L'attivazione della fosfolipasi A₂ porta inoltre alla formazione di PAF, fattore di aggregazione piastrinica, che stimola l'attivazione della sfingomielinasi con produzione di ceramide dalla sfingomielina. Il ceramide a sua volta attiva la scramblasi e stimola ulteriormente il processo eritrotico. L'inibizione farmacologica della cicloossigenasi o della fosfolipasi A₂ blocca l'apertura dei canali del Ca²⁺ e l'eritrosi causata dallo shock iperosmotico [1]. L'eritrosi da shock osmotico viene anche inibita dagli inibitori della proteina p38 MAPK (mitogen-activated protein kinases), la cui attivazione è correlata all'aumento dei livelli di Ca²⁺ citosolico durante l'eritrosi.

Diverse altre chinasi e recettori partecipano alla regolazione del meccanismo eritrotico (Fig.8). L'eritrosi è anche inibita dalla proteina chinasi cGMP-dipendente cGKI per riduzione dell'aumento del Ca²⁺ intracellulare. Il cGKI è stimolato dall'ossido nitrico (NO), immagazzinato o prodotto dagli eritrociti. L'NO è il più

potente inibitore dell'eritrosi [1,2], nell'apoptosi delle cellule nucleate, l'NO svolge un ruolo inibitorio sulle caspasi, negli eritrociti invece agisce contrastando l'aumento citosolico del Ca^{2+} . È stato recentemente riportato che anche le chinasi MSK1/2 (mitogen and stress-activated kinases), attivate a valle nei percorsi di segnalazione che includono ERK1/2 o p38 MAPK e che notoriamente giocano un importante ruolo nell'apoptosi, partecipano alla regolazione dell'eritrosi. Inoltre la chinasi ciclina-dipendente CDK4, essenziale nella regolazione trascrizionale e nella progressione del ciclo cellulare nelle cellule nucleate, è espressa anche negli eritrociti e partecipa all'eritrosi innescata dallo stress ossidativo o da shock iperosmotico. L'impiego di inibitori della CDK4 ha ridotto sia i livelli di esternalizzazione del PS che il restringimento del volume cellulare riducendo l'ingresso del Ca^{2+} negli eritrociti [2]. I recettori accoppiati a proteina G nelle cellule nucleate modulano una miriade di funzioni cellulari, regolano i canali ionici, la differenziazione e la proliferazione cellulare e l'apoptosi; la subunità Gai2 della proteina G eterodimerica, è espressa negli eritrociti umani e sembra essere coinvolta nel processo eritrotico riducendo sia l'ingresso del Ca^{2+} che la formazione di ceramide. Gli eritrociti umani esprimono anche il recettore delle endoteline di tipo B. Studi in vitro e in vivo mostrano il coinvolgimento di questo recettore nella stimolazione dell'eritrosi [2]. La sopravvivenza degli eritrociti e l'eritrosi sono quindi regolate da un meccanismo cellulare incredibilmente complesso che coinvolge Ca^{2+} , ceramide, stress ossidativo, caspasi, ossido nitrico e varie chinasi. I principali fattori che inducono il programma eritrotico sono l'aumento di Ca^{2+} intracellulare e / o l'abbondanza di ceramide sulla membrana cellulare. A differenza dell'apoptosi delle cellule nucleate, le caspasi non svolgono un ruolo predominante nell'eritrosi. La sopravvivenza degli eritrociti richiede l'attivazione di diverse chinasi, tra cui AMPK e cGKI. Mentre l'attivazione di altre chinasi, come $CK1\alpha$ e JAK3, innesca l'eritrosi. I bersagli delle fosforilazioni operate dalle chinasi che determinano la stimolazione o l'inibizione dell'eritrosi non è stato ancora ben definito. Chiaramente, sono necessari ulteriori studi per la piena comprensione del macchinario eritrotico [30].

1.1.7.3 Funzione patofisiologica dell'eritrosi

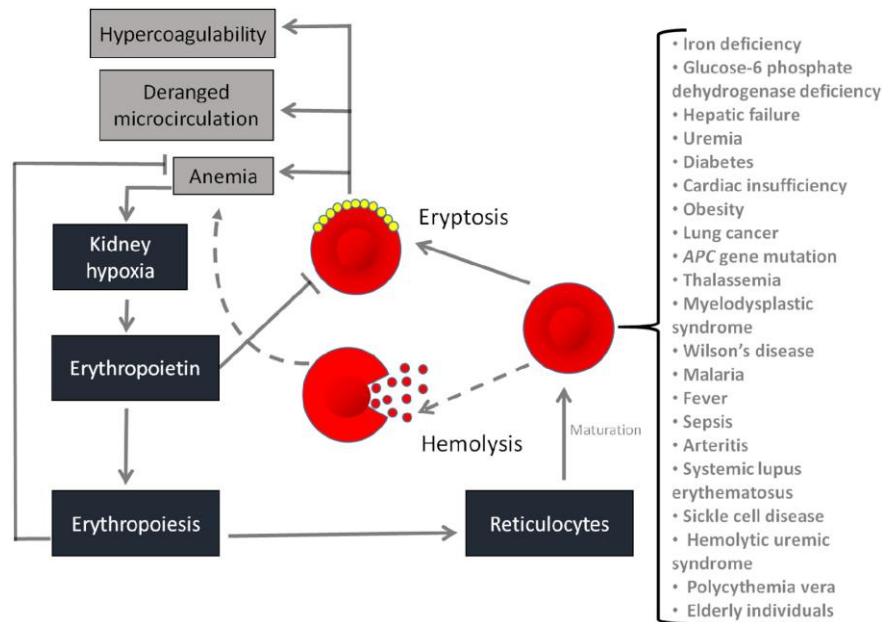


Fig.10. Omeostasi eritrocitaria e significato patofisiologico dell'eritrosi. Da: **Eryptosis in health and disease: A paradigm shift towards understanding the (patho)physiological implications of programmed cell death of erythrocytes** [2].

L'eritrosi costituisce un meccanismo protettivo per l'organismo in quanto previene l'emolisi intravasale degli eritrociti e permette l'eliminazione dei globuli rossi infetti o danneggiati senza causare l'infiammazione dovuta al rilascio del contenuto intracellulare in seguito alla rottura delle membrane. L'emoglobina ad esempio quando filtrata dai reni può precipitare e occludere i tubuli renali determinando insufficienza renale [2]. L'omeostasi tra meccanismi eriptotici e antieriptotici è fondamentale per il mantenimento del numero di globuli rossi circolanti [1] (Fig.10). Un'eccessiva eritrosi, così come un'eritropoiesi inefficace può causare anemia e alterare la capacità di trasporto di O₂ del sangue. In condizioni fisiologiche il numero di eritrociti circolanti è costante (pari a 4-5x10⁶/μl). Negli individui in buono stato di salute vi è un equilibrio tra il numero di globuli rossi rilasciati in circolo dal midollo osseo e il numero di globuli rossi rimossi dai macrofagi. Finché la perdita di eritrociti eriptotici è bilanciata da una adeguata stimolazione dell'eritropoiesi il numero di globuli rossi circolanti si mantiene costante. L'eritropoietina è un ormone rilasciato dal rene e la sua secrezione è stimolata dall'ipossia (Fig.10). Quando la pressione parziale di O₂ nel sangue è ridotta aumenta la secrezione renale di eritropoietina la

quale stimola l'eritropoiesi in modo tale da incrementare il numero di globuli rossi circolanti che veicolano O₂. L'eritropoietina oltre a stimolare l'eritropoiesi inibisce l'apoptosi delle cellule progenitrici della linea mieloide e protegge gli eritrociti circolanti dall'eritropoiesi, mantenendo così la capacità di trasporto di O₂ del sangue [2] (Fig.10). Un'eccessiva eritropoiesi può condurre a diverse condizioni patologiche tra cui diabete, insufficienza renale cronica, sindrome emolitica-uremica, sepsi, malaria, carenza di ferro, anemia falciforme, talassemia, sindrome di Wilson e molte altre [31] (Fig.10). Recenti studi hanno dimostrato che gli eritrociti eritropoietici che espongono la fosfatidilserina sulla loro membrana interagiscono con dei recettori di superficie presenti nelle cellule endoteliali delle pareti vasali e nelle piastrine come il ligando CXCL16. L'adesione degli eritrociti eritropoietici all'endotelio vasale e/o alle piastrine mediante l'interazione con questa chemochina interferisce con il flusso sanguigno ostacolando il microcircolo. Essa pertanto concorre nel determinare una condizione trombo-occlusiva contribuendo alla disfunzione endoteliale e alle complicanze associate alle patologie cardiovascolari [2,31]. CXCL16 è una chemochina che quando si trova adesa all'endotelio vasale funge da recettore per la PS e le LDLox. Questa chemochina svolge un ruolo chiave nell'adesione dei leucociti e dei monociti all'endotelio vasale nei siti di formazione delle lesioni aterosclerotiche. Altre molecole coinvolte nell'adesione dei globuli rossi eritropoietici alle cellule endoteliali sono il recettore CD36 endoteliale, espresso anche da altre cellule del sistema circolatorio come i monociti dove ha la funzione di legare molecole come le lipoproteine sia native che modificate o ossidate ed i prodotti di glicosilazione avanzata (AGE) e la trombospondina (TSP-1) [2]. In uno studio condotto sui globuli rossi uremici è stato osservato che l'adesione degli eritrociti eritropoietici all'endotelio avviene attraverso l'interazione con un complesso costituito dalla TSP-1 e dall'integrina endoteliale $\alpha_v\beta_3$. A livello endoteliale questa interazione promuove: l'attivazione del pathway pro-aterogenico delle MAP-Kinasi con aumento dell'espressione di molecole di adesione quali VCAM-1 (vascular cellular adhesion molecule-1) and ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) e l'inibizione del pathway anti-aterogenico che porta ad una ridotta fosforilazione Akt-eNOS con riduzione della produzione di NO e della sua biodisponibilità [32]. Anche le piastrine, come le cellule endoteliali, esprimono CXCL16, questa chemochina può indurre l'attivazione piastrinica e aggravare l'infiammazione vasale con eventi trombo

occlusivi in molte patologie. È stato osservato che tramite la PS gli eritrociti eriptotici interagiscono dinamicamente con le piastrine attraverso CXCL16 e CD36 aumentando l'aderenza piastrinica sulla parete vasale. Questa interazione aumenta il rischio di formazione del trombo in condizioni di ipercoagulabilità associata a diverse condizioni cliniche quali insufficienza epatica e renale. L'esposizione della PS negli RBC inoltre può fungere da sito di ancoraggio per l'assemblaggio dei complessi della coagulazione protrombinasi e tenasi, stimolando la formazione di trombina e può essere considerato come un meccanismo patogenico che conduce allo stato di ipercoagulabilità e protrombotico osservato nella beta-talassemia e nell'anemia falciforme [2,32].

In patologie quali l'anemia falciforme e la β -talassemia gli eritrociti sono più suscettibili allo stress ossidativo e all'eriprosi [11,33]. L'anemia falciforme (SCD) è una malattia ereditaria del sangue caratterizzata da infezioni ripetute, eventi vaso-occlusivi e anemia emolitica cronica. Nella SCD, gli eritrociti contengono emoglobina falciforme (HbS) invece dell'emoglobina normale (HbA). In determinate circostanze, gli eritrociti diventano inflessibili, rigidi e acquisiscono una forma simile a una falce. Nella fisiopatologia della SCD un ruolo importante è attribuito allo stress ossidativo che in questa condizione può derivare da origini e fonti diverse. L'HbS, ad esempio, è instabile ed è in grado di legarsi alla membrana eritrocitaria e portare alla formazione di radicali idrossilici ($\text{OH}\cdot$), H_2O_2 e anioni superossido causando danni alla membrana. Come menzionato George et al. ha dimostrato che la produzione di ROS nei globuli rossi SCD non avviene solamente attraverso l'autossidazione dell'emoglobina e dalla reazione di Fenton ma anche attraverso l'attività enzimatica della NADPH ossidasi. La produzione di questi ossidanti è raddoppiata negli eritrociti SCD rispetto agli eritrociti normali. Poiché lo stress ossidativo è uno dei principali fattori scatenanti dell'eriprosi, gli eritrociti SCD che sono inoltre più sensibili allo stress ossidativo mostrano una maggiore incidenza di morte eriptotica rispetto agli eritrociti normali [11,33].

La β -talassemia comprende un gruppo eterogeneo di disturbi del sangue caratterizzati dalla ridotta o mancata sintesi della catena β -globina dell'emoglobina. Nello stato omozigote della malattia, la β -talassemia conduce ad anemia che può essere meno grave nello stato eterozigote. Le mutazioni del gene per la β -globina portano ad alterazioni strutturali o quantitative delle catene β e ad un eccesso di catene α non

accoppiate e di ferro libero, che sono la causa primaria di stress ossidativo in questa malattia. Negli eritrociti talassemici, sono state rilevate quantità più elevate di intermedi reattivi dell'ossigeno, quali H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot} e una ridotta capacità antiossidante totale. Analogamente agli eritrociti falciformi, gli eritrociti di pazienti β -talassemici mostrano un tasso di esposizione di PS più elevato sulla loro superficie. Nel loro insieme, una ridotta difesa antiossidante, lo stress ossidativo e l'eritrosi svolgono un ruolo importante nella β -talassemia e possono contribuire alla ridotta sopravvivenza degli eritrociti in questa malattia [11,33]. I livelli di esposizione di fosfatidilserina sono incrementati anche nell'anemia sideropenica in seguito all'aumento della concentrazione di Ca^{2+} citosolico e dello stress ossidativo. Parallelamente all'aumentata eritrosi un'aumentata clearance degli eritrociti carenti di ferro conduce ad anemia [30]. L'eritrosi è stata inoltre osservata nella malattia renale cronica (CKD) una condizione associata all'anemia. L'insufficienza renale che caratterizza questa sindrome comporta una ridotta capacità di filtrazione glomerulare ma anche una riduzione nella produzione e nel rilascio di eritropoietina causando anemia con conseguente compromissione dell'eritropoiesi. La CKD è comunemente associata anche alla carenza di ferro. La CKD comporta inoltre una maggiore esposizione di fosfatidilserina e una clearance accelerata degli eritrociti circolanti. Di conseguenza, si manifesta un'anemia profonda anche in pazienti adeguatamente trattati con eritropoietina, con un normale numero di reticolociti nel sangue. Gli eritrociti dei pazienti con insufficienza renale cronica sono esposti a stress ossidativo. L'eritrosi osservata nei pazienti con insufficienza renale cronica è inoltre dovuta all'iperfosfatemia e in parte anche all'accumulo di tossine uremiche, come vanadato, acroleina, indoxil solfato e metilgliossale. L'acroleina e il metilgliossale possono esaurire le riserve cellulari di glutazione [30]. Un'incrementata eritrosi è stata osservata nella sindrome emolitica uremica (SEU), caratterizzata da anemia emolitica, trombocitopenia e insufficienza renale acuta. Il disturbo può derivare dall'intossicazione da tossina di Shiga batterica o dall'attivazione del complemento a causa della mancanza del fattore H, glicoproteina ad azione inibitrice sulla via alternativa del complemento. Nei globuli rossi di individui sani il plasma di pazienti affetti da SEU stimola l'esposizione della fosfatidilserina, il restringimento del volume cellulare, l'aumento della concentrazione citosolica di Ca^{2+} e la formazione di

ceramide. I meccanismi coinvolti nell'eripitosi osservata comprendono lo stress ossidativo e la perossidazione lipidica [30]. Anche il plasma di soggetti con sepsi stimola l'esposizione di fosfatidilserina, il restringimento del volume cellulare, aumento della concentrazione citosolica di Ca^{2+} e formazione di ceramide nei globuli rossi di individui sani. Anche in questo caso, la sepsi impone una condizione di stress ossidativo, che può partecipare all'innescò del meccanismo eripitotico [30]. L'eripitosi nella malattia di Wilson, un disordine genetico che determina l'accumulo di Cu^{2+} nel fegato, nel cervello e in altri organi vitali, è in gran parte secondaria all'attivazione della sfingomielinasi con formazione di ceramide. Inoltre, gli eritrociti dei pazienti affetti dalla malattia di Wilson sono esposti allo stress ossidativo presumibilmente causato dalle specie ossidanti legate all'accumulo di rame nel fegato e in altri organi [30]. La dislipidemia è una sindrome caratterizzata da quantità anomale di lipidi circolanti, ad esempio colesterolo o trigliceridi, che può causare iperlipidemia. L'ipertensione arteriosa, una condizione caratterizzata da un aumento della pressione arteriosa, diastolica o sistolica, si riscontra comunemente nei pazienti con dislipidemia. È noto che sia l'ipertensione arteriosa che la dislipidemia generano stress ossidativo. È stato osservato che gli eritrociti dei pazienti ipertesi presentano elevati livelli di perossidazione lipidica e una ridotta attività di numerosi antiossidanti enzimatici eritrocitari tra cui GPx, catalasi e superossido dismutasi, nonché concentrazioni di GSH più basse rispetto agli eritrociti di individui normotesi. Il tasso di eripitosi misurato è tre volte più alto nei pazienti normotesi dislipidemici rispetto ai controlli sani e 2,3 volte incrementato nei pazienti ipertesi dislipidemici rispetto agli individui normotesi dislipidemici [33]. Lo stress ossidativo sembra essere coinvolto nell'insulino-resistenza, nel malfunzionamento delle cellule β pancreatiche, e nell'intolleranza al glucosio, condizioni che possono tutte portare allo sviluppo del diabete mellito di tipo 2 (T2DM). Il diabete mellito è una sindrome che include una serie di disturbi metabolici caratterizzati da livelli aumentati di glucosio nel sangue (iperglicemia) e deficit nell'attività e nella generazione di insulina fornita dal pancreas. Oltre all'iperglicemia, anche l'iperlipidemia e lo stress ossidativo contribuiscono alla patogenesi del T2DM. Le fonti di ROS nel T2DM possono essere riconducibili a ridotti livelli di antiossidanti come vitamina E e GSH ridotto, diminuita attività di catalasi e superossido dismutasi, squilibrio del bilancio redox, auto-ossidazione del glucosio, glicazione degli enzimi antiossidanti e delle proteine

[33]. Nei pazienti diabetici, l'eriprosi è stimolata dal metilgliosale che si accumula in condizioni di iperglicemia cronica. Il metilgliosale agisce interferendo con la glicolisi e riducendo i livelli di ATP e GSH. L'iperglicemia causa nei globuli rossi stress ossidativo con riduzione di GSH aumento della concentrazione di malondialdeide e dell'attività enzimatica del SOD e perossidazione lipidica [30]. L'insufficienza cardiaca (HF) è una delle manifestazioni più comuni delle malattie cardiovascolari che colpiscono 23 milioni di persone a livello globale. L'anemia è una comorbidità frequente di scompenso cardiaco e influenza negativamente il suo esito clinico. Circa il 55,6% dei pazienti con HF ha livelli di emoglobina inferiori a 12 g · dL⁻¹. Recenti studi suggeriscono che un aumento della morte programmata degli eritrociti contribuisce all'anemia nell'HF. Un aumento dell'eriprosi nei pazienti con scompenso cardiaco è accompagnata da un aumento della produzione di ROS, i cui livelli sono notoriamente aumentati nell'HF [33]. Un'eccessiva eriprosi è stata infine osservata nel cancro. L'effetto del trattamento con farmaci antitumorali citostatici non solo stimola l'apoptosi delle cellule tumorali ma anche l'eriprosi dei globuli rossi [30]. L'eriprosi indotta dallo stress ossidativo è quindi associata alla patofisiologia di molte malattie. Recenti evidenze suggeriscono che lo stress ossidativo giochi un importante ruolo nell'accelerare la perdita di eritrociti in diverse condizioni sistemiche e che rappresenti un meccanismo sottostante all'anemia associata a questi stati patologici. Lo stress ossidativo, non solo svolge un ruolo cruciale nella fisiopatologia di diverse malattie correlate all'eriprosi, ma contribuisce anche alla sua stimolazione da parte di un ampio spettro di xenobiotici [30].

1.2 Gli Ossisteroli

Gli ossisteroli sono stati identificati per la prima volta da Lifshultz nel 1913 come prodotti di ossidazione del colesterolo. Circa 30 anni dopo, Kandutsch ed altri hanno sviluppato la teoria 'Oxysterol Hypothesis of Cholesterol Homeostasis, oggetto di innumerevoli revisioni nel corso degli anni [34], dato l'interesse suscitato dal potenziale ruolo degli ossisteroli nella regolazione dell'omeostasi del colesterolo, essendo quest'ultimo di fondamentale importanza nella biologia dell'organismo umano in quanto costituente essenziale delle membrane plasmatiche e precursore

obbligato per la sintesi di diversi ormoni e metaboliti coinvolti in numerosi processi fisiopatologici [35].

1.2.1 Vie di formazione degli ossisteroli

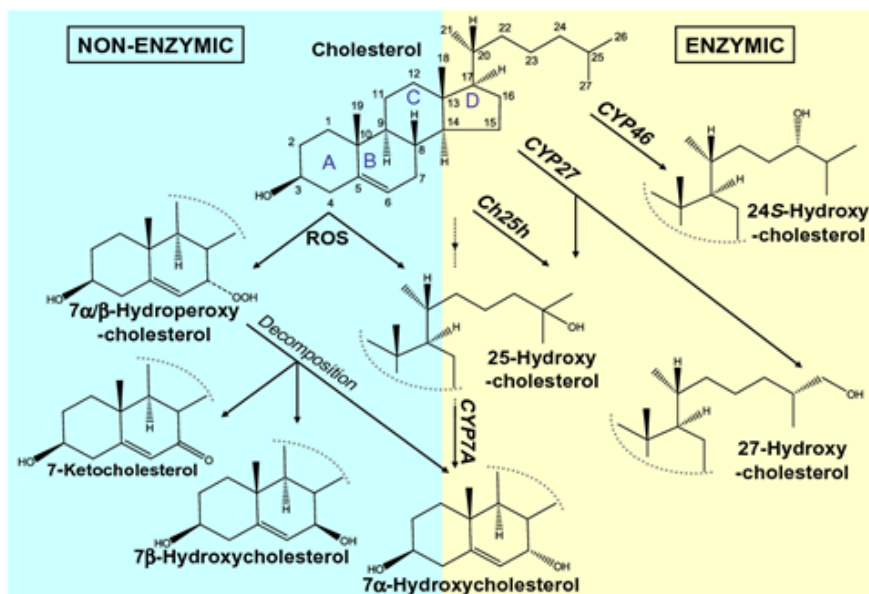


Fig.11. Strutture e vie di formazione dei principali ossisteroli. Da: Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis [35].

In Figura 11 sono mostrate le strutture dei principali ossisteroli in relazione a quella del colesterolo, rappresentata dagli anelli contrassegnati dalle lettere (A-D) e dagli atomi di carbonio indicati dalla numerazione (1-27). Il colesterolo presenta un nucleo tetraciclico (peridro-1,2-ciclopentano fenantrene) proprio degli steroli e come principali sostituenti: un gruppo idrossile sul C3, un doppio legame sul C5 e una catena laterale sul C17. L'ossidazione del doppio legame presente sul nucleo tetraciclico sterolico o della catena laterale porta alla formazione degli ossisteroli, composti più polari ottenuti per introduzione di un atomo di O₂ come gruppo idrossile, epossidico o chetonico. Gli ossisteroli vengono generati *in vivo* per via non enzimatica in seguito ad auto-ossidazione dei lipidi nelle membrane biologiche e nelle lipoproteine o per via enzimatica, durante il catabolismo del colesterolo [35]. In generale, gli ossisteroli rientrano in due principali categorie: quelli ossigenati nell'anello sterolico, principalmente in posizione 7 come gli idroperossidi del colesterolo 7 α -OOH-C (idroperossicolesterolo) e 7 β -OOH-C che si trasformano rapidamente in altre specie come il 7 β -OH-C (idrossicolesterolo), 5 α ,6 α -epossi-C

(epossicolesterolo), 5 β ,6 β -epossi-C, 7-KC (chetocolesterolo) ed infine il TRIOLO colestano- 3 β ,5 α ,6 β -triole [36] e quelli ossigenati a livello della catena laterale sul C17, come i derivati idrossilati del colesterolo 24-OH-C, 25-OH-C, 27-OH-C ma anche 7 α -OH-C [36]. Generalmente, gli ossisteroli ossigenati nell'anello tendono a essere formati non enzimaticamente, mentre gli ossisteroli ossigenati nella catena laterale hanno un'origine enzimatica, con alcune eccezioni. Ad esempio il 25OH-C e il 7 α -OH-C possono formarsi sia per via enzimatica che non enzimatica [35].

Ossidazione non enzimatica

La presenza di un doppio legame rende il colesterolo suscettibile all'attacco radicalico diretto da ROS, che porta all'estrazione di un atomo di idrogeno allilico sul carbonio 7. Il radicale generato sul carbonio 7 è instabile e a sua volta reagisce con l'ossigeno molecolare per formare il radicale perossidico. Questo radicale mantiene la capacità di estrarre un ulteriore atomo di idrogeno da un'altra molecola lipidica, generando il 7 α -OOH-C che, per successiva epimerizzazione, si trasforma in 7 β -OOH-C, isomero con una configurazione più stabile che si forma in modo predominante. I due idroperossidi sono comunque prodotti instabili e vengono rapidamente decomposti nei corrispondenti idrossiderivati (Fig.11): 7 α -OH-C e 7 β -OH-C o disidratati con formazione del 7-KC [35]; la trasformazione può anche proseguire con formazione di 5 α ,6 α -epossi-C e 5 β ,6 β -epossi-C [36] e del TRIOLO a seconda delle condizioni di pH [37]. Gli idroperossidi del colesterolo sono stati rilevati in scarse quantità in alcuni campioni biologici, quali le placche aterosclerotiche umane [35]. Il 7-OOH-C è il principale ossisterolo formato nella fase iniziale dell'auto-ossidazione del colesterolo ma i livelli di 7-OOH-C misurati nei tessuti biologici sono generalmente molto bassi in relazione ai prodotti di ossidazione secondari, 7 α / β OH-C e 7-KC, i più abbondanti ossisteroli prodotti per via non enzimatica presenti nei tessuti biologici [35]. Il colesterolo è presente prevalentemente nelle lipoproteine plasmatiche e nelle membrane cellulari insieme ad altri lipidi, principalmente fosfolipidi. Il colesterolo è chimicamente meno suscettibile all'attacco ossidativo rispetto agli acidi grassi polinsaturi dei fosfolipidi. Come osservato *in vitro* l'ossidazione dei gruppi acilici degli acidi grassi si verifica prima e più ampiamente di quella del colesterolo presente nel plasma e nelle lipoproteine a bassa densità (LDL) [35]. In queste condizioni gli ossisteroli si formano in un ambiente ossidante e la loro formazione può essere

accompagnata da altri composti ossidati potenzialmente tossici. Tuttavia in uno studio sulla cinetica di ossidazione lipidica condotto su cellule poste in coltura esposte a stress ossidativo è stato riportato che il colesterolo si ossidava maggiormente rispetto agli acidi grassi polinsaturi [35], suggerendo che il colesterolo presente sulle membrane cellulari è più suscettibile allo stress ossidativo rispetto agli acidi grassi polinsaturi presenti. Comunque, la formazione di prodotti di ossidazione lipidica nelle cellule dipende dal bilancio tra la loro velocità di formazione, metabolismo ed escrezione. Gli idroperossidi del colesterolo sono rimossi meno efficientemente dalle perossidasi cellulari rispetto ai perossidi dei gruppi acilici degli acidi grassi. Pertanto i più alti livelli di idroperossidi del colesterolo osservati nelle cellule sottoposte a stress ossidativo potrebbero derivare da una clearance meno efficiente operata dalla glutatione perossidasi piuttosto che da una formazione più veloce. Il 7 α -OH-C, uno dei primi intermedi nella biosintesi degli acidi biliari, può essere generato anche ad opera dell'enzima epatico Colesterolo 7 α -idrossilasi (CYP7A1) (Fig 11).

Ossidazione enzimatica

L'idrossilazione enzimatica della catena laterale del colesterolo genera il 24-, 25- e 27-OH-C.; ciascuno dei quali si forma mediante attività enzimatiche differenti [35] (Fig.11). Lo sterolo 27-idrossilasi (CYP27A1) è un enzima mitocondriale appartenente alla famiglia del citocromo P450 espresso in vari tessuti, in particolare nel fegato e nei macrofagi. Questo enzima partecipa al primo step della via alternativa nella biosintesi di acidi biliari. Il CYP27A1 catalizza l'aggiunta di un gruppo idrossile alla catena laterale del colesterolo e di altri steroli, generando steroli idrossilati in posizione 27. Inoltre può ossidare ulteriormente lo stesso gruppo metilico per generare il derivato dell'acido carbossilico. Anche il colesterolo 24-idrossilasi (CYP46A1) è un enzima appartenente alla famiglia del citocromo P450 presente nel reticolo endoplasmatico [35] ed espresso principalmente nelle cellule neuronali del cervello e della retina [35]. Il cervello è la principale fonte del 24-OH-C circolante [35]. Il 25-OH-C può essere formato come prodotto della CYP27A1 e da una specifica idrolasi, la colesterolo 25-idrolasi che non è una eme proteina appartenente alla famiglia P450 bensì una proteina, poco espressa nella maggior parte dei tessuti, che utilizza l'ossigeno e il ferro come cofattori per catalizzare una reazione di idrossilazione. L'interesse nell'attività di questo enzima scaturisce dal fatto che il suo

prodotto (25-OH-C) modula l'attivazione del fattore di trascrizione colesterolo sensibile SREBP [35]. Un'aumentata espressione del colesterolo 25-idrossilasi porta ad un incremento nella produzione del 25-OH-C, e sopprime il processing di SREBP e la sintesi del colesterolo [35]. Questo enzima è localizzato nella membrana del reticolo endoplasmatico e del complesso del Golgi, dove si trovano anche le proteine SREBP, Scap e Insig, data l'associazione funzionale con questo sistema di regolazione della biosintesi del colesterolo.

1.2.2 Fonti di ossisteroli

Oltre ad essere prodotti endogenamente gli ossisteroli possono essere assorbiti con la dieta. Elevate quantità di ossisteroli sono presenti in alcuni alimenti, in particolare nei cibi ricchi di colesterolo come carne, uova e latticini dove si formano probabilmente in seguito a reazioni di ossidazione causate dal trattamento termico, dal contatto con l'O₂ e dall'esposizione alla luce. Il 7-chetocolesterolo (7-KC) e il colestano-3 β ,5 α ,6 β -triolo (TRIOLO) sono tra i principali prodotti di ossidazione trovati negli alimenti [38]. Quali siano le fonti alimentari e in che misura esse contribuiscano ai livelli circolanti e tissutali di ossisteroli ha suscitato interesse e diversi studi condotti negli animali e nell'uomo hanno dimostrato che gli ossisteroli introdotti con gli alimenti possono essere assorbiti dall'intestino, esterificati dalla LCAT e trasportati in circolo, prima come chilomicroni e poi come LDL e HDL, per raggiungere i distretti tissutali dell'organismo. Il contributo degli ossisteroli esogeni ai livelli plasmatici e tissutali umani non è ancora chiaro [35]. Una stima quantitativa esatta dei livelli di ossisteroli endogeni rispetto agli ossisteroli esogeni presenti nei tessuti non esiste ma l'abbondanza relativa dei singoli ossisteroli presenti nella dieta, nel siero e nei tessuti, è diversa indicando che gli ossisteroli presenti negli alimenti vengono assorbiti, modificati metabolicamente ed eliminati *in vivo*. In che misura le fonti alimentari contribuiscono ai livelli tissutali di ossisteroli dipende pertanto dal tipo specifico di ossisterolo oltre che dalla quantità presente nel cibo.

1.2.3 Livelli tissutali di ossisteroli

In condizioni normali, gli ossisteroli coinvolti in processi fisiologici sono mantenuti a livelli molto bassi e controllati, solitamente in presenza di un grande eccesso (1000

volte) di colesterolo. Negli studi che hanno l'obiettivo di esplorare gli effetti biologici/patologici dei prodotti di ossidazione del colesterolo, è importante che i sistemi sperimentali utilizzati riproducano il più vicino possibile le condizioni in cui gli ossisteroli sono presenti *in vivo*. La principale funzione del colesterolo è quella di definire la struttura fisica delle membrane cellulari. Il colesterolo ha un effetto condensante sul doppio strato fosfolipidico di membrana, limita il movimento delle code apolari dei fosfolipidi e diminuisce la permeabilità della membrana. La distribuzione del colesterolo e dei fosfolipidi all'interno delle membrane non è uniforme; il colesterolo forma domini liquidi ordinati (Lo) o "zattere lipidiche" attraverso una fitta associazione di fosfolipidi contenenti catene aciliche sature. Questi domini Lo sono circondati da domini più fluidi e liquidi (Ld). Si ritiene che l'eterogeneità nella distribuzione dei lipidi di membrana indotta dal colesterolo controlli l'associazione di alcune proteine con le membrane e la loro attività, regolando gli eventi di trasduzione del segnale attraverso la membrana. Come il colesterolo, molti ossisteroli sono molto idrofobici e confinati nelle membrane cellulari. Tuttavia, piccole differenze nelle strutture degli ossisteroli rispetto al colesterolo possono influenzare il modo in cui interagiscono con altri lipidi di membrana, e questo a sua volta può avere effetti significativi sulla struttura e sulla funzione della membrana cellulare [35]. Il bassissimo rapporto ossisteroli / colesterolo solitamente presente nelle cellule *in vivo* indica che gli ossisteroli hanno un impatto limitato sulla struttura e sulla funzione della membrana. Tuttavia, in alcune condizioni sperimentali e patofisiologiche, gli ossisteroli rappresentano una percentuale molto maggiore (> 20%) degli steroli cellulari totali. In queste condizioni gli effetti degli ossisteroli sulla struttura della membrana cellulare possono diventare significativi. Esistono pochissime misurazioni affidabili delle concentrazioni cellulari di ossisteroli e della loro localizzazioni subcellulare, ostacolate dalle difficoltà associate all'accurata valutazione di bassissime concentrazioni di ossisteroli presenti nei campioni biologici, spesso in presenza di un eccesso di colesterolo [35]. Soprattutto per gli ossisteroli generati non enzimaticamente, anche un piccolo grado di auto-ossidazione del colesterolo durante la conservazione, l'estrazione e l'analisi del campione potrebbe contribuire significativamente nella valutazione dei livelli di esposizione agli ossisteroli in vari tessuti in condizioni pato-fisiologiche. Un ulteriore problema che viene spesso trascurato nel considerare i livelli *in vivo* di ossisteroli è la

proporzione che viene esterificata. L'esterificazione del colesterolo in eccesso nelle cellule, mediato dall'acilcoenzima A-colesterolo aciltransferasi (ACAT), è un normale meccanismo cellulare per limitare i livelli di colesterolo libero nelle membrane cellulari entro limiti ristretti, al fine di mantenere la normale struttura della membrana. Il colesterolo esterificato generato da ACAT viene immagazzinato come deposito, metabolicamente inerte, del colesterolo in eccesso in goccioline lipidiche citoplasmatiche. L'ACAT esterifica anche molte forme ossidate di colesterolo [35], infatti gli ossisteroli sono prevalentemente presenti come esteri in vivo. Ad esempio, nelle lesioni aterosclerotiche umane e nelle cellule schiumose di macrofagi umani isolate dalle lesioni, l'80-95% di tutti gli ossisteroli misurati si trova in forma esterificata [35]. Anche la maggior parte degli steroli presenti in circolo viene esterificata [35], in questo caso l'esterificazione è mediata dalla lecitina-colesterolo aciltransferasi (LCAT). Se assumiamo che gli ossisteroli esterificati siano, come gli esteri del colesterolo, metabolicamente inerti, i livelli cellulari in vivo effettivi degli ossisteroli saranno 10-20 volte più bassi dei livelli totali di ossisterolo che di solito vengono misurati. Le percentuali (% in massa) di ossisteroli nel plasma trovate in forma esterificata sono le seguenti: 26-OH-C, 91%; 24-OH-C, 72%; 7 α -OH-C, 83%; 7 β -OH-C, 85%; 7-KC, 38%; 5 α , 6 α -epossi-C, 21%; 5 β , 6 β -epossi-C, 22%; TRIOLO, 14%; e 25-OH-C, 59% [39]. Contrariamente alla maggior parte degli ossisteroli gli epossi-C, TRIOLO e 7-KC, sono stati trovati prevalentemente come steroli liberi. Gli ossisteroli non sono mai presenti isolatamente in vivo, ma esistono spesso in combinazione con altri ossisteroli e sempre in presenza di un grande eccesso di colesterolo. Alcuni effetti deleteri dell'aggiunta in bolo di ossisteroli in vitro diminuiscono quando vengono aggiunti insieme al colesterolo o persino ad altri ossisteroli [35]. Ciò enfatizza ulteriormente la cura con cui devono essere condotti studi sperimentali sulla biologia degli ossisteroli e la necessità urgente di definire accuratamente le quantità e la posizione fisica degli ossisteroli che si accumulano all'interno delle cellule.

1.2.4 Funzioni fisiologiche degli ossisteroli

Gli ossisteroli prodotti per via enzimatica svolgono diverse funzioni biologiche, rappresentano intermedi nella sintesi degli acidi biliari, modulano la permeabilità di

membrana, sono coinvolti nella regolazione dell'espressione genica influenzando l'attività di enzimi, recettori e trasportatori molecolari e sono implicati nel mantenimento dell'omeostasi del colesterolo e di altri lipidi [35,36,38,40]. Per l'organismo umano il colesterolo è essenziale ma estremamente dannoso se presente in eccesso, pertanto le cellule sono provviste di molteplici meccanismi e strategie per mantenere i livelli di colesterolo sotto controllo e limitarne l'accumulo, quali la riduzione della sintesi e dell'assorbimento del colesterolo, la stimolazione dell'eliminazione del colesterolo dalla cellula e l'aumento della conservazione come esteri di colesterolo. Alcuni ossisteroli fungono da sensori e regolatori dell'eccesso di colesterolo. Il coinvolgimento degli ossisteroli nell'omeostasi del colesterolo è riassunto in Figura 12:

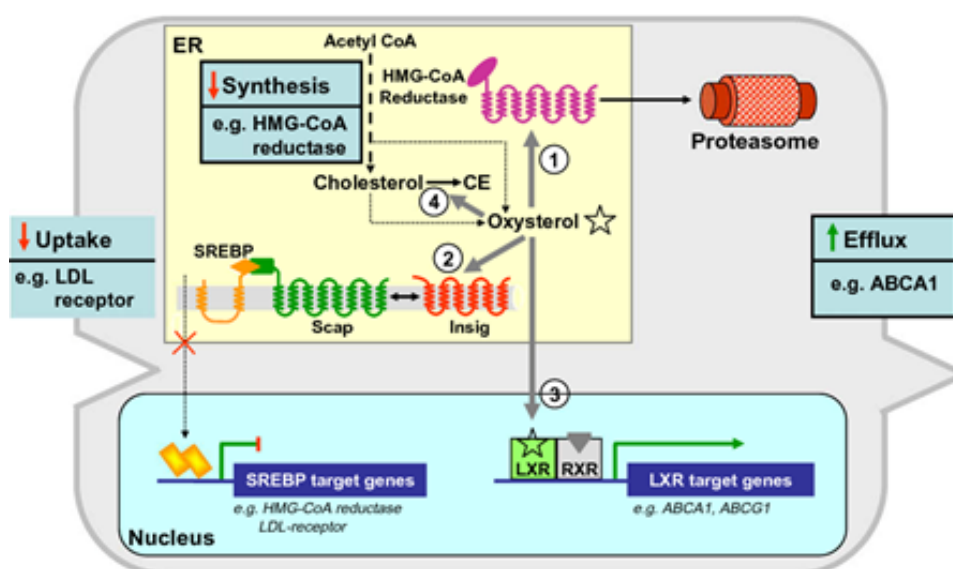


Fig.12. Alcuni ossisteroli riducono i livelli di colesterolo nella cellula attraverso diversi meccanismi molecolari. Da: Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis [35].

Gli ossisteroli accelerano la degradazione dell'enzima 3-idrossi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) reduttasi.

L'enzima HMG-CoA reduttasi catalizza la tappa limitante, e quindi regolatrice, della biosintesi del colesterolo ed è il bersaglio molecolare della classe dei farmaci ipocolesterolemici delle statine. Questo enzima che risiede nel reticolo endoplasmico (RE), catalizza la conversione di HMG-CoA a mevalonato, un importante intermedio nella sintesi di colesterolo e di isoprenoidi non sterolici essenziali. La reduttasi è

soggetta ad un sistema di controllo a feedback attraverso molteplici meccanismi mediati dai prodotti finali della via metabolica dell'acido mevalonico. L'ubiquitina funge da marcatore delle proteine da degradare nella via proteasomiale. La degradazione post-traslazionale della HMG-CoA reduttasi da parte del sistema ubiquitina-proteasoma è un aspetto importante nel controllo della sintesi del colesterolo. L'accumulo di alcuni steroli innesca il legame della reduttasi con alcune proteine presenti nella membrana del RE chiamate Insig. Il legame reduttasi-Insig porta al reclutamento di una ubiquitina ligasi associata alla membrana, che avvia l'ubiquitinazione della reduttasi. L'ubiquitinazione è obbligatoria per il riconoscimento della reduttasi dalle proteine della membrana del RE e per la degradazione della reduttasi da parte dei proteasomi citosolici. Alcuni ossisteroli possono accelerare la degradazione dell'HMG-CoA reduttasi (Fig 12), sebbene i regolatori fisiologicamente più rilevanti per questo processo siano gli intermedi della via biosintetica del colesterolo [35]

Gli ossisteroli sopprimono l'attivazione della Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP)

La sintesi della HMG-CoA reduttasi è stimolata dal fattore di trascrizione colesterolo-sensibile SREBP. Molti geni che codificano per gli enzimi coinvolti nella biosintesi del colesterolo sono regolati dalla famiglia dei fattori di trascrizione, della quale fanno parte tre isoforme: SREBP-1a ha target genetici sovrapposti a SREBP-1c e SREBP-2; SREBP-1c generalmente controlla i geni coinvolti nella sintesi di acidi grassi, fosfolipidi e trigliceridi, mentre SREBP-2 si occupa principalmente di regolare i geni coinvolti nella sintesi e nell'assorbimento del colesterolo, incluso l'HMG-CoA reduttasi e il recettore per le LDL. Come precedentemente riportato, nel RE risiede un network proteico che controlla i livelli di colesterolo. Una proteina chiave di questo network è Scap, (SREBP cleavage-activating protein), contenente un dominio sensibile ai livelli di colesterolo. Quando i livelli di colesterolo sono al di sopra della soglia critica, la proteina SREBP è legata a Scap, a sua volta legata alla proteina Insig, formando il complesso SREBP-Scap-Insig privo di attività (Fig. 12). Quando i livelli di colesterolo scendono al di sotto di una soglia critica (5% dei lipidi RE totali) [35], il complesso SREBP-Scap si separa da Insig e Scap veicola SREBP all'apparato del Golgi dove viene clivato sequenzialmente da due proteasi. Il fattore di trascrizione

attivo prodotto viene importato nel nucleo dove si lega alla sequenza di riconoscimento SRE (Sterol Regulatory Element) appartenente a geni coinvolti nel metabolismo lipidico. In questo modo viene stimolata l'espressione di geni target coinvolti nella sintesi del colesterolo (SREBP-2) e degli acidi grassi (SREBP-1), nonché del recettore delle LDL (LDLR). Il trasporto di SREBP dal ER al Golgi è inibito sia dal colesterolo che dagli ossisteroli, con conseguente blocco della sintesi del colesterolo. In particolare il colesterolo agisce sulla proteina Scap, mentre gli ossisteroli interagiscono con Insig. In risposta ad entrambi i segnali di eccesso di sterolo, il risultato netto è lo stesso: il complesso SREBP-Scap-Insig, mantiene SREBP in forma inattiva arrestando l'espressione genica.

Gli ossisteroli aumentano l'efflusso di colesterolo attivando il recettore Liver X Receptors (LXR)

Alcuni ossisteroli sono ligandi fisiologici dei recettori nucleari LXR. Una volta attivati, in presenza del ligando gli LXR formano eterodimeri con il retinoid-X-receptor (RXR); l'eterodimero LXR/RXR si lega ad elementi di risposta (LXREs) presenti a livello genico (Fig.12). LXR presenta due isoforme che, rispondono agli stessi ligandi endogeni, ma presentano una distribuzione tissutale differente. LXR α è espresso nel fegato, nel tessuto adiposo e nei macrofagi, mentre LXR β è espresso in modo ubiquitario [41]. Gli LXR controllano l'espressione di geni coinvolti nel trasporto del colesterolo, nella sintesi di acidi biliari nell'assorbimento degli steroli nella lipogenesi epatica e nella sintesi delle HDL [42,43]. Questi recettori controllano l'espressione di alcuni geni che codificano per i trasportatori di membrana appartenenti alla famiglia delle ATP-binding cassette (ABC) quali ABCG5 e ABCG8 nell'intestino, dove sono coinvolti nell'escrezione degli acidi biliari e nell'assorbimento intestinale di colesterolo o ABCA1 e ABCG1 nei macrofagi, coinvolti nei meccanismi di efflusso del colesterolo [44]. È stato inoltre dimostrato che il recettore LXR silenzia direttamente l'espressione di due enzimi coinvolti nella biosintesi del colesterolo il lanosterolo 14 α -demetilasi (CYP51A1) e la squalene sintasi, interagendo con gli elementi di risposta (LXRE) situati in ciascuno di questi geni; un altro meccanismo con cui gli ossisteroli possono inibire la sintesi del colesterolo [35] (Fig.12). Va inoltre segnalato che molti geni coinvolti nella sintesi di acidi grassi e trigliceridi come ad esempio l'acido grasso sintasi e SREBP-1, possono

essere sovraespressi per effetto di LXR [35]. In seguito alla scoperta che l'LXR α è regolata da Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ), LXR è stato integrato in una cascata trascrizionale anti-aterosclerosi, attraverso l'asse di segnalazione PPAR γ -LXR α -ABCA1 coinvolto nell'assorbimento delle LDL ossidate, e nella rimozione del colesterolo [44] durante il processo di aterogenesi. PPAR γ , è un altro membro della famiglia dei recettori nucleari che svolge un ruolo chiave nel metabolismo lipidico e nell'efflusso del colesterolo. È espresso principalmente nei macrofagi e un suo bersaglio diretto è il recettore scavenger di classe B, CD36 identificato come recettore per le LDL ossidate. Gli scavenger receptor o recettori spazzini, sono recettori per la fagocitosi presenti nei macrofagi. Nelle lesioni aterosclerotiche, i macrofagi che esprimono questi recettori sulla loro membrana plasmatica legano il colesterolo presente nelle LDL ossidate depositato nella parete dei vasi sanguigni e si trasformano in foam cells (cellule schiumose). In seguito al legame con ligandi specifici quali le LDL ossidate PPAR γ induce un'aumentata espressione di CD36 che provoca un ulteriore assorbimento di oxLDL da parte dei macrofagi. PPAR γ regola l'efflusso di colesterolo inducendo anche l'espressione di LXR α , che una volta attivato può indurre la trascrizione di trasportatori del colesterolo come ABCA1, i quali garantiscono un aumentato efflusso di colesterolo dai macrofagi. L'effetto netto di questa via è probabilmente la rimozione dei lipidi dalle pareti delle arterie [44]. Inoltre, LXR sopprime la risposta infiammatoria inibendo nei macrofagi l'espressione di mediatori dell'infiammazione, quali interleuchina-6 (IL-6), ossido nitrico sintasi inducibile e ciclossigenasi (COX)-2 [45].

1.2.5 Citossicità degli ossisteroli

Gli ossisteroli sono importanti non solo in alcuni aspetti dei processi fisiologici, ma anche in condizioni patologiche, principalmente in quelle correlate all'infiammazione cronica. L'omeostasi del colesterolo è principalmente modulata dagli ossisteroli formati enzimaticamente. Al contrario, gli effetti citotossici sono stati attribuiti agli ossisteroli di origine auto-ossidativa. In molte patologie umane associate alla morte e all'infiammazione cellulare, gli ossisteroli sono presenti in quantità superiori rispetto ai loro livelli fisiologici. La panoramica sotto indicata non pretende di essere esaustiva; serve semplicemente a sintetizzare recenti scoperte che mettono in

relazione gli ossisteroli con una serie di malattie umane. Numerosi studi *in vitro*, studi su animali e indagini cliniche supportano il ruolo critico di vari ossisteroli nei meccanismi patogenetici alle base di malattie correlate all'infiammazione e all'invecchiamento come il morbo di Alzheimer, la degenerazione maculare e la cataratta, l'osteoporosi, l'aterosclerosi e la disfunzione vascolare, il diabete (in particolare il diabete mellito di tipo 2) e alcune forme di cancro (carcinoma del colon e carcinoma della prostata) (Fig.13) [40,46-48].

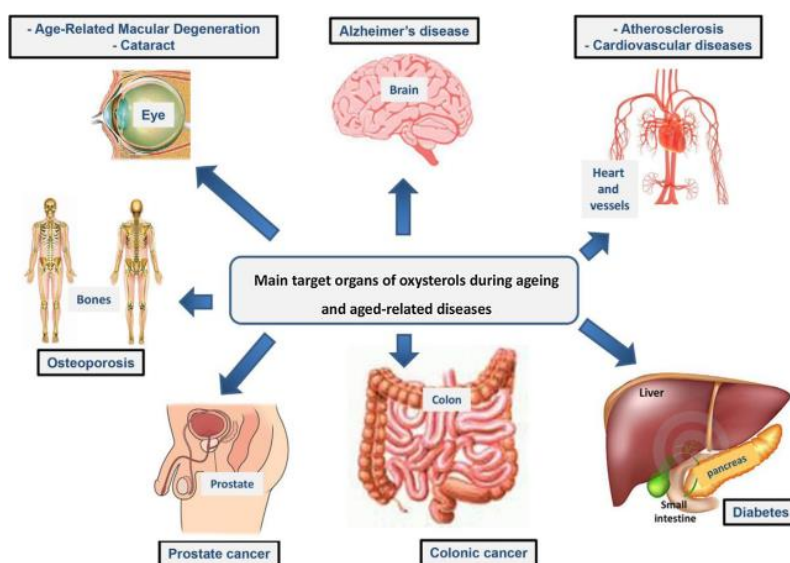


Fig.13. Ossisteroli nei meccanismi patogenetici alle base di malattie correlate all'infiammazione e all'invecchiamento. Da *Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes* [40].

La citossicità degli ossisteroli tra cui 7-OH-C, 7-KC e TRIOLO sono stati considerati tra i membri più tossici [49] deriva principalmente dalla loro abilità ad indurre apoptosi, un programma di morte cellulare geneticamente controllato di critica importanza per il mantenimento dell'omeostasi dei tessuti dell'organismo. Molti studi *in vitro* hanno descritto l'effetto pro-apoptotico degli ossisteroli in varie linee cellulari (macrofagi, fibroblasti, cellule muscolari lisce, cellule endoteliali, monocitiche ed enterocitiche) [50-55] ed è stato visto che tra i fattori iniziali con cui gli ossisteroli inducono apoptosi vi sono sovrapproduzione di ROS e perturbazione dei livelli di Ca^{2+} intracellulari [36]. Il meccanismo con cui gli ossisteroli innescano il processo apoptotico non è stato ancora completamente chiarito, ma la capacità degli ossisteroli di provocare un'elevata produzione di specie reattive dell'ossigeno attraverso

l'aumentata regolazione degli enzimi della famiglia NADPH ossidasi (NOX) [56], una delle principali fonti di ROS cellulari, potrebbe spiegare la tossicità degli ossisteroli che include l'induzione della morte cellulare (apoptosi e / o oncosi), attività infiammatorie, fosfolipidosi, variazioni dei livelli citoplasmatici di calcio, perturbazioni della membrana microsomiale e mitocondriale e metabolismo della poliammina [57], tutte condizioni che condividono la sovrapproduzione intracellulare di ROS. Gli ossisteroli possono anche essere usati come biomarcatori nelle malattie neurodegenerative. Poiché la barriera emato-encefalica (BBB) impedisce l'assorbimento del colesterolo, la sintesi de novo è responsabile di tutto il contenuto di colesterolo nel sistema nervoso centrale. I neuroni cerebrali regolano la sintesi del colesterolo e ne mantengono l'omeostasi. Un eccesso di colesterolo viene convertito in 24-OH-C, rendendo il cervello la principale fonte di questo ossisterolo in circolazione. I livelli plasmatici del 24-OH-C riflettono il numero di neuroni metabolicamente attivi nel cervello, quindi sono proporzionali al grado di danno cerebrale in condizioni neurodegenerative come la sclerosi multipla, il morbo di Alzheimer e la malattia di Huntington [46].

L'aterosclerosi è la condizione più notoriamente associata alla citotossicità degli ossisteroli. Questa patologia è caratterizzata dall'accumulo di depositi di colesterolo nelle pareti delle grandi e medie arterie. La successiva formazione della placca aterosclerotica restringe gradualmente il lume del vaso, porta alla trombosi e compromette l'apporto di ossigeno agli organi, causando infine infarto e ictus, le principali cause di mortalità nel mondo. Uno dei principali fattori di rischio dell'aterosclerosi è, in effetti, l'ipercolesterolemia che innesca l'accumulo di lipoproteine a bassa densità ossidate (oxLDL) nello spazio sub-intimale dei vasi. Qui le oxLDL vengono assorbite dai macrofagi attivati, promuovendo stress ossidativo e risposta infiammatoria cronica che portano alla progressione e all'instabilità della placca aterosclerotica [58]. L'ipercolesterolemia contribuisce all'aterogenesi inducendo l'attivazione delle cellule endoteliali vascolari, con conseguente espressione di molecole infiammatorie quali proteine di adesione, citochine, chemochine, fattori di crescita e di specie reattive dell'ossigeno [59]. Questi fattori nell'insieme favoriscono il richiamo e la successiva infiltrazione di leucociti, con trasformazione dei monociti in macrofagi. Il reclutamento dei monociti è un processo a più fasi mediato dalle molecole di adesione. Inizia con il rolling, caratterizzato da

legami di breve durata tra la E-selectina presente sulle cellule endoteliali e i ligandi sialati come la PSGL-1 (P-selectina glicoproteina ligando-1) presente sui monociti. Segue l'arresto, attraverso le interazioni tra β 1- e β 2-integrine attivate su monociti con le molecole di adesione vascolare (VCAM-1) e intracellulare (ICAM-1) sulle cellule endoteliali [59]. I macrofagi fagocitano le LDL ossidate accumulando lipidi nel loro citoplasma e trasformandosi in cellule schiumose. Nelle fasi successive, l'accumulo di tessuto fibrotico porta alla crescita irreversibile dell'ateroma vero e proprio. La risposta infiammatoria può successivamente stimolare la migrazione e la proliferazione delle cellule muscolari lisce. Queste migrano dalla tunica media all'intima producendo matrice extracellulare che funge da impalcatura strutturale della placca aterosclerotica (ateroma). L'infiammazione può ulteriormente provocare un ispessimento della parete arteriosa: la lesione fibrolipidica va a sostituire il semplice accumulo lipidico delle fasi iniziali e diventa irreversibile. Il vaso risponde con un processo detto di rimodellamento compensatorio alla stenosi (restringimento indotto dalla placca), dilatandosi gradualmente in modo da mantenere inalterato il lume dei vasi. Il risultato finale è la formazione di una lesione più o meno grande, costituita da un nucleo centrale lipidico (core lipidico) avvolto da un cappuccio fibroso connettivale (cappuccio fibroso). Tra le varie molecole reattive, derivanti dall'ossidazione della frazione lipidica delle lipoproteine a bassa densità (LDL), gli ossisteroli hanno senza dubbio un ruolo fondamentale in tutte le varie fasi di formazione dell'ateroma, a causa della loro proprietà pro-infiammatorie, pro-ossidanti, pro-apoptotiche e fibrogeniche (Fig.14).

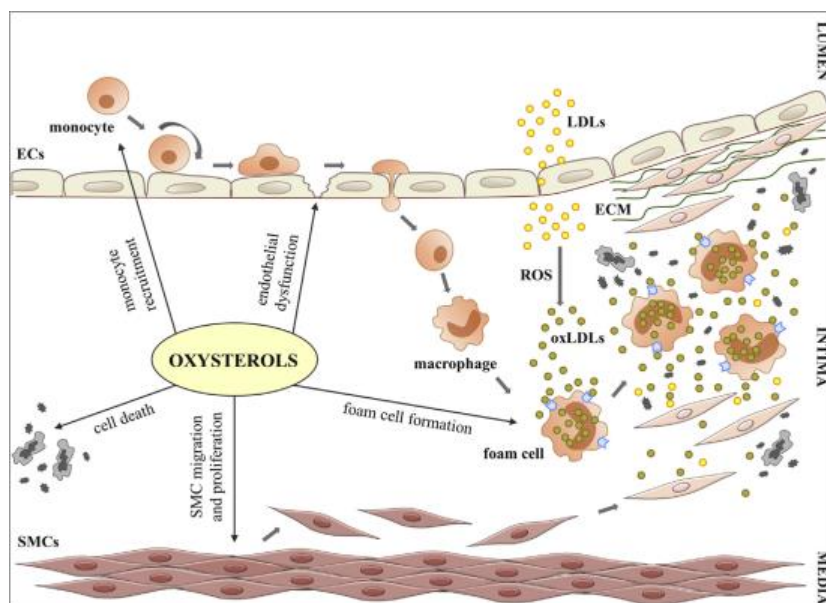


Fig. 14. Coinvolgimento degli Ossisteroli nello sviluppo della placca ateromatosa. Da: **Implication of oxysterols in chronic inflammatory human diseases** [58].

Tra tutti gli ossisteroli il 27-OH-C, il 7-KC, il 7 α / β -OH-C, 5 α /6 α -epossi-C, 5 β /6 β -epossi-C e il TRIOLO sono i più abbondanti ossisteroli individuati nel plasma di soggetti ipercolesterolemici e nelle lesioni aterosclerotiche. La percentuale di ossisteroli misurata nel plasma di soggetti ipercolesterolemici è 7-KC (57%) > 7 α / β -OH-C (21%) > 5 β /6 β -epossi-C (12%) > TRIOLO (10%) mentre nella placca ateromatosa è 7-KC (55%) > TRIOLO (13%) > 7 α / β -OH-C (12%) > α / β -epossi-C (10%) [58]. I progressi effettuati nell'analisi proteomica hanno chiarito il coinvolgimento degli ossisteroli nella patogenesi dell'aterosclerosi. L'effetto citotossico del 7-KC in grado di influenzare la regolazione di diverse proteine coinvolte nell'omeostasi vascolare, nell'angiogenesi e nella coagulazione del sangue è stato dimostrato nelle cellule endoteliali [58]; il 7 β -OH-C e il 7-KC influenzano nei macrofagi l'espressione di proteine associate al ciclo cellulare, la trasformazione in cellule schiumose, e la risposta infiammatoria [58]. La disfunzione dell'endotelio vascolare è l'evento iniziale nello sviluppo della lesione aterosclerotica. Gli ossisteroli potrebbero alterare la funzionalità dell'endotelio inserendosi nella membrana cellulare contribuendo alla rigidità della parete endoteliale. In questo contesto, nelle cellule endoteliali trattate con 7-KC è stata osservata un'interruzione del trasporto di ioni da parte di Na⁺/K⁺-ATPasi e la perturbazione della struttura della membrana [58]. L'incubazione di sezioni aortiche di coniglio con 7-KC, 7 α -OH-C e 7 β -OH-C ha

influenzato la risposta vasodilatatoria al flusso sanguigno e ad alcuni composti ad azione vasodilatatoria; questo effetto era dovuto alla ridotta biodisponibilità di NO in seguito alla sua diretta interazione con gli ossisteroli [58]. Inoltre il 25-OH-C ha causato la compromissione della funzione endoteliale, probabilmente inibendo l'attività dell'enzima eNOS e innescando il percorso di morte apoptotica nelle cellule endoteliali dei vasi [58]. La compromissione della funzione dell'endotelio vascolare è anche causata dallo stress del reticolo endoplasmatico (RE) [58] che si verifica quando segnali di stress, come lo stress ossidativo, causano l'accumulo di proteine denaturate nell'organello portando a disfunzione e morte cellulare [58]. Sebbene l'associazione tra oxLDL e stress RE nell'indurre l'apoptosi delle cellule endoteliali vascolari sia ben consolidata, l'indagine sul contributo degli ossisteroli, come componenti ossidati delle LDL, è ancora in fase di investigazione.

L'apoptosi delle cellule vascolari, in particolare l'apoptosi macrofagica, favorisce la progressione delle placche aterosclerotiche. È noto che gli ossisteroli sono in grado di attivare gli isoenzimi della NOX [56]. Il trattamento con gli ossisteroli ha causato sovrapproduzione di ROS, attribuita all'attività NADPH-ossidasi, in diversi tipi di cellule della parete vascolare come cellule endoteliali, cellule muscolari lisce e macrofagi [40]. La capacità di alcuni ossisteroli di indurre l'apoptosi delle cellule vascolari sembra essere correlata all'aumentata generazione intracellulare di ROS [58]. L'inibizione dello stress ossidativo dipendente dal 7-KC mediante l'impiego di inibitori selettivi di NOX ha fornito una protezione significativa contro l'apoptosi dei macrofagi innescata dalla produzione di ROS indotta dal 7-KC [58]. Inoltre, nelle cellule promonocitiche umane U937, il 7-KC induce apoptosi attraverso stress ossidativo, attivazione della caspasi, degradazione lisosomiale e fosfolipidosi. Il coinvolgimento dei ROS è stato indirettamente confermato dall'inibizione dell'apoptosi in seguito al pretrattamento delle cellule con antiossidanti [58]. La capacità del 7-KC di indurre fosfolipidosi potrebbe anche favorire l'accumulo di lipidi nelle cellule della parete vascolare. La progressione della placca aterosclerotica può essere compromessa almeno in parte per effetto del 7KC. Infatti, poiché questo ossisterolo innesca la produzione di fattori angiogenici da parte dei macrofagi, questo evento può avere impatti importanti sui vasi e successivamente sulla crescita della placca [40]. Gli effetti pro-apoptotici esercitati dagli ossisteroli sulle cellule muscolari lisce (SMC) innescano l'indebolimento e la distruzione del cappuccio fibroso,

favorendo l'instabilità della placca e aumentando il rischio di trombosi [58]. Nelle lesioni aterosclerotiche avanzate, diversi ossisteroli contribuiscono all'erosione e alla rottura della placca. Il TRIOLO è in grado di promuovere la calcificazione delle cellule muscolari lisce vascolari indebolendo la parete arteriosa [40]. Una caratteristica importante della progressione della placca aterosclerotica è l'infiammazione. Gli ossisteroli contribuiscono ad amplificare e sostenere la risposta infiammatoria inducendo l'espressione e la sintesi di varie molecole coinvolte nel processo infiammatorio [58] tra cui il fattore necrosi tumorale- α (TNF- α), l'interleuchina-1b (IL-1b) e l'interleuchina-6 (IL-6), le chemochine come l'interleuchina-8 (IL-8) e la proteina chemiotattica-1 dei monociti (MCP-1), la proteina infiammatoria-1b dei monociti (MIP-1b) e le molecole di adesione, inclusa le molecole di adesione ICAM-1, VCAM-1 e l'E-selectina [57]. La proteina chemotattica-1 dei monociti (MCP-1) e la β_1 -integrina, molecole fondamentali per la chemotassi il reclutamento e l'adesione dei monociti all'endotelio vascolare, sono risultate sovraesprese nelle cellule U937 trattate con una miscela di ossisteroli che riproduce quella riscontrata nel plasma degli individui ipercolesterolemici, attraverso l'attivazione della chinasi ERK e del fattore di trascrizione NF-kB [58]. In un altro studio in vitro su cellule umane promonocitiche U937 è stato dimostrato che una miscela di ossisteroli biologicamente rappresentativa induce la formazione di cellule schiumose stimolando la sintesi del recettore scavenger CD36 nei macrofagi. L'aumentata espressione del recettore scavenger CD36 dipendeva dall'attivazione della proteina chinasi PKC δ , dalla chinasi ERK1/2 e dal recettore nucleare PPAR γ [58]. Gli ossisteroli sono anche in grado di stimolare la produzione di altri mediatori dell'infiammazione, come le prostaglandine (PG). In cellule endoteliali di vena ombelicale umana, il TRIOLO induce l'espressione della cicloossigenasi-2 (COX-2), portando al rilascio di PGE2. Questo effetto è dovuto al coinvolgimento dell'asse PI3K / Akt / eNOS, nonché all'attivazione di NF-kB e della p38 MAPK [60].

1.3 Background della tesi di dottorato

Attività citotossica di una miscela di ossisteroli con effetti eriptotici è stata di recente dimostrata su globuli rossi umani [61]. La miscela riproduceva qualitativamente gli ossisteroli plasmatici in condizione di ipercolesterolemia ed era

composta da 7-KC, TRIOLO, 5 α /6 α -epossi-C, 5 β /6 β -epossi-C, 7 α -OH-C e 7 β -OH-C. Analizzando l'effetto tossico dei singoli ossisteroli, lo studio riporta che soltanto il 7-KC ed il TRIOLO sono responsabili dell'azione eriptotica della miscela. Entrambi gli ossisteroli sembrano condividere un simile meccanismo d'azione basato sull'induzione di stress ossidativo. TRIOLO e 7-KC producevano infatti negli RBC un aumento di specie ossidanti, accompagnata da deplezione del GSH ed ossidazione dei lipidi di membrana. Il TRIOLO mostrava anche una blanda azione emolitica suggerendo una qualche attività citotossica addizionale. Entrambi gli ossisteroli causavano un aumento della concentrazione del Ca²⁺ citosolico subordinato alla formazione di PGE2-COX dipendente, riduzione del volume cellulare e perdita di asimmetria di membrana con esternalizzazione di PS. Tramite l'uso di specifici inibitori, gli autori dimostrano che l'eriptosi indotta da 7-KC e TRIOLO era dipendente dalla proteina chinasi C (PKC) e dalla caspasi 3. Il Ca²⁺ extracellulare, comunque, non appariva essenziale per l'azione eriptotica degli ossisteroli, poiché l'assenza dello ione nel medium o la presenza di specifici chelatori permeabili alla cellula, non inibivano l'esternalizzazione di PS. Gli autori nel lavoro dimostrano che il trattamento con gli ossisteroli inibiva l'attività flippasi APL-translocasi (APLT), razionalizzando così l'esternalizzazione della PS in assenza di Ca²⁺. Al contrario, la pre-incubazione degli eritrociti con antiossidanti quali vitamina E o n-acetilcisteina, totalmente preveniva l'attività eriptotica. Lo studio concludeva, quindi, che il meccanismo tossico degli ossisteroli era interamente dipendente da stress ossidativo e indipendente dal Ca²⁺ [61].

2. OBIETTIVO DELLA RICERCA

Il presente progetto, svolto presso il laboratorio di Biochimica del dipartimento STEBICEF dell'Università degli Studi di Palermo, si propone di investigare **il meccanismo molecolare attraverso cui 7-KC o TRIOLO, inducono stress ossidativo, e conseguente eriptosi, in RBC umani**. Poiché l'attività di alcune isoforme di NADPH ossidasi (RBC-NOX) [13], Ossido nitrico sintasi (RBC-NOS) [15], e Xantina ossido reduttasi (RBC-XOR) [22], sono state individuate negli eritrociti umani come fonte enzimatica di specie reattive di ossigeno o azoto (RONS), il coinvolgimento di questi enzimi e dei relativi pathways di attivazione, nell'attività

pro-ossidante ed eriptotica di ciascuno dei due ossisterolo è stato indagato. L'inibizione selettiva degli enzimi e di un certo numero di fattori di attivazione a monte, insieme all'esposizione dei globuli rossi al singolo 7-KC o TRIOLO in concentrazioni di interesse pato-fisiologico (7 μ M e 2 μ M, rispettivamente) [62], è stata la strategia impiegata. Poiché anche una spinta autossidazione di HbO₂, con formazione di Met-Hb e O₂⁻ [63], può contribuire a stress ossidativo negli RBC, l'effetto dei due ossisteroli sullo stato di ossidazione dell'Hb è stato anche considerato.

3. MATERIALI E METODI

Il 7-chetocholesterolo (7-KC) e il cholestan-3 β , 5 α , 6 β -triolo (TRIOLO) sono stati acquistati da Avanti Polar Lipids, Inc (Alabaster, AL, USA). Tutti gli altri reagenti e le sostanze chimiche impiegate sono state fornite da Sigma-Aldrich Chemical Co (St. Louis, MO, USA), se non diversamente specificato.

Condizioni di incubazione e trattamento dei globuli rossi

Campioni di sangue venoso sono stati prelevati da volontari sani, con consenso informato, e gli eritrociti sono stati immediatamente isolati mediante centrifugazione per 20 minuti a 2000 g e alla temperatura di 4°C, su Ficoll (Biochrom KG, Berlino, Germania). Gli eritrociti (ematocrito allo 0,4%) sono stati incubati a 37°C, in presenza del 5% CO₂ e del 95% di umidità, con una soluzione Ringer contenente (mM) 125 NaCl, 5 KCl, 1 MgSO₄, acido 3-(2-idrossietil)piriperazina-N-(2-etansolfonico) (HEPES) / NaOH, 5 glucosio, 1 CaCl₂ a pH 7,4. Il 7-KC e il TRIOLO sono stati aggiunti al mezzo di coltura in tetraidrofurano (THF, concentrazione finale 0,1% v:v). Esperimenti preliminari hanno mostrato che in queste condizioni il THF non ha alcun effetto sulla vitalità delle cellule, quindi i globuli rossi controllo sono stati incubati con THF. Dove indicato, le cellule sono state pre-incubate per 1 h con:

- Difenilene iodonio (DPI, 10 μ M), come inibitore della NADPH ossidasi;
- [(N(6)-[2-[[4-(dietilammino)-1-metilbutil] ammino]-6-metil-4-pirimidinil]-2-metil-4,6-chinolindiammino triclorigrato)] (NSC23766, 500 μ M), come inibitore di Rac1
- N^o-Nitro-L-arginina metil estere cloridrato (L-NAME, 100 μ M), come inibitore

della NOS

- (2- (4-morflinil) -8-fenil-4H-1-benzopiran-4-one) (LY294002, 20 μ M) come inibitore della fosfatidilinositolo 3-chinasi
- L-arginina (5 mM) come attivatore della NOS

prima di aggiungere gli ossisteroli. In questi saggi i globuli rossi controllo sono stati preincubati con il solo veicolo (THF 0.1%, v:v).

Misura dell'esternalizzazione della fosfatidilserina (PS) e del forward scatter

Dopo un lavaggio con un tampone fosfato salino, pH 7,4 (PBS) gli RBC sono stati diluiti a $1,0 \times 10^6$ celluli /mL con il combining buffer secondo le istruzioni riportate dal produttore (eBioscience Inc., San 131 Diego, CA, USA, 88-8005). La sospensione cellulare (100 μ L) è stata trasferita in un tubo e incubata a temperatura ambiente e al buio per 15 minuti con 5 μ L Annessina V coniugata con il fluoroforo FITC. L'Annessina V è una proteina che presenta un'alta affinità per la PS e che lega il fosfolipide di membrana, in maniera Ca^{+2} -dipendente, esso viene traslocato sul versante esterno della membrana. Per ciascun campione 1×10^4 cellule sono state sottoposte ad analisi FACS (fluorescence-activated cell sorting) mediante citometro a flusso Epics XL TM, utilizzando il software Expo32 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) per la misura del forward scatter e della % di esternalizzazione della fosfatidilserina. L'intensità di fluorescenza dell'Annessina-V è stata misurata sul canale di fluorescenza FL-1 con una lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 530 nm.

Misura di specie ossidanti intracellulari

I livelli di RONS o NO sono stati monitorati misurando le variazioni di fluorescenza associate all'ossidazione della dicloro-diidro-fluoresceina diacetato (DCF-DA) o del 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceina diacetato (DAF-FM DA), rispettivamente. Entrambi i fluorofori diffondono passivamente attraverso la membrana cellulare e una volta all'interno delle cellule vengono clivate da esterasi intracellulari nelle corrispondenti forme deacetilate non permeabili. In presenza di RONS o NO, la DCF e la DAF-FM, rispettivamente, vengono rapidamente ossidate e trasformate in derivati altamente fluorescenti. In entrambi i casi la sonda di fluorescenza è stata aggiunta al mezzo di coltura alla concentrazione finale di 10 μ M,

30 minuti prima della fine del trattamento, al buio. Le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione (2 000 g, 4 ° C, 5 min), lavate, sospese in PBS e sottoposte ad analisi FACS. Sono state analizzate 1×10^4 cellule per ciascun campione.

Analisi Western blot

Dopo trattamento, gli RBC sono stati lavati due volte con PBS, risospesi con lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM PMSF, 0,5 mM DTT, 2 mg / mL lisozima) con l'aggiunta di inibitori delle proteasi (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, 11836170001) e sonicati con ghiaccio per 60 secondi con Labsonic LBS1-10 (Falc Instruments srl. Treviglio, BG, Italia). Dopo centrifugazione a 100 000 g per 1 ora a 4 °C, il surnatante è stato raccolto come frazione citosolica. Quando necessario, i pellet sono stati risospesi con lysis buffer, mantenuto a basse temperature e contenente 1% di Triton X-100. I campioni sono stati sottoposti a sonicazione per 30 secondi e nuovamente centrifugati. Il surnatante è stato raccolto come frazione di membrana. La concentrazione di proteine presenti in ciascun campione è stata determinata mediante un saggio colorimetrico che prevede l'impiego del reagente Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). I campioni proteici così preparati sono stati quindi opportunamente diluiti in modo tale da caricare sui pozzetti del gel di poliacrilammide la stessa quantità di proteine per ciascun campione (50 µg / linea). Le proteine sono state quindi separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato al 10%, (SDS-PAGE al 10%) e trasferite mediante elettrotransblotting sulla membrana di nitrocellulosa. Questa è stata incubata per una notte a 4 ° C con una soluzione proteica diluita (latte scremato al 5%) per il bloccaggio di siti di legame aspecifici. Quindi la membrana è stata incubata con uno dei seguenti anticorpi:

- anticorpo monoclonale anti-Akt1 (clone B-1, numero di catalogo Sc-5298; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA),
- anticorpo monoclonale anti-fosfo Akt1/2/3 Ser 473 (clone 11E6, numero di catalogo Sc-81433; Santa Cruz Biotech),
- anticorpo monoclonale anti-fosfo-NOS3 Ser¹¹⁷⁷ (clone 15E2, numero di catalogo Sc-81510; Santa Cruz Biotech),
- anticorpo monoclonale di anti-β-actina (clone C4, numero di catalogo Sc-47778;

Santa Cruz Biotech

- anticorpo monoclonale anti-PKC ζ (clone H-1, numero di catalogo Sc-17781; Santa Cruz Biotech)

per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo aver risciacquato la membrana due volte con Tween 20 / tampone Tris salino per rimuovere efficacemente l'anticorpo primario non legato, essa è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente con una soluzione diluita 1:2000 di un anticorpo secondario anti-IgG coniugato con la perossidasi di rafano (Dako, Santa Clara, California, USA) per la successiva scissione di un agente chemiluminescente. La membrana è stata nuovamente lavata cinque volte con Tween 20 / tampone Tris salino prima di procedere alla rilevazione del blot (Amersham Life Science, Little Chalfont, Regno Unito). La reazione prodotta in seguito all'aggiunta di luminololo emette una luminescenza proporzionale all'ammontare della proteina. Una lastra fotografica è stata sovrapposta alla membrana ed esposta alla luce.

Analisi dell'ossidazione dell'emoglobina

Gli RBC, raccolti da 5 mL di mezzo di incubazione mediante centrifugazione, sono stati risospesi in 2 mL di tampone fosfato ipotonico (5 mM, pH 7,4), lisati per sonicazione come sopra riportato e precipitati. Aliquote di surnatante portate ad un volume finale di 1,0 mL in PBS sono state analizzate spettrofotometricamente in range compreso tra 500-700 nm (DU-640 173 Beckman, Brea, CA, USA) e le concentrazioni dei prodotti di ossidazione dell'emoglobina (Hb), HbO₂, meta-Hb ed emicromo, sono state calcolate secondo Winterbourn [64]. Per valutare la perdita dell'eme, ai campioni sono stati quindi aggiunti lo 0,1% di KCN e lo 0,1% di K₃Fe(CN)₆ convertendo tutte le specie di Hb presenti in ciano complessi con un caratteristico picco di assorbimento a 408 nm (banda di Soret). Il contributo dell'eme è stato calcolato per differenza di assorbanza con gli eritrociti incubati in assenza di ossisteroli (controllo).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Il 7-KC attiva l'RBC-NOX

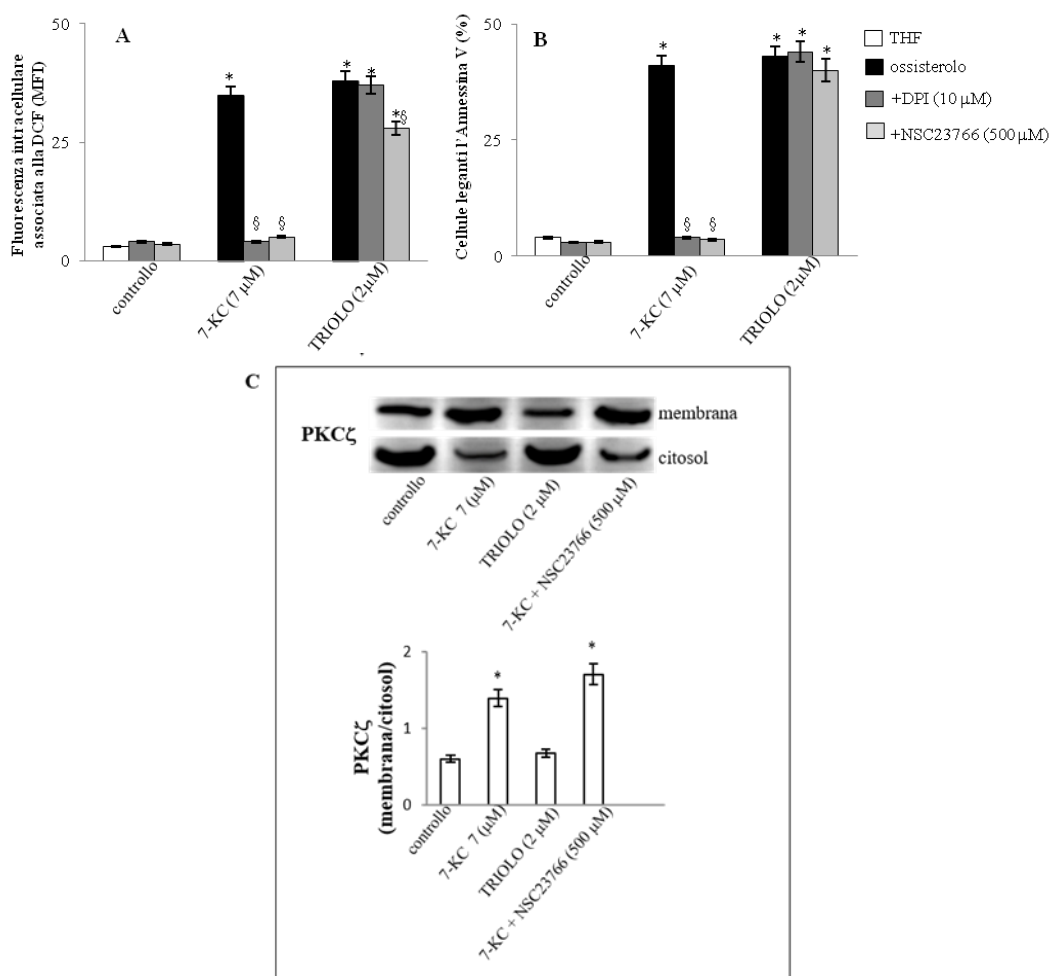


Fig.15. L'azione del 7-Ketocolesterolo è mediata dall'attivazione dell'RBC-NOX, dipendente dalla Rac-GTPasi e dalla PKC ζ . Effetto dell'inibizione della NOX con DPI o dell'inibizione della Rac GTPasi con NSC23766, sulla formazione di RONS indotta dagli ossisteroli (A), sull'esternalizzazione della PS (B) e sulla traslocazione della PKC ζ sulla membrana (C). Gli RBC sono stati preincubati per 1h con l'inibitore o con il solvente (THF), e successivamente trattati con gli ossisteroli. Le cellule sono state lisate 1h dopo il trattamento con gli ossisteroli per l'analisi Western blot della PKC ζ , invece l'analisi citofluorimetrica per la misura dell'intensità di fluorescenza media (MFI) associata alla DCF o della fluorescenza emessa dalle cellule legate all'Annexina V-FITC sono state eseguite rispettivamente 2h e 24h dopo il trattamento con gli ossisteroli. I dati graficamente rappresentati sono la media \pm SD di sei (A e B) o tre (C) esperimenti separati. *Significativamente diverso rispetto al controllo ($P < 0.0001$); § significativamente diverso rispetto ai campioni preincubati senza l'inibitore ($P < 0.0001$). Le comparazioni statistiche sono state eseguite con il software Instat-3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), utilizzando il test one-way Anova seguito dal test post hoc di Bonferroni. Una differenza significativa dei valori era considerata per $P < 0.05$.

I sette enzimi della famiglia NOX / DUOX sono variamente distribuiti nelle cellule e nei tessuti in cui svolgono diverse funzioni associate alla produzione di specie reattive dell'ossigeno: inizialmente riconosciuti per l'azione svolta nella difesa antimicrobica, gli enzimi NOX sono implicati nel mantenimento dell'equilibrio redox cellulare e nel signaling che da esso dipende. Per tale motivo la loro attività è finemente regolata da complessi e differenti meccanismi di controllo. Ad eccezione della NOX-4, costitutivamente attiva e della NOX-5, calcio-dipendente, le subunità catalitiche transmembrana degli isoenzimi dell'NADPH ossidasi, come la NOX -1, -2 e -3, richiedono l'interazione con subunità citosoliche regolatorie, tra le quali la Rac-GTPasi è un attivatore critico [14, 65]. L'attività della NOX descritta nei globuli rossi umani è apparentemente dovuta agli isoenzimi NOX-1 e NOX-5, e in misura minore da NOX-2 e NOX-4 [13]. Per studiare il ruolo dell'RBC-NOX nello stress ossidativo indotto da 7-KC o TRIOLO, gli eritrociti isolati sono stati pre-incubati con DPI, un inibitore dell'attività FAD riducente presente nella subunità catalitica, omologa della gp91 fagocitica, di tutte le isoforme di NADPH ossidasi, o con NSC23766, un inibitore specifico della Rac-GTPasi, e successivamente sottoposti al trattamento con entrambi gli ossisteroli saggiati separatamente. Dai risultati ottenuti, come mostrato in Figura 15 (A, B), abbiamo osservato che sia la produzione di specie ossidanti misurata dall'incremento di fluorescenza associata alla DCF-DA (Fig.15, A) sia l'esternalizzazione della PS, misurata come numero di cellule positive all'Annexina-V FITC (Fig.15, B) indotta dal trattamento con il 7-KC, sono stati totalmente prevenuti dal DPI o dall'NSC23766, dimostrando il coinvolgimento delle attività RBC-NOX e Rac-GTPasi nello stress ossidativo indotto dal 7-KC. Al contrario, la pre-incubazione delle cellule con DPI non ha influenzato la produzione di specie ossidanti né la susseguente esposizione di PS sul versante esterno della membrana indotta dal trattamento con il TRIOLO; la pre-incubazione con NSC23766 ha invece inibito la produzione di RONS da TRIOLO del 27% (Fig.15, A), senza influenzare l'esternalizzazione di PS (Fig.15, B). Complessivamente, questi risultati hanno evidenziato un parziale coinvolgimento della Rac-GTPasi nella produzione di specie ossidanti da parte del TRIOLO, che è apparsa invece indipendente dalla NOX. La proteina chinasi C (PKC) può modulare l'attivazione della NOX in molti tipi di cellule [66] e un certo numero di eventi nei globuli rossi tra cui l'esternalizzazione della PS sulla membrana [67]. È stato dimostrato che diverse isoforme di PKC sono

espresse in eritrociti umani, tra cui l'isoforma atipica calcio indipendente PKC ζ [68]. La traslocazione dal citosol alla membrana è cruciale per l'attivazione delle PKC, inclusa l'isoforma ζ [69, 70]. In Figura 15, C sono riportati i risultati dell'analisi Western blot della PKC ζ nei globuli rossi trattati per 1 ora con gli ossisteroli. I dati ottenuti mostrano che il 7-KC, ma non il TRIOLO, induce la migrazione dell'enzima nella membrana e suggeriscono che la PKC ζ fa parte della via di segnalazione che porta all'attivazione dell'RBC-NOX dipendente da 7-KC. L'attività di PKC indipendenti dal Ca⁺², come la PKC ζ , può essere regolata dall'associazione con alcuni fattori di segnalazione così come dall'interazione con proteine scaffold [69, 71]. Il 7-KC si inserisce nel doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare in modo peculiare [72]. Così l'attivazione della PKC ζ da parte del 7-KC osservata in questo e in altri studi [73] potrebbe avvenire mediante l'interazione con specifici scaffold proteici possibilmente durante il suo inserimento all'interno di microdomini di membrana, specializzati nel controllare l'attivazione degli enzimi. A tal proposito è interessante notare che l'acido lisofosfatidico, un fosfolipide endogeno che modula l'organizzazione del doppio strato fosfolipidico di membrana [74], è in grado di indurre la traslocazione sulla membrana della PKC ζ nei globuli rossi umani [75]. D'altra parte, i nostri risultati rivelano che il TRIOLO, il quale assume una posizione nel doppio strato di membrana notevolmente diversa rispetto al 7-KC [76, 77], non ha indotto l'attivazione della PKC ζ (Fig.15, C). L'attivazione di Rac-GTPasi da parte di PKC dipendenti dal calcio o atipiche è stata osservata in vari tipi di cellule in percorsi di segnalazione non correlati all'attivazione della NOX [78-80]. In un altro studio è stato osservato che l'inibizione delle Rho-GTPasi bloccava la traslocazione sulla membrana e l'attivazione della PKC ζ [81], indicando che la PKC ζ potrebbe anche essere un effettore a valle delle Rho-GTPasi nella via di segnalazione dipendente dal 7-KC. Per individuare la collocazione della PKC ζ , a monte o a valle della Rac, abbiamo indagato l'attivazione della PKC ζ stimolata dal 7-KC in presenza di NSC23766. Come mostrato in Figura 15, C, il pre-trattamento dei globuli rossi con l'inibitore della Rac non ha influenzato la traslocazione della chinasi nella membrana, indicando che l'attivazione della PKC ζ indotta da 7-KC avviene in modo indipendente e non subordinata all'attivazione della Rac. Alla luce di questo risultato, la PKC ζ può essere posizionata a monte o in parallelo alla Rac-GTPasi nella via di segnalazione che porta all'attivazione di RBC-NOX stimolata dal 7-KC. Nelle cellule

falciformi è stato individuato un percorso di attivazione simile per l'RBC-NOX in cui una proteina Rac è attivata da una PKC calcio-dipendente [13]. Si potrebbe ipotizzare che le PKC atipiche come la PKC ζ possano svolgere una funzione equivalente nella regolazione della proteina Rac laddove il calcio intracellulare non sia critico per la sua attivazione.

4.2 Il TRIOLO attiva l'RBC-NOS

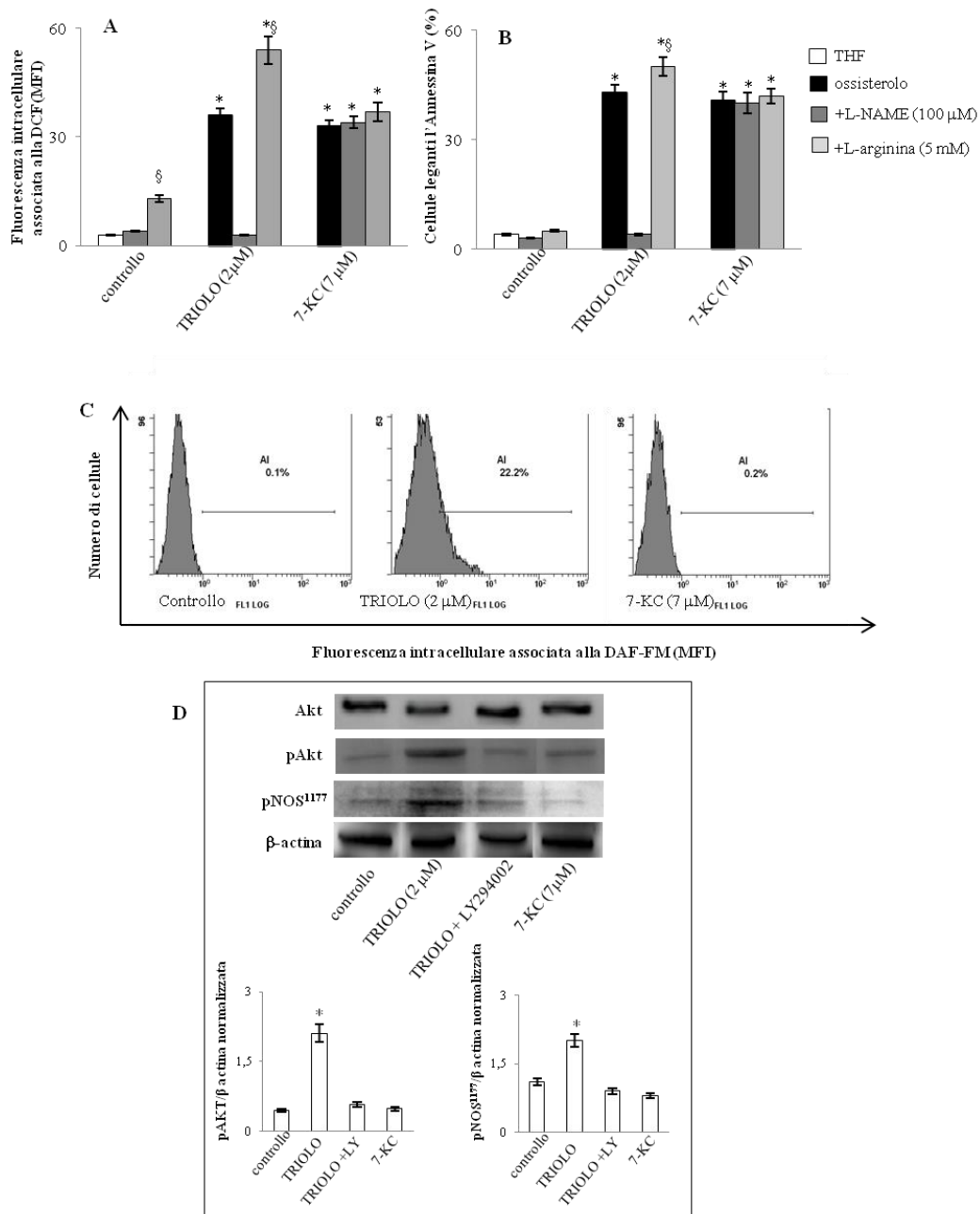


Fig.16. L'azione del TRIOLO è mediata dall'attivazione dell'RBC-NOS attraverso la via di segnalazione PI3Pchinasi-Akt. Effetto dell'inibizione o dell'attivazione della NOS con L-NAME o con L-arginina rispettivamente, sulla formazione di RONS (A) e sull'esternalizzazione della PS (B) indotta dagli ossisteroli. I dati graficamente rappresentati sono la media \pm SD (n=6) della fluorescenza intracellulare associata alla DCF MFI (intensità media di fluorescenza) e della fluorescenza cellulare associata all'Annexina V-FITC misurata rispettivamente dopo 2h o 24h di trattamento con gli ossisteroli in RBC precedentemente incubati per 1h in presenza dell'inibitore, dell'attivatore o del solvente (controllo). Sia gli RBC trattati con gli ossisteroli che gli RBC controllo sono stati incubati con la sonda fluorescente DAF-FM per 2h prima di effettuare la misurazione della

fluorescenza associata alla DAF-FM (C). L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti separati, eseguiti in duplicato, con risultati comparabili. Analisi Western blot con analisi densitometrica delle bande proteiche separate negli RBC incubati per 1h con il sovente (controllo) o con gli ossisteroli (colonne 2,4) o pretrattati per 1h con LY294002 prima del trattamento con TRIOLO (colonna 3). La β actina è stata usata come controllo interno. L'immagine è rappresentativa di 4 esperimenti separati. *Significativamente diverso rispetto al controllo ($P < 0.0001$); § significativamente diverso rispetto ai campioni preincubati senza l'inibitore ($P < 0.0001$). Le comparazioni statistiche sono state eseguite con il software Instat-3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), utilizzando il test one-way Anova seguito dal test post hoc di Bonferroni.

L'ossido nitrico, enzimaticamente prodotto dall'ossido nitrico sintasi endoteliale, durante la conversione dell'amminoacido L-arginina in citrullina in presenza di diversi cofattori, è un importante mediatore della funzione endoteliale, noto da tempo come "endothelium-derived relaxing factor". Svolge un ruolo fondamentale nel controllo del tono vascolare e del flusso sanguigno e rappresenta un fattore di segnalazione cruciale nel sistema cardiovascolare. Recentemente è stato dimostrato che non solo le cellule dell'endotelio vasale ma anche i globuli rossi svolgono un ruolo attivo nel controllo della biodisponibilità sistemica di NO e del tono vascolare in quanto esprimono un ossido nitrico sintasi funzionale, l'isoforma 3, localizzata sul versante citoplasmatico della membrana [15]. Per studiare il coinvolgimento dell'RBC-NOS nello stress ossidativo indotto dagli ossisteroli, i globuli rossi sono stati pre-incubati con il profarmaco inibitore dell'ossido nitrico sintasi L-NAME o con il suo substrato L-arginina. I risultati di questi esperimenti sono rappresentati in Figura 16 (A, B). Né il pre-trattamento con L-NAME né con L-arginina hanno influenzato la produzione di specie ossidanti (Fig.16, A) e l'esternalizzazione della PS indotta da 7-KC (Fig.16, B), indicando che l'RBC-NOS non ha alcun ruolo nell'attività del 7-KC. Al contrario, la pre-incubazione con L-NAME ha abrogato la produzione di RONS (Fig.16, A) e l'esternalizzazione di PS (Fig.16, B) indotta dal TRIOLO. Inoltre la pre-incubazione con L-arginina ha determinato la sovrapproduzione di RONS (Fig.16, A) ed incrementato l'attività eriptotica dell'ossisterolo (Fig.16, B). Infine, l'impiego della DAF-FM come sonda per la misura dell'NO intracellulare ci ha permesso di osservare un incremento di fluorescenza intracellulare associata alla produzione del monossido d'azoto esclusivamente nei globuli rossi trattati con TRIOLO, come mostrato in Figura 16, C. L'attività dell'RBC-NOS può essere controllata da interazioni con proteine regolatorie e dalla fosforilazione di vari residui di serina, treonina e tirosina [15, 82,

83]. In particolare, l'enzima viene attivato mediante fosforilazione del suo residuo Ser¹¹⁷⁷ da Akt, la cui attivazione è a sua volta mediata da PI3K [15, 83]. Pertanto il grado di fosforilazione di Akt (pAkt) e dell'RBC-NOS (p-NOS¹¹⁷⁷) è stato valutato mediante analisi Western blot, 1 ora dopo il trattamento dei globuli rossi con gli ossisteroli. I dati riportati in Figura 16, D, mostrano che, in confronto ad RBC non trattati (controllo), il trattamento con il TRIOLO ha determinato un netto incremento dei livelli di pAkt e p-NOS¹¹⁷⁷. Inoltre, la pre-incubazione con LY294002, uno specifico inibitore dell'PI3K, ha completamente prevenuto la fosforilazione di Akt e di RBC-NOS stimolata dal TRIOLO, come ulteriore indicazione dell'associazione funzionale tra il TRIOLO e l'asse di segnalazione PI3K / Akt. Coerentemente con i risultati sopra riportati (Fig.16, A, B), il 7-KC invece non ha promosso la fosforilazione di nessuno dei due enzimi (Fig. 16, D).

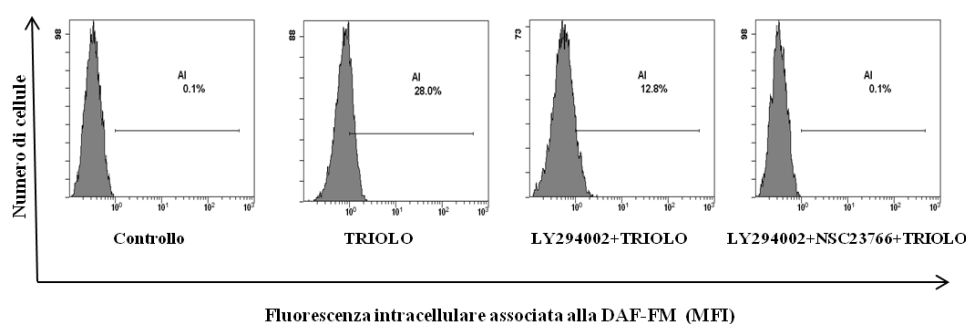


Fig.17. **La contemporanea inibizione della PI3Pchinasi e della Rac-GTPasi azzerava la produzione di NO indotta dal TRIOLO negli RBC.** Fluorescenza intracellulare associata alla DAF-FM misurata dopo 2h di trattamento con TRIOLO degli RBC precedentemente incubati per 1h in assenza o in presenza di LY294002 (20 μ M) o di LY294002 (20 μ M) e NSC23766 (500 μ M). L'immagine è rappresentativa di 3 esperimenti separati, eseguiti in duplicato, con risultati comparabili.

Per meglio comprendere il meccanismo di trasduzione del segnale che porta all'attivazione dell'RBC-NOS da parte del TRIOLO è stata valutata la produzione di monossido d'azoto nei globuli rossi trattati con l'ossisterolo e preincubati con LY294002 (inibitore della del PI3K) o con LY294002 + NSC23766 (l'inibitore della RAC-GTPasi). Dall'analisi citofluorimetrica della produzione di NO rappresentata in Figura 17, abbiamo osservato che LY294002 ha causato una riduzione significativa ma non totale della fluorescenza intracellulare associata alla DAF-FM misurata nei globuli rossi trattati con TRIOLO, suggerendo una via di attivazione parallela per

l'RBC-NOS. L'impiego simultaneo di LY294002 e NSC23766 ha invece prevenuto totalmente la produzione di NO indotta da TRIOLO, indicando una duplice regolazione dell'enzima. Non soltanto l'asse di segnalazione PI3K / Akt ma anche la Rac-GTPasi contribuisce alla piena attivazione dell'RBC-NOS ed alla produzione di NO indotta dal TRIOLO negli eritrociti, coerentemente con gli esperimenti complementari descritti nella Figura 15 (A, B). La dipendenza da PI3K / Akt nell'attivazione dell'eNOS stimolata dal TRIOLO è stata osservata anche nelle cellule endoteliali [60]. Il coinvolgimento di una Rac-GTPasi nell'attivazione dell'RBC-NOS indotta dal TRIOLO è stata invece riportata per la prima volta in questo studio. La produzione di NO osservata in presenza dell'inibitore della PI3K suggerisce inoltre che la Rac-GTPasi stimolata dal TRIOLO attiva un RBC-NOS non fosforilata da Akt. A tal riguardo in altri studi è stato osservato che le interazioni fisiche tra Rac-GTPasi con varie isoforme NOS provocano l'attivazione dell'enzima [84-87]. La coregolazione di NOS e NOX costitutive da parte di Rac-1 GTPasi è stata inoltre dimostrata nelle cellule endoteliali [88]. Contrariamente a quanto riportato in altri studi, tuttavia, i nostri risultati mostrano che gli eritrociti trattati con il 7-KC non generavano specie ossidanti quando pre-incubati con DPI, un inibitore della NOX che blocca il funzionamento dell'enzima a valle dell'attivazione della Rac, indicando che la Rac-GTPasi attivata dal 7-KC non aveva stimolato l'attività dell'RBC-NOS. Si potrebbe pensare che i cambiamenti chimico-fisici apportati alla membrana degli RBC dal 7-KC, ma non dal TRIOLO [72, 77], possano aver impedito le interazioni tra la stessa Rac-GTPasi e l'RBC-NOS. Quest'ultima ipotesi potrebbe essere supportata da altri studi in cui è stato osservato come l'attività della Rac-1 possa essere regolata da sollecitazioni meccaniche sulla membrana e dalle variazioni della fluidità della membrana [89, 90].

4.3 Il TRIOLO induce l'ossidazione dell'emoglobina e perdita dell'eme

Tabella 1. Contenuto delle forme ossidate dell'emoglobina (Hb) e dell'Eme in RBC trattati con gli ossisteroli

	HbO ₂	MetHb (μ M)	Emicromo	Eme (% del controllo)
Controllo	59.00 \pm 1.58 ^a	1.48 \pm 0.34 ^a	n.d.	100 ^a
7-KC (7 μ M)	59.07 \pm 2.23 ^a	1.71 \pm 0.33 ^a	n.d.	98.34 \pm 1.13 ^a
TRIOLO (2 μ M)	50.40 \pm 2.07 ^b	2.90 \pm 0.16 ^b	n.d.	88.43 \pm 2.24 ^b

I dati rappresentati sono la media \pm SD di cinque esperimenti separati. I valori presenti in una stessa colonna i cui apici sono contrassegnati da lettere differenti presentano una differenza significativa ($P < 0.0001$) (Anova seguito dal test post hoc di Bonferroni). n.d.

La produzione di Met-Hb e O₂^{•-} per auto-ossidazione di HbO₂, tenuta sotto controllo dalla superossido dismutasi (SOD) e da reductasi specifiche, rappresenta la fonte piú abbondante di specie reattive nei globuli rossi senescenti quando le difese antiossidanti delle cellule diminuiscono e il danno ossidativo si va accumulando [10]. Non solo le specie ossidanti/nitrosative prodotte per via enzimatica ma anche i prodotti di ossidazione dell'emoglobina possono contribuire allo squilibrio redox indotto da 7-KC o da TRIOLO negli RBC. Per indagare l'effetto del 7-KC o del TRIOLO sullo stato di ossidazione dell'emoglobina i globuli rossi incubati in assenza (controllo) o in presenza di ossisteroli, sono stati analizzati spettrofotometricamente a 560, 577 e 630 nm, ovvero in corrispondenza dei picchi di assorbimento dell'emicromo in miscela con ossi- e meta-emoglobina, dell'HbO₂ e della Met-Hb rispettivamente, seguendo l'algoritmo calcolato da Winterbourn [64]. La Tabella 1 riporta i livelli di HbO₂, Met-Hb ed emicromo, nonché la quantità di eme, misurati nelle cellule dopo un periodo di incubazione di 24 ore in presenza di 7-KC o TRIOLO. Il 7-KC non ha modificato la quantità totale né lo stato di ossidazione dell'emoglobina rispetto ai globuli rossi controllo. Il TRIOLO, invece, ha causato delle variazioni nello spettro di assorbimento che indicano una significativa riduzione di HbO₂ con un concomitante aumento di Met-Hb (Tabella 1). In nessun caso è stata

osservata la formazione di emicromo. Il trattamento con TRIOLO (Tabella 1) ha però determinato la perdita di eme, coerentemente con l'effetto emolitico riportato per questo ossisterolo nel nostro precedente studio [61]. Questi risultati hanno suggerito che mentre il 7-KC non ha influenzato l'equilibrio redox dell'Hb, lo stress nitrosativo generato dalla stimolazione dell'RBC-NOS da parte del TRIOLO ha invece provocato la formazione di metaemoglobina e perdita dell'eme. La presenza di una RBC-NOS funzionale è stata a lungo dibattuta soprattutto per ciò che concerne il suo significato patofisiologico. L'RBC-NOS umano è scarsamente attiva in condizioni fisiologiche [18]. L'attivazione fluttuante e reversibile dell'enzima da parte di stimoli fisiologici come un aumento dello shear stress, direttamente correlato con il flusso e la velocità del sangue, può determinare il rilascio di quantità moderate di NO [18, 19]. L'NO prodotto a livello eritrocitario potrebbe tuttavia dare rapidamente luogo ad una reazione irreversibile di deossigenazione con l'HbO₂, per formare Met-Hb e NO₃, limitando così l'NO disponibile. Le perplessità sul significato funzionale dell'RBC-NOS sono principalmente dovute al fatto che i globuli rossi contengono elevate concentrazioni di emoglobina ossigenata che rappresenta uno scavenger altamente efficiente di NO. Data l'importante funzione cardioprotettiva e regolatoria sull'omeostasi vascolare del monossido d'azoto, è di cruciale importanza capire come l'NO formato dagli RBC possa sfuggire alla reazione di deossigenazione con HbO₂ e quale sia il suo ruolo nella fisiopatologia umana [18]. Di certo gli RBC assumono un ruolo determinante nel bilancio tra la produzione e l'eliminazione dell'ossido nitrico, influenzandone la biodisponibilità e l'azione di controllo vasomotorio. In uno studio condotto da Lang [91], è stata esplorata l'influenza dell'NO nel processo eritotico ed è stato osservato che mentre piccole quantità di NO prevengono l'eritrosi, l'NO in eccesso stimola la morte programmata degli eritrociti. A tale proposito, in seguito alla sovrapproduzione di NO possono verificarsi scenari alquanto diversi negli RBC. L'NO può indurre l'auto-ossidazione di Hb combinandosi spontaneamente con O₂⁻ in una reazione che avviene, anche in presenza di SOD, a velocità costante [10, 92]. Questa reazione a sua volta provoca un aumento di Met-Hb e genera perossinitrito [18], un potente agente ossidante e nitrante [93], che può in fine causare eritrosi. È stato riportato che lo stress ossidativo causato dagli ossisteroli negli RBC induceva l'inibizione dell'ammino-fosfolipide traslocasi (APLT), provocando un aumento della PS all'esterno della membrana [61]. Oltre che da prodotti di ossidazione cellulari

come i lipoperossidi [61, 94], l'APLT è inibita dallo stress nitrosativo [95]. Inoltre, l'ossi-Hb, la desossi-Hb e la meta-Hb possono sequestrare efficacemente l'ossido nitrico e i perossinitriti [96-98], dando luogo alla formazione di specie nitrosilate e ossidate con accumulo finale di meta-Hb [97, 99]. Infine, la sovrapproduzione di NO e il danno ossidativo alle proteine di membrana possono determinare la perdita di eme osservata nei nostri esperimenti. A sostegno di questa ipotesi, è già noto che il perossinitrito può provocare emolisi di globuli rossi umani [100] e che lo shear stress, che notoriamente determina l'attivazione dell'RBC-NOS [101], può provocare emolisi quando le cellule sono esposte a sollecitazioni meccaniche ripetute e di intensità superiore rispetto alla fisiologica sollecitazione provocata dallo scorrimento del sangue sulle pareti dei vasi sanguigni [102].

4.4 7-KC, TRIOLO e XOR

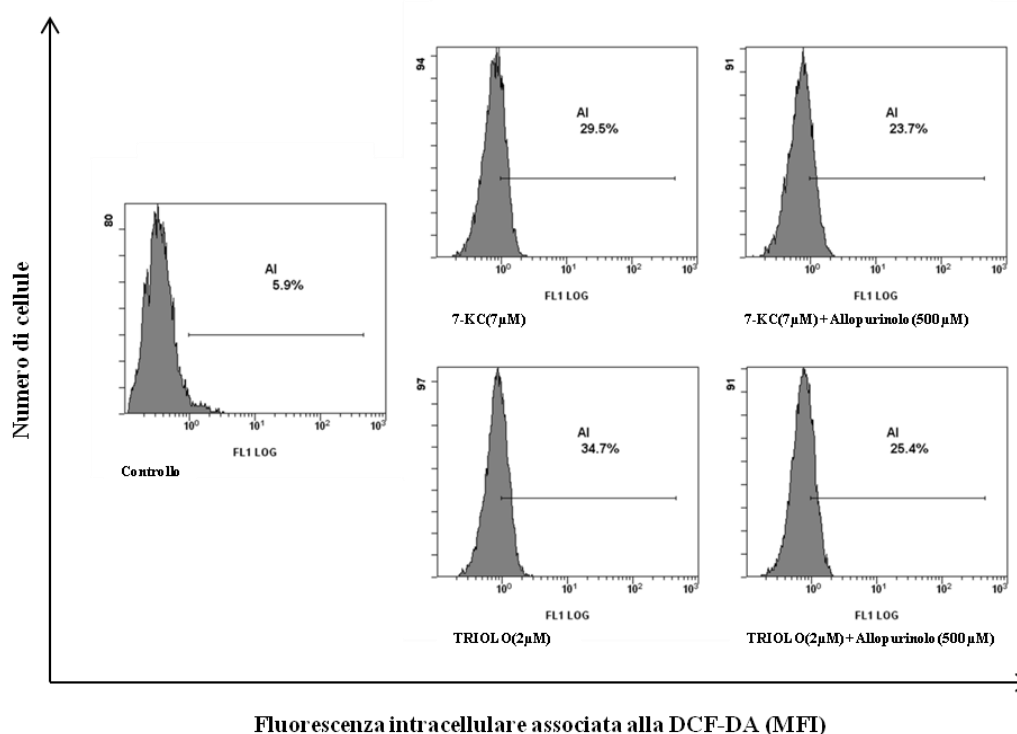


Fig.18. L'inibizione della XOR con allopurinolo riduce parzialmente la produzione di RONS indotta dal TRIOLO o dal 7-KC negli RBC. Fluorescenza intracellulare associata alla DCF-DA misurata dopo 2h di trattamento con TRIOLO o 7-KC degli RBC precedentemente incubati per 1h in assenza o in presenza di allopurinolo (500 µM). L'immagine è rappresentativa di 3 esperimenti separati, eseguiti in duplicato, con risultati comparabili.

La xantina ossidoreduttasi è un enzima della membrana dei globuli rossi, e più in generale dei tessuti di mammiferi, presente in due forme interconvertibili: una, predominante, ad attività deidrogenasica, l'altra ad attività ossidasica che produce ROS. Anche la XOR potrebbe supportare lo stress ossidativo generato dal 7-KC o dal TRIOLO. Le specie ossidanti o nitrosative prodotte in seguito alla stimolazione dell'RBC-NOX da parte del 7-KC o dell'RBC-NOS da parte del TRIOLO potrebbero infatti indurre la conversione dell'enzima dalla forma ad attività deidrogenasica (NAD⁺ dipendente) alla forma ad attività ossidasica portando alla formazione di O₂^{•-} e H₂O₂ [103, 104]. La pre-incubazione dei globuli rossi con l'inibitore farmacologico della XOR, allopurinolo, ha significativamente ridotto del 20% la produzione di specie ossidanti, misurate dalla fluorescenza associata alla DCF-DA nei globuli rossi trattati con 7-KC o TRIOLO. Questo risultato indica un contributo della XOR all'attività pro-ossidante di entrambi gli ossisteroli (Fig. 18). Dall'osservazione che la produzione di specie reattive dipendente dal 7-KC o TRIOLO è totalmente prevenuta in presenza di DPI o L-Name rispettivamente, è possibile dedurre che solamente l'RBC-NOX e l'RBC-NOS sono attivate dagli ossisteroli. Questi dati hanno evidenziato che, nel nostro modello sperimentale, l'attività della XOR è subordinata all'attivazione dell'RBC-NOX indotta dal 7-KC o dell'RBC-NOS da parte del TRIOLO.

4.5 7-KC e TRIOLO in combinazione inducono la simultanea attivazione di RBC-NOX e RBC-NOS

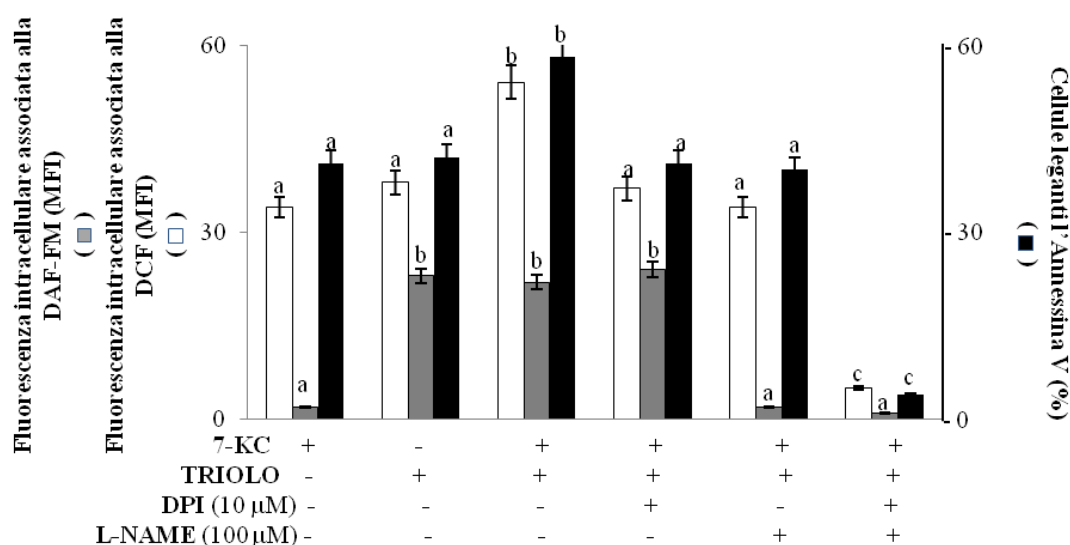


Fig.19. **TRIOLO e 7-KC saggiati in combinazione, attraverso la distinta stimolazione dell'RBC-NOS e dell'RBC-NOX inducono la simultanea attivazione dei due enzimi.** La misura della fluorescenza intracellulare associata alla DAF-FM o alla DCF (colonne grigie e bianche, rispettivamente) e dell'esposizione della PS (colonne nere) è stata eseguita rispettivamente dopo 2h e 24h di trattamento con TRIOLO (2 μM) o 7-KC (7μM) o entrambi degli RBC precedentemente incubati per 1h in assenza o in presenza di DPI o L-NAME o entrambi. I dati graficamente rappresentati sono la media ± SD di tre esperimenti separati eseguiti in duplicato. Per ciascuna misurazione i valori indicati con lettere differenti risultano essere significativamente differenti (P<0.0001) (one-way Anova seguito dal test post hoc di Bonferroni).

In questo studio abbiamo indagato il meccanismo alla base della citotossicità del 7-KC o TRIOLO investigati individualmente in concentrazioni di rilevanza patofisiologica. In una condizione ipercolesterolemica *in vivo*, i due ossisteroli agirebbero simultaneamente sui globuli rossi circolanti. Per questo motivo abbiamo voluto ampliare la nostra indagine per valutare se, ed eventualmente in che misura, la tossicità degli ossisteroli, in termini di produzione di ROS / RONS e la conseguente risposta eriptotica fosse differente in RBC trattati con 7-KC e TRIOLO in combinazione. Le analisi citofluorimetriche sono state quindi eseguite in presenza di entrambi gli ossisteroli, senza o con pre-incubazione degli eritrociti con DPI o L-NAME. La produzione di specie ossidanti misurate dalla fluorescenza associata alla DCF-DA osservate nelle cellule trattate simultaneamente con 7-KC e TRIOLO era significativamente superiore a quella misurata in presenza dei singoli ossisteroli,

mentre la formazione di NO era corrispondente a quella osservata in presenza di TRIOLO da solo (Fig. 19). In confronto agli eritrociti incubati con 7-KC e TRIOLO, la pre-incubazione delle cellule con L-NAME ha notevolmente ridotto la fluorescenza associata al DCF-DA del 38% ed ha abolito la produzione di NO, mentre la pre-incubazione con DPI ha determinato una diminuzione delle specie ossidanti superiore al 30%, mantenendo inalterata la produzione di NO (Fig. 19). Infine, la pre-incubazione con entrambi gli inibitori ha completamente abolito la produzione di RONS e di NO (Fig. 19). Questi dati indicano che 7-KC e TRIOLO non subiscono influenze reciproche nell'attivazione individuale di RBC-NOX e di RBC-NOS, rispettivamente. Infatti, il trattamento con i due ossisteroli in combinazione determina una produzione di specie ossidanti che appare equivalente all'effetto risultante dalla simultanea attivazione di RBC-NOX e RBC-NOS. Il numero di cellule che legano l'Annessina V dopo l'incubazione con 7-KC e TRIOLO era significativamente più elevato di quello misurato in presenza dei singoli ossisteroli; inoltre, l'esternalizzazione della PS misurata negli eritrociti trattati con entrambi gli ossisteroli è stata ridotta del 30% e del 32% quando le cellule erano pre-incubate con L-NAME o DPI, rispettivamente, ed è stata annullata quando i due inibitori erano entrambi presenti nel mezzo di coltura (Fig. 19). Quindi lo stress ossidativo e la risposta eriptotica risultanti dall'azione combinata di 7-KC e TRIOLO nei globuli rossi possono essere considerati come conseguenza dell'effetto di entrambi gli ossisteroli sull' RBC-NOX e sull'RBC-NOS. Questi risultati approfondiscono nostri studi precedenti riguardanti l'eriptosi *in vitro* di globuli rossi isolati e trattati con una miscela di ossisteroli che simulava una condizione di ipercolesterolemia, o di globuli rossi contenuti in sangue umano incubato *ex vivo* con la miscela [61]. In questo contesto i nostri risultati concorrono a spiegare l'incrementata eriptosi recentemente osservata in pazienti dislipidemicici [105].

5.CONCLUSIONE

Il nostro studio dimostra che gli ossisteroli 7-KC e TRIOLO, in quantità patofisiologiche, inducono eriptosi dipendente da stress ossidativo/nitrosativo, ciascuno attraverso meccanismi diversi e percorsi molecolari distinti. L'attività del 7-KC è mediata dall'attivazione dell'RBC-NOX, dipendente dalla Rac-GTPasi e dalla PKC ζ . L'azione del TRIOLO è invece dipendente dalla stimolazione di RBC-NOS attraverso la via di segnalazione PI3K / Akt, con aggiuntiva stimolazione dell'enzima da parte di una Rac-GTPasi. In entrambi i casi è stata osservata l'attività supplementare della XOR. Lo stress nitrosativo indotto dal TRIOLO può spiegare l'ossidazione di Hb osservata con accumulo di Met-Hb e presumibilmente il danno alla membrana con debole emolisi e perdita di eme. Quando il 7-KC e il TRIOLO agiscono in combinazione, come accade in una condizione di ipercolesterolemia, i due ossisteroli non si influenzano nell'attivare ciascuno il proprio bersaglio enzimatico e la simultanea stimolazione dell'RBC-NOX e dell'RBC-NOS conduce alla produzione di ROS / RONS e causa eriptosi. È noto che gli ossisteroli inducono la produzione di ROS stimolando l'NADPH ossidasi. I nostri risultati mostrano l'attivazione diretta degli enzimi attraverso eventi molecolari strettamente connessi a livello delle membrane plasmatiche. Molte delle attività biologiche degli ossisteroli possono essere ricondotte alle loro proprietà biofisiche ed all'interazione con i lipidi di membrana e / o le componenti proteiche [76, 77]. In questo contesto, con la conoscenza che l'RBC-NOX e l'RBC-NOS possono essere attivati da forze fisiche e meccaniche esercitate sulla membrana [101, 106, 107] è abbastanza ragionevole ipotizzare che 7-KC e TRIOLO possano indurre l'attivazione di questi enzimi apportando alterazioni fisico-chimiche di alcune porzioni della membrana eritrocitaria. L'organizzazione funzionale dei due ossisteroli e dei loro effettori in differenti micro-domini di membrana [77] può essere essenziale per attivare separatamente RBC-NOX e RBC-NOS [108-110]. Tuttavia, i meccanismi molecolari che consentono al 7-KC e al TRIOLO, da soli o in combinazione, di attivare selettivamente specifiche proteine di distinte vie di segnalazione nei globuli rossi rimangono aperti a studi futuri.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Repsold L, Joubert AM.: Eryptosis: an erythrocyte's suicidal type of cell death. *Biomed Res. Int.* 2018;2018,9405617.
2. Qadri SM, Bissinger R, Solh Z & Oldenborg PA: Eryptosis in health and disease: a paradigm shift towards understanding the (patho)physiological implications of programmed cell death of erythrocytes. *Blood Rev.*2017;31(6):349-361.
3. Parthasarathi K, Lipowsky HH: Capillary recruitment in response to tissue hypoxia and its dependence on red blood cell deformability. *Am J Physiol.* 1999;277(6):H2145-57.
4. Pretorius E, du Plooy JN, Bester J: A comprehensive review on eryptosis. *Cell Physiol Biochem.* 2016;39(5):1977-2000.
5. Chabanel A, Flamm M, Sung KL, Lee MM, Schachter D, Chien S: Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. *Biophys J.* 1983;44(2):171-176.
6. Sridharan M, Adderley SP, Bowles EA, Egan TM, Stephenson AH, Ellsworth ML, Sprague RS: Pannexin 1 is the conduit for low oxygen tension-induced ATP release from human erythrocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299(4):H1146-52
7. Lutz HU and Bogdanova A: Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. *Front Physiol.* 2013;4:387.
8. Aslan M, Thornley-Brown D, Freeman BA: Reactive Species in Sickle Cell Disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:375-91.
9. Dincer Y, Akcay T, Alademir Z, Ilkova H: Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* 2002;51(10):1360-2.
10. Kuhn V, Diederich L, Stevenson Keller TCS, Kramer CM, Lückstädt W, Panknin C, Suvorava T, Isakson BE, Kelm M, Cortese-Krott MM: Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antiox. & Red. Sign.* 2017;26(13):718-742.

11. Voskou S, Aslan M, Fanis P, Phylactides M, Kleanthous M: Oxidative stress in beta-thalassaemia and sickle cell disease. *Redox Biol.* 2015;6:226-239.
12. Rifkind JM, Mohanty JG, Nagababu E: The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. *Front Physiol.* 2015;5:500.
13. George A, Pushkaran S, Diamantis G, Kostantinidis G, Koochaki S, Malik P, Mohandas N, Zheng Y, Joiner CH, and Kalfa TA: Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. *Blood* 2013;121:2099-2107.
14. Brandes RP, Weissmann N, and Schröder K: Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radical Biol Med.* 2014;76:208-226.
15. Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Ozüyaman B, Schnürch HG, Gödecke A, Weber AA, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rösen P, and Kelm M: Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 2006;107:2943-2951.
16. Cortese-Krott MM, Rodriguez-Mateos A, Sansone R, Kuhnle GG, Thasian-Sivarajah S, Krenz T, Horn P, Krisp C, Wolters D, Heiss C, Kroncke KD, Hogg N, Feelisch M, Kelm M: Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease *Blood* 2012;120:4229-4237.
17. Eligini S, Porro B, Lualdi A, Squellerio I, Veglia F, Chiorino E, Crisci M, Garlasche A, Giovannardi M, Werba JP, Tremoli E, Cavalca V: Nitric oxide synthetic pathway in red blood cells is impaired in coronary artery disease. *PLoS One.* 2013;8(8):e66945.
18. Cortese-Krott MM, and Kelm M: Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: Key to a new erythrocrine function? *Redox Biol.* 2014;2:251-8.
19. Ozüyaman B, Grau M, Kelm M, Merx MW, and Kleinbongard P: RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects. *Trends Mol Med.* 2008;14(7):314-22.
20. Helms C, Kim-Shapiro DB: Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling. *Free Radic Biol Med.* 2013;61:464-72.

21. Sridharan M, Adderley SP, Bowles EA, Egan TM, Stephenson AH, Ellsworth ML, Sprague RS: Pannexin 1 is the conduit for low oxygen tension-induced ATP release from human erythrocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(4):H1146-52.
22. Webb A, Milsom AB, Rathod KS, Chu WL, Qureshi S, Lovell MJ, Lecomte FMJ, Perrett D, Raimondo C, Khoshbin E, Ahmed Z, Uppal R, Benjamin N, Hobbs A, and Ahluwalia A: Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to nitric oxide in hypoxia. Role for xanthine oxidoreductase and endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res*. 2008;103(9): 957-964.
23. Harrison R: Structure and Function of Xanthine Oxidoreductase: Where are we now? *Free Radic Biol Med*. 2002;33(6):774-97.
24. Battelli MG, Polito L, Bortolotti M, Bolognesi A: Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:3527579.
25. Battelli MG, Bolognesi A, Polito L.: Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: new emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(9):1502-17.
26. Dai Y, Cao Y, Zhang Z, Vallurupalli S, Mehta JL. Xanthine oxidase induces foam cell formation through LOX-1 and NLRP3 activation. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2017;31(1):19-27.
27. Lutz HU and Bogdanova A: Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. *Front Physiol*. 2013;4:387.
28. Badior KE, Casey JR.: Molecular mechanism for the red blood cell senescence clock. *IUBMB Life*. 2018;70(1):32-40.
29. Pretorius E, Olumuyiwa-Akeredolu O O, Mbotwe S, Bester J: Erythrocytes and their role as health indicator: Using structure in a patient-orientated precision medicine approach. *Blood Rev*. 2016;30(4):263-74.

30. Lang E, Lang F: Triggers, Inhibitors, Mechanisms, and Significance of Eryptosis: The Suicidal Erythrocyte Death. *Biomed Res Int.* 2015;2015:513518.
31. Lang E, Lang F: Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;39:35-42.
32. Bonomini M, Pandolfi A, Sirolli V, Arduini A, Di Liberato L, Di Pietro N: Erythrocyte Alterations and Increased Cardiovascular Risk in Chronic Renal Failure. *Nephrol Mon.* 2017;9(3):e45866.
33. Bissinger R, Bhuyan AAM, Qadri SM, Lang F: Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases. *FEBS J.* 2019;286(5):826-854.
34. Gill S, Chow R, Brown AJ: Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised. *Prog Lipid Res.* 2008;47(6):391-404.
35. Brown AJ, Jessup W: Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol Aspects Med.* 2009;30(3):111-22.
36. Otaegui-Arrazola A, Menéndez-Carreño M, Ansorena D, Astiasarán I: "Oxysterols: a world to explore," *Food and Chemical Toxicology* 2010;48:3289-3303.
37. Korytowski W, Bachowski GJ, Girotti AW: Photoperoxidation of cholesterol in homogeneous solution, isolated membranes, and cells: comparison of the 5 α - and 6 β -hydroperoxides as indicators of singlet oxygen intermediacy. *Photochem Photobiol.* 1992;56(1):1-8.
38. Lordan S, J.J. Mackrill J.J, O'Brien N.M.: Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative diseases. *J Nutr Biochem.* 2009;20(5):321-36.
39. Lütjohann D, Breuer O, Ahlborg G, Nennesmo I, Sidén A, Diczfalusy U, Björkhem I: Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent

flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(18):9799-804.

40. Zarrouk A, Vejuxa A, Mackrilld J, O'Callaghan Y, Hammami M, O'Brien N, Lizard G: Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing Res Rev*. 2014;18:148-62.

41. Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B: Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev*. 2000;14(22):2831-8.

42. Zelcer N, Tontonoz P: Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest*. 2006;116(3):607-14.

43. Tontonoz P, Mangelsdorf DJ: Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol*. 2003;17(6):985-93.

44. Töröcsik D, Szanto A, Nagy L: Oxysterol signaling links cholesterol metabolism and inflammation via the liver X receptor in macrophages. *Mol Aspects Med*. 2009;30(3):134-52.

45. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P: Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med*. 2003;9(2):213-9.

46. Kuliga W, Cwiklikc L, Jurkiewicz P, Rog T, Vattulainen I: Cholesterol oxidation products and their biological importance. *Chem Phys Lipids*. 2016;199:144-160.

47. Sottero B, Gamba P, Gargiulo S, Leonarduzzi G, and Poli G: Cholesterol oxidation products and disease: An emerging topic of interest in medicinal chemistry. *Curr Med Chem*. 2009;16(6):685-705.

48. Poli G, Biasi F, and Leonarduzzi G: Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. *Redox Biol*. 2013;1:125-30.

49. Ryan E, Chopra J, McCarthy F, Maguire AR, and O'Brien NM: Qualitative and quantitative comparison of the cytotoxic and apoptotic potential of phytosterol

oxidation products with their corresponding cholesterol oxidation products. *Br J Nutr.* 2005;94(3):443-51.

50. Nishio E, and Watanabe Y: Oxysterols induced apoptosis in cultured smooth muscle cells through CPP32 protease activation and bcl-2 protein downregulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;226(3):928-34.

51. Lemaire S, Lizard G, Monier S, Miguet C, Gueldry S, Volot F, Gambert P, and Neel D: Different patterns of IL-1beta secretion, adhesion molecule expression and apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7alpha-, 7beta-hydroxycholesterol, or 7-ketocholesterol. *FEBS Lett.* 1998;440(3):434-9.

52. Aupeix K, Weltin V, Mejia JE, Christ M, Marchal J, Freyssinet JM, and Bischoff P: Oxysterols-induced apoptosis in human monocytic cell lines. *Immunobiology.* 1995;194(4-5):415-28.

53. O'Callaghan YC, Woods JA, and O'Brien NM: Oxysterol-induced cell death in U937 and HepG2 cells at reduced and normal serum concentrations *Eur J Nutr* 1999;38:255-262.

54. Mascia C, Maina M, Chiarpotto E, Leonarduzzi G, Poli G, and Biasi F: Pro-inflammatory effect of cholesterol and its oxidation products on CaCo-2 human enterocyte-like cells: Effective protection by epigallocatechin-3-gallate. *Free Radic Biol Med* 2010;49:2049-2057.

55. Biasi F, Chiarpotto E, Sottero B, Maina M, Mascia C, Guina T, Gamba P, Gargiulo S, Testa G, Leonarduzzi G, and Poli G: Evidence of cell damage induced by major components of a diet-compatible mixture of oxysterols in human colon cancer CaCo-2 cell line. *Biochimie.* 2013;95(3):632-40.

56. Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E: Oxidative stress and cell signaling. *Curr Med Chem* 2004;11:1163-1182.

57. Vejux A, and Lizard G: Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol Aspects Med* 2009;30:153-170.

58. Testa G, Rossin D, Poli G, Biasi F, Leonarduzzi G: Implication of oxysterols in chronic inflammatory human diseases. *Biochimie* 2018;153:220-231
59. Gargiulo S, Gamba P, Testa G, Sottero B, Maina M, Guina T, Biasi F, Poli G, Leonarduzzi G: Molecular Signaling Involved in Oxysterol-Induced β 1-Integrin Over-Expression in Human Macrophages. *Int J Mol Sci.* 2012;13(11):14278-14293.
60. Liao PL, Cheng YW, Li CH, Lo YL, and Kang JJ: Cholesterol-3-beta, 5-alpha, 6-beta-triol induced PI(3)K-Akt-eNOS-dependent cyclooxygenase-2 expression in endothelial cells. *Toxicol Lett* 2009;190:172-178.
61. Tesoriere L, Attanzio A, Allegra M, Cilla A, Gentile C, and Livrea MA: Oxysterol mixture in hypercholesterolemia-relevant proportion causes oxidative stress-dependent eryptosis. *Cell Physiol Biochem* 2014;34:1075-1089.
62. Sevanian A, Seraglia R, Traldi P, Rossato P, Ursini F, and Hodis H: Analysis of plasma cholesterol oxidation products using gas- and high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Free Radic Biol Med* 1994;17:397-409.
63. Rifkind JM, and Nagababu E: Hemoglobin Redox Reactions and Red Blood Cell Aging. *Antioxid Redox Signal* 2013;18:2274-2283.
64. Winterbourne C: Oxidative reactions of hemoglobin. in Packer L, Glazer AN, Eds. *Methods in Enzymology* 1990;186:265-272.
65. Pick E: Role of the Rho GTPase Rac in the activation of the phagocyte NADPH oxidase. Outsourcing a key task. *Small GTPases* 2014;5:e27952.
66. Schroder K, Weissmann N, Brandes RP: Organizers and activators: Cytosolic Nox proteins impacting on vascular function. *Free Radic Biol Med* 2017;109:22-32.
67. de Jong K, Rettig MP, Low PS, and Kuypers FA: Protein kinase C activation induces phosphatidylserine exposure on red blood cells. *Biochemistry* 2002;41:12562-2567.
68. Govekar, RB, and Zinged SM: Protein kinase C isoforms in human erythrocytes. *Ann Hematol* 2001;80:531-534.

69. Fox TE, Houck KL, O'Neill SM, Nagarajan M, Stover TC, Pomianowski PT, Unal O, Yun JK, Naides SJ, and Kester M: Ceramide recruits and activates PKC ζ within structured membrane microdomains. *J Biol Chem* 2007;285:12450-12457.
70. Hirai T. and Chida K: Protein kinase Czeta (PKCzeta): activation mechanisms and cellular functions. *J Biochem (Tokyo)* 2003;133, 1-7.
71. Tobias I, and Newton AC: Protein scaffolds control localized protein kinase Czeta activity. *J Biol Chem* 2016;291:13809-13822.
72. Massey JB, and Pownall, HJ: Structures of biologically active oxysterols determine their differential effects on phospholipid membranes. *Biochemistry* 2006;45,10747-10758.
73. Larrayoz I M, Huang J-D, Lee JW, Pascual I, and Rodriguez IR: 7-Ketocholesterol-Induced Inflammation: Involvement of Multiple Kinase Signaling Pathways via NF κ B but Independently of Reactive Oxygen Species Formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:4942-4955.
74. Kooijman EE, Chupin V, de Kruijff B, Burger KN: Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *TRAFFIC* 2003;4:162-174.
75. Chung SM, Bae ON, Lim KM, Noh JY, Lee MY, Jung YS, and Chung JH: Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:414-421.
76. Massey JB. Membrane and protein interactions of oxysterols: *Curr Opin Lipidol* 2006;17:296-301.
77. Olkkonen VM, and Hynynen R: Interactions of oxysterols with membranes and proteins. *Mol. Aspects Med* 2009;30:123-133.
78. Elfenbein A, Rhodes JM, Meller J, Schwartz MA, Matsuda M, and Simons M: Suppression of RhoG activity is mediated by a syndecan 4-synectin-RhoGDI1 complex and is reversed by PKC α in a Rac1 activation pathway. *J Cell Biol* 2009;186:75-83.

79. Price LS, Langeslag M, ten Klooster JP, Hordijk PL, Jalink K, and Collard JG: Calcium signaling regulates translocation and activation of Rac. *J Biol Chem* 2003;278:39413-39421.
80. Zhang J Anastasiadis PZ, Liu Y, Thompson A, and Fields AP: Protein Kinase C (PKC) β II Induces Cell Invasion through a Ras/Mek-, PKC α /Rac 1-dependent Signaling Pathway. *J Biol Chem* 2004;279:22118-22123.
81. Laudanna C, Mochly-Rosen D, Liron T, Constantin G, and Butcher EC: Evidence of zeta protein kinase C involvement in polymorphonuclear neutrophil integrin-dependent adhesion and chemotaxis. *J Biol Chem* 1998;273:30306-30315.
82. Fleming I: Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Eur J Physiol* 2010;459:793-806.
83. Mihov D, Vogel J, Gassmann M, and Bogdanova A: Erythropoietin activates nitric oxide synthase in murine erythrocytes *AJP. Cell Physiology* 2009;297:C378-88.
84. Sawada N, Salomone S, Kim H-H, Kwiatkowski DJ, and Liao JK: Regulation of endothelial nitric oxide synthase and postnatal angiogenesis by Rac1. *Circ Res* 2008;103:360-368.
85. Rao GK, and Bender JR: Rac, PAK, and eNOS action. *Circul Res* 2008;103:328-330.
86. Jyoti A, Singh AK, Dubey M, Kumar S, Saluja R, Keshari RS, Verma A, Chandra T, Kumar A, Bajpai VK, Barthwal MK, and Dikshit M: Interaction of Inducible Nitric Oxide Synthase with Rac2 Regulates Reactive Oxygen and Nitrogen Species Generation in the Human Neutrophil Phagosomes: Implication in Microbial Killing. *Antioxid Redox Signal* 2014;20:417-31.
87. Kuncewicz T, Balakrishnan P, Snuggs MB, and Kone BC: Specific association of nitric oxide synthase-2 with Rac isoforms in activated murine macrophages. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281:F326-336.

88. Selvakumar B, Hess DT, Goldschmidt-Clermont PJ, and Stamler JS: Co-regulation of constitutive nitric oxide synthases and NADPH oxidase by the small GTPase Rac. *FEBS Lett*; 2008;582:2195-2202.
89. Tzima E, Del Pozo MA, Kiosses WB, Mohamed SA, Li S, and Schwartz MA: Activation of Rac1 by shear stress in endothelial cells mediates both cytoskeletal reorganization and effects on gene expression. *EMBO J* 2002;21:6791-6800.
90. Shao S, Xiang C, Quin K, Aziz A, Liao X, and Liu B: Visualizing the spatiotemporal map of Rac activation in bovine aortic endothelial cells under laminar and disturbed flows. *PLoS ONE* 2017;12(11):e0189088.
91. Nicolay JP, Liebig G, Niemoeller OM, Koka S, Gheshghacinia M, Wieder T, Haendeler J, Busse R, Lang F: Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide. *Europ J Physiol* 2008;456:293-305.
92. Huie RE, and Padmaja S: The reaction rate of nitric oxide with superoxide. *Free Rad Res Commun* 1993;18:195-199.
93. Pacher P, Beckman JS, and Liaudet L: Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev* 2007;87:315-424.
94. Tyurina YY, Shvedova AA, Kawai K, Tyurin VA, Kommineni C, Quinn PJ, Schor NF, Fabisiak JP, and Kagan VE: Phospholipid signaling in apoptosis: peroxidation and externalization of phosphatidylserine. *Toxicology* 2000;148:93-101.
95. Tyurina YY, Basova LV, Konduru NV, Tyurin VA, Potapovich AI, Cai P, Bayir H, Stoyanovsky D, Pitt BR, Shvedova AA, Fadeel B, and Kagan VE: Nitrosative stress inhibits the aminophospholipid translocase resulting in phosphatidylserine externalization and macrophage engulfment: implications for the resolution of inflammation. *J Biol Chem* 2007;282:8498-509.
96. Herold S, and Rock G: Reactions of deoxy-, oxy-, and methemoglobin with nitrogen monoxide. Mechanistic studies of the S-nitrosothiol formation under different mixing conditions. *J Biol Chem* 2003;278:6623-6634.

97. Gell DA: Structure and function of haemoglobins. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2018;70:13-42.
98. Kalinga S: Interaction of peroxynitrite with myoglobin and hemoglobin, *Canadian J of Chem* 2011;84:788-793.
99. Boccini F, and Herold S: Mechanistic studies of the oxidation of oxyhemoglobin by peroxynitrite. *Biochemistry* 2004;43:16393-404.
100. Kondo H, Takahashi M, and Niki E: Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants. *FEBS Lett* 1997;413:236-238.
101. Ulker P, Yaras N, Yalcin O, Celik-Ozenci C, Johnson PC, Meiselman HJ, and Baskurt OK: Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells. *Nitric Oxide* 2011;24:184-191.
102. Horobin JT, Sabapathy S, and Simmonds MJ: Repetitive supra-physiological shear stress impairs red blood cell deformability and induces hemolysis. *Artif Organs* 2017;41:1017-1025.
103. Della Corte E, Stirpe F: The regulation of rat liver xanthine oxidase: involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochem J* 1972;126:739-745.
104. Sakuma S, Fujimoto Y, Sakamoto Y, Uchiyama T, Yoshioka K, Nishida H, and Fujita, T: Peroxynitrite induces the conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in rabbit liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;230:476-479.
105. Pinzon-Diaz CE, Calderon-Salinas JV, Rosas-Flores MM, Hernandez G, Lopez-Betancourt E, Quintanar-Escorza MA: Eryptosis and oxidative damage in hypertensive and dyslipidemic patients. *Mol Cell Biochem*, 2018;440:105-113.
106. Brandes RP, Weissmann N, Schroder K: Nox family NADPH oxidases in mechano-transduction: mechanisms and consequences. *Antiox Redox Signal* 2014;20:887-98.

107. Suhr F, Brenig J, Muller R, Behrens H, Bloch W, and Grau M: Moderate exercise promotes human RBC-NOS activity, NO production and deformability through Akt kinase pathway. *PLoS ONE* 2012;7:e45982.
108. Han W, Li H, Villar VA, Pascua AM, Dajani MI, Wang X, Natarajan A, Quinn MT, Felder RA, Jose PA, Yu P: Lipid rafts keep NADPH oxidase in the inactive state in human renal proximal tubule cells. *Hypertension* 2008;51:481-487.
109. Tran J, Magenau A, Rodriguez M, Rentero C, Royo T, Enrich C, Thomas SR, Grewal T, Gaus K: Activation of endothelial Nitric Oxide (eNOS) occurs through different membrane domains in endothelial cells. *PLOS One* 2016;11(3):0151556.
110. Patel HH, Insel PA: Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation of redox signalling. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:1357-1372.

