

# L'Ossigeno farmaco endotelio protettore nel fenomeno di Ischemia/Riperfusione (I/R)

G. Vezzani

Direttore DEU AUSL Parma. Direttore U.O. Anestesia-Rianimazione, Terapia Iperbarica e Antalgica, P.O. di Vaio, Fidenza (PR)

## SUMMARY

Oxygen as an endothelium-protective agent in Ischemia/Reperfusion phenomenon (I/R). The physiopathology foreword reviews the main molecules of leukocyte adhesion (Selectins, Integrins, Immunoglobulins). The local microcirculation response to I/R is then analyzed (arterioles, capillaries, venules). The author emphasizes both the importance of the imbalance between nitric oxide and the superoxide anion as the cause of microcirculation alteration, and its relationship with hyperbaric therapy (HBO). The interaction between neutrophilic polymorphonucleates/adhesion proteins/HBO is thoroughly analyzed. The conclusion gives a list of I/R-related pathologies and a description of HBO role as an endothelium-protective agent.

**Keywords:** HBO, hyperbaric oxygen therapy, Ischemia/Reperfusion, leukocyte adhesion, Selectins, Integrins, Immunoglobulins, Nitrogen monoxide, superoxide anion.

## ■ Riassunto

L'Ossigeno farmaco endotelio protettore nel fenomeno di Ischemia/Riperfusione (I/R). Nella premessa fisiopatologica vengono passati in rassegna le principali molecole della adesività leucocitaria (Selectine, Integrine, Immunoglobuline). Viene quindi analizzata la risposta locale del microcircolo al fenomeno di I/R (Arteriole, Capillari, Venule) e si sottolinea l'importanza dello squilibrio ossido

nitrico/anione superossido quale causa dell'alterazione del microcircolo e il rapporto con la ossigenoterapia iperbarica (HBO). Si analizza in dettaglio l'interazione fra Polimorfonucleati neutrofili/proteine della adesività/HBO. Si conclude con la elencazione di patologie sostenute dal fenomeno di I/R e il ruolo di HBO quale farmaco endotelio protettore.

Parole chiave: HBO, ossigenoterapia iperbarica, Ischemia/Riperfusione, adesività leucocitaria, Selectine, Integrine, Immunoglobuline, Monossido di Azoto, Anione superossido.

## ■ Introduzione

Nel marzo del 1997 su Med. Sub. Iper. (1), rivista della Società Italiana Medicina Subacquea Iperbarica, fu pubblicato un articolo a firma del sottoscritto intitolato: "È utile conoscere le  $\beta_2$ -Integrine? Ecc.". Sono passati alcuni anni e se da un lato le conoscenze fisiopatologiche del fenomeno di I/R si sono molto ampliate, dall'altro le strategie terapeutiche faticano a prendere una strada univoca e chiara.

È incontestabile che la precoce restituzione del circolo sanguigno in un tessuto ischemico è essenziale per prevenire un danno cellulare irreversibile, quindi minore è il tempo ischemico, minore è la possibilità di avere una lesione cellulare. Tuttavia è ben noto e accettato che la riperfusione, paradossalmente, può iniziare una serie di reazioni il cui esito finale è il peggioramento del danno ischemico (2-3). Il fenomeno di I/R è complesso e polimorfo clinicamente, e tuttora ricco di argomenti controversi, si può dire, con buona ragione, che la materia sia "magmatica".

Dopo la necessaria premessa fisiopatologica orientata a chiarire la struttura e funzione di alcune proteine dell'adesività leucocitaria, verrà valutato l'impatto della I/R sulla

*Indirizzo per la richiesta di estratti:*

G. Vezzani

Ospedale di Vaio-Fidenza ASL Parma

Servizio di Anestesia,

Rianimazione e Terapia Iperbarica

Fidenza (Parma) - Tel. 0524-515238

funzionalità della cellula endoteliale nelle arteriole, capillari e venule, quindi il ruolo del rapporto fra monossido di azoto ( $^{\circ}\text{NO}$ )/anione superossido, e, al fine, verrà evidenziato il ruolo dell'ossigeno iperbarico (HBO) nell'interazione polimorfonucleati neutrofilo (PMN) e cellule endoteliali in corso di I/R.

### ■ Premessa fisiopatologica

Si ritiene che il momento cruciale nel fenomeno di I/R sia l'adesività dei PMN "attivati" alla cellula endoteliale. L'attivazione dei PMN è un processo molto complesso e si rimanda ai testi di patologia molecolare per un approfondimento, è tuttavia opportuno prendere conoscenza di alcune molecole dell'adesività che compaiono in tempi diversi sulla membrana citoplasmatica dei PMN e delle cellule endoteliali.

### ■ Selectine

Le selectine sono molecole proteiche di superficie che si trovano sia sulle membrane dei leucociti che sulle cellule endoteliali. Mediano l'adesività iniziale a bassa affinità leucociti-endotelio, normalmente compiono un'azione di "rolling" sull'endotelio vasale.

Strutturalmente sono proteine composte da:

- un dominio citoplasmatico a breve catena
- un dominio trans-membrana
- una sequenza aminoacidica ripetitiva con funzioni di regolazione del complemento
- un dominio amino-terminale calcio-dipendente simile a quello delle Lectine.

Il dominio simil-Lectina è in grado di contrarre legami con siti carboidrati presenti su glicoproteine e glicolipidi. Al momento, Tab. 1, sono noti tre tipi di Selectine coinvolte nel processo di adesività: E-Selectine (CD26E, ELAM-1), P-Selectine (CD62P, PADGEM, GMP-140), L-Selectine (CD62L, LAM-1, LECAM-1, MEL-1), le sigle fra parentesi indicano una vecchia nomenclatura che deve essere abbandonata.

Tab. 1.

Molecole di Adesione	Cellule	Ligandi	Modo di espressione
E-Selectine	C. endoteliali	Slex ELS-1 PSGL-1	Inducibile
P-Selectine	C. endoteliali Piastrine	PSGL-1 Slex	Inducibile
L-Selectine	Leucociti	Slex Glicam-1 Madcam-1 CD34	Costitutivo

E-Selectine si trovano solo sulla membrana delle cellule endoteliali, P-Selectine si trovano sulla membrana delle cellule endoteliali e delle piastrine, L-Selectine sono solamente sulla membrana dei leucociti.

### ■ Integrine

Sono noti circa venti diversi tipi di Integrine, proteine transmembrana di superficie. Di queste almeno cinque sono coinvolte nell'interazione endotelio-leucocita PMN, Tab. 2.

Sono eterodimeri composti da una sub unità  $\beta$  che può legare sub unità  $\alpha$  diverse mediante legami covalenti.

Le cinque integrine interessate al processo di adesione attualmente identificate sono:

- appartenenti alla famiglia delle  $\beta_2$ -Integrine: CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18
- appartenenti alla famiglia delle  $\beta_1$ -Integrine:  $\alpha_4$ - $\beta_1$  (Very Late Activated VLA-4)
- appartenenti alla famiglia delle  $\alpha_4$ - $\beta_7$ -Integrine:

Le  $\beta_2$ -Integrine sono normalmente espresse nel citoplasma leucocitario. La loro comparsa sulla superficie cellulare è parte integrante del processo di "Attivazione leucocitaria", citochine, fattori della coagulazione e vari fattori chemotattici entrano nel processo di attivazione.

Esiste in particolare un meccanismo di rilasciamento di  $\beta_2$ -Integrine da parte di granuli perossidasi negativi intracellulari verso la superficie della cellula. Il picco massimo dell'espressione è raggiunto in 6 ore circa dall'evento stimolante.

### ■ Superfamiglia Immunoglobuline

Sono proteine della superficie cellulare, interessate alla adesività, alla ricognizione antigenica e a legare frammenti del complemento.

La superfamiglia è composta da numerose proteine, se ne elencano le più note in Tab. 3.

Vascular Cellular Adhesion Molecule-1 (VCAM-1),

Tab. 2.

Molecole di adesione	Cellule	Ligandi	Modo di espressione
CD11a/CD18	Leucociti	ICAM-1* ICAM-2* ICAM-3*	Costitutivo Inducibile
CD11b/CD18	Neutrofil Monociti Cellule Natural Killer	ICAM-1 Fibrinogeno Fattore X	Costitutivo Inducibile
CD11c/CD18	Neutrofil Monociti Cellule Natural Killer	Frammenti del complemento	Costitutivo Inducibile
$\alpha_4\text{-}\beta_1$	Leucociti (non PMN)	VCAM-1* Fibronectina	Costitutivo
$\alpha_4\text{-}\beta_7$	Linfociti T e B	MadCAM-1* VCAM-1 Fibronectina	Costitutivo

\* Vedi più sotto: Superfamiglia delle Immunoglobuline

Tab. 3.

Molecole di adesione	Cellule	Ligandi	Modo di espressione
VCAM-1	Cellule endoteliali	$\alpha_4\text{-}\beta_1, \alpha_4\text{-}\beta_7$	Costitutivo Inducibile
ICAM-1	Cellule endoteliali Leucociti Fibroblasti Cellule epiteliali	CD11a/CD18 CD11b/ CD18	Costitutivo Inducibile
ICAM-2	Cellule endoteliali	CD11a/CD18	Costitutivo
MadCAM-1	Cellule endoteliali	$\alpha_4\text{-}\beta_7, \text{L-Selectine}$	Costitutivo
PECAM-1	Cellule endoteliali Piastrine Leucociti	$\alpha_5\text{-}\beta_3$	Costitutivo

l'espressione della proteina è regolata da vari mediatori dell'infiammazione, con un picco dell'espressione dopo circa 6 ore e un ritorno ai valori di base in circa 72 ore.

Intra Cellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), l'espressione della proteina è regolata da mediatori dell'infiammazione, con picco dopo 12-24 ore dall'evento e ritorno alla normalità in 72 ore circa.

Intra Cellular Adhesion Molecule-2 (ICAM-2), l'espressione è costitutiva, probabilmente è un frammento di ICAM-1.

Mucosal Addressin Cellular Adhesion Molecule (MadCAM-1), proteina costitutiva presente soprattutto nell'endotelio venulare di linfonodi mucosali, coinvolta nel processo di migrazione linfatica.

Platelet-EC Adhesion Molecule (PECAM-1), proteina localizzata nelle giunzioni fra cellule endoteliali, coinvolta nella diapedesi di monociti e neutrofil.

Il complesso  $\beta_2$ -Integrine/ICAM-1 è responsabile della

adesività "forte" delle cellule endoteliali e compare successivamente alla adesività "debole" del complesso Selectina/Slex o simili.

### ■ Risposta locale del microcircolo alla I/R

Sebbene tutte le cellule endoteliali siano ugualmente esposte al danno da I/R, tuttavia la risposta all'insulto varia in modo sito-specifico, per cui è opportuno distinguere la risposta dell'endotelio arteriolare, capillare e venulare.

### ■ Arteriole

La I/R induce nell'endotelio arteriolare un'alterazione della risposta NO-mediata verso il rilassamento della fibra muscolare perivascolare, nei confronti di tutti i vaso-

dilatatori recettore-dipendenti, come, e.g., la Acetilcolina (4-5). Poiché le arteriole post-ischemiche riprendono la funzione dilatante quando esposte a vasodilatatori endotelio-indipendenti, e.g., Nitroprussiato, fig. 1, si ipotizza che il mancato rilassamento vascolare non sia un deficit funzionale della fibra muscolare. Infatti l'aggiunta in vitro di superossido dismutasi e altri antiossidanti, può ripristinare la risposta in vasodilatazione NO-mediata. Pertanto una sovrapproduzione di anione superossido da parte della cellula endoteliale ipossica, può spiegare la mancata risposta vascolare NO-mediata.

Il problema appare tuttora piuttosto complesso: infatti, fig. 2, in topi geneticamente carenti di  $\beta_2$ Integrine o di proteine endoteliali della adesività (P-Selectine o ICAM-1), non si manifesta l'alterazione NO-mediata del rilassamento della fibra muscolare perivascolare, suggerendo dunque che un'altra fonte di produzione di anione superossido può stimolare l'adesività dei polimorfonucleati neutrofilici (PMN) alla cellula endoteliale, durante e dopo la ri-perfusione

I dati riportati in fig. 1 e fig. 2 concordano nel sottolineare l'importanza delle proteine dell'adesività nella I/R e ipotizzano che la reattività vascolare endotelio-dipendente da Ach è fortemente attenuata dalla I/R, mentre non si manifesta nei topi carenti di proteine dell'adesività, viene inoltre conservata detta reattività (rilassamento) in modo endotelio-indipendente dopo Nitroprussiato, indicando che il danno vascolare, almeno inizialmente, sembra confinato all'endotelio.

## ■ Capillari

Fatti ben documentati nel letto capillare come conseguenza della I/R, sono un aumento della permeabilità capillare e una riduzione del numero dei capillari perfusi. Non sembra che l'aumento della permeabilità sia da porre in rapporto con un aumento di pressione intracapillare. Piuttosto si è osservato che in capillari in condizioni normali, dove la inibizione della ossido nitrico sintetasi determina una riduzione della produzione di NO in modo simile a quella che si osserva nel letto capillare post-ischemico, si ha un incremento della permeabilità del tutto simile a quello dovuto a I/R (6).

Lo stato ischemico tende a peggiorare progressivamente nel letto capillare con meccanismi diversi. Nei capillari epatici la maldistribuzione del flusso sembra dovuta essenzialmente all'ostruzione capillare da parte di PMN che hanno perso la normale elasticità di membrana, con o senza il sovrapporsi delle piastrine, assieme a cellule endoteliali edematose o staccate dalla loro membrana basale. In altri tessuti l'edema dovuto ad alterazione della permeabilità venulare post-ischemica, provoca compressione sui capillari fino ad impedire il movimento degli elementi figurati del sangue (7).

Entrambi i fenomeni possono essere contrastati, provo-

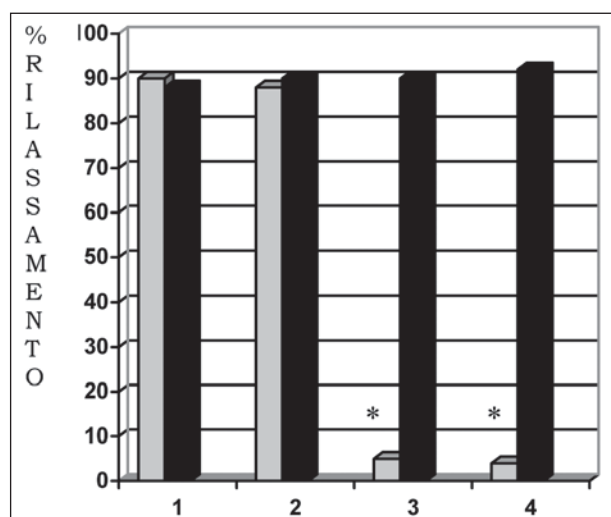


Fig. 1. Reattività vascolare di segmenti isolati di arteria mesenterica superiore ad Ach (10-6 M), colonne grigie e al sodio nitroprussiato (SNP 10-6 M) colonne nere, ottenuti da topi di ceppo genetico C57BL/6.

- 1) Controllo.
- 2) % di rilassamento della muscolatura perivascolare dopo 45' di sola ischemia.
- 3) % di rilassamento dopo asportazione dell'endotelio.
- 4) % di rilassamento dopo aggiunta di L-Nitro-Arginina-Metil-Estere (10-4 M), L-NAME.

Il rilassamento vascolare in 3 e 4 è drasticamente ridotto quando dipende da Ach.

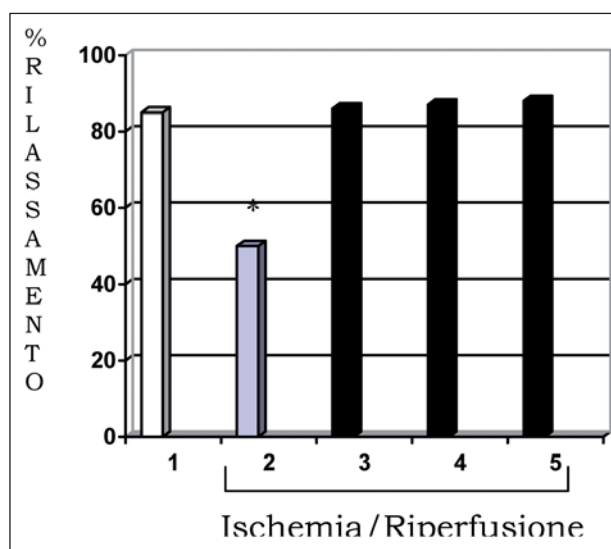


Fig. 2. Rilassamento vascolare di segmenti isolati di arteria mesenterica superiore indotto da Ach dopo 45' di ischemia e 45' di ri-perfusione.

- 1) Controllo (non sottoposto a I/R).
- 2) topi C57BL/6.
- 3) topi carenti di CD11/CD18.
- 4) topi ICAM-1 mutanti.
- 5) topi carenti di P-Selectine.

cando I/R in topi geneticamente carenti di leucociti o di proteine della adesività endoteliale (8).

Topi mutanti che sono in sovrapproduzione di superossido dismutasi, dimostrano un miglioramento della perfusione capillare nel tessuto post-ischemico, suggerendo ancora una volta un ruolo dell'anione superossido.

Tuttavia, per quanto ancora si dirà più avanti sulla interazione ossigeno e °NO, è opportuno approfondire il complesso rapporto nel circolo capillare fra °NO, inibitori della °NO-sintetasi e permeabilità capillare. D'altra parte non sosteniamo sempre, forse un po' a cuor leggero, un "effetto antiedema" dell'ossigeno iperbarico?

È noto come l'equazione di Starling permetta di valutare le variazioni della permeabilità capillare in quanto:

$$1 F_v/S = L_p [P_c - P_i - \sigma (\pi_c - \pi_i)]$$

Dove  $F_v$  è il volume filtrato nell'unità di tempo,  $S$  è la superficie della sezione del capillare,  $L_p$  è la conduttività idraulica,  $P_c$  la pressione idrostatica capillare,  $P_i$  la pressione idrostatica interstiziale,  $\sigma$  il coefficiente osmotico,  $\pi_c$  e  $\pi_i$  rispettivamente la pressione oncologica capillare e interstiziale.

Nella sperimentazione seguente, (9) in un gruppo di ratti viene esteriorizzata, previa induzione di anestesia generale, l'arteria mesenterica e mediante una micropipetta viene incannulata un'arteriola fino ad occludere un capillare. Poiché l'arteria esposta è irrorata con una soluzione tampone priva di proteine è evidente che  $P_i$  e  $\pi_i$  saranno uguali e prossimo allo zero. Parimenti la pressione idrostatica nel capillare occluso sarà uguale a quella dell'arteriola da cui origina,  $P_a$ , e pertanto l'equazione può essere riscritta in modo più semplice:

$$2 F_v/S = L_p (P_a - \sigma \pi_c)$$

Nella 2  $S$  è la sezione capillare contenente due emazie, assumendo che il capillare sia un cilindro perfetto. Sono stati preparati tre gruppi di ratti secondo il modello biologico sopraesposto: 1) gruppo controllo, 2) ratti trattati con siero antineutrofili (ANS), 3) ratti trattati con anticorpo monoclonale CL26 anti CD/18. A tutti i gruppi era somministrato L-NAME (100  $\mu$ M) (Levo-Nitro-Arginina-Metil-Estere) dopo le misurazioni basali (Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5).

I dati che si desumono da quanto sopra esposto succintamente, portano l'attenzione sull'endotelio capillare. Per quanto nel lavoro citato non si parli esplicitamente di I/R, ma più genericamente di infiammazione, si evince che i fenomeni molecolari descritti sono comuni, d'altra parte è inoppugnabile come la Sindrome da Risposta Infiammatoria Sistemica (SIRS), possa essere iniziata dalla I/R. Gli studi sono generalmente dedicati al comportamento dell'endotelio venulare post-capillare durante I/R. Comunque sia, si desume un ruolo fondamentale dei

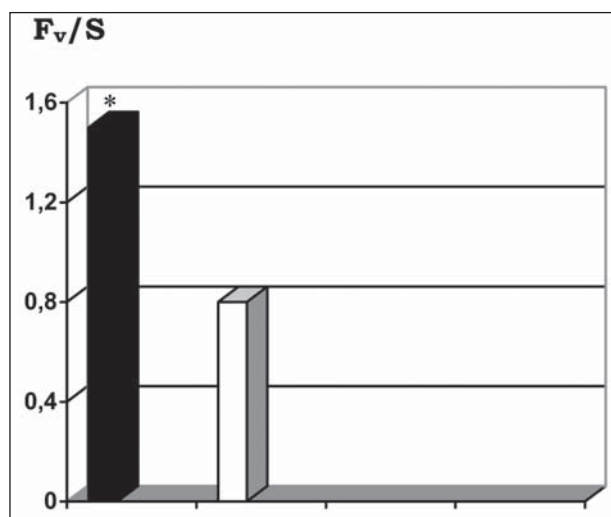


Fig. 3. Effetto sulla permeabilità capillare determinata come  $F_v/S$ , della L-NAME. È evidente un incremento della permeabilità nei valori attuali, barra nera, rispetto ai valori calcolati, barra bianca, assumendo che non vi siano alterazioni della permeabilità e utilizzando le misurazioni della pressione arteriolare  $P_a$  e della concentrazione plasmatica proteica, inserite nella 2.

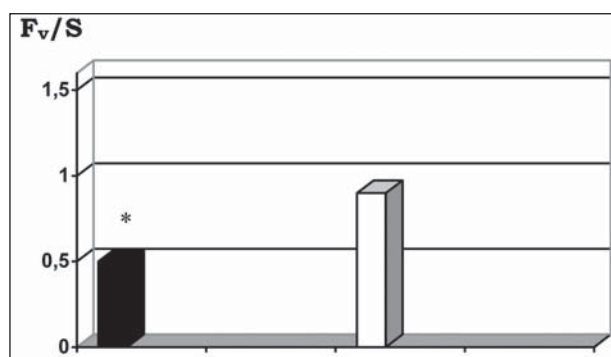


Fig. 4. Effetto sulla permeabilità capillare determinata come  $F_v/S$ , della L-NAME, in ratti pretrattati con alte dosi (1 ml/kg) di ANS. La barra nera indica il valore attuale, la bianca valori calcolati assumendo che non vi siano alterazioni della permeabilità e utilizzando le misurazioni della pressione arteriolare  $P_a$  e della concentrazione plasmatica proteica, inserite nella 2.

PMN; infatti in fig. 3 si vede il comportamento di  $F_v/S$  in presenza di L-NAME, e PMN. In tal caso sembra prevalere un effetto proinfiammatorio, mentre in fig. 4 prevale un effetto antinfiammatorio di L-NAME in assenza di PMN. Non può non risultare lampante il ruolo delle proteine della adesività leucocitaria ed endoteliale in tali diversi comportamenti. Si suggerisce che uno dei meccanismi antiedemigeni dell'ossigeno, quando somministrato a pressioni sufficientemente elevate, sia da vedere proprio nell'interazione con dette proteine. È evidente

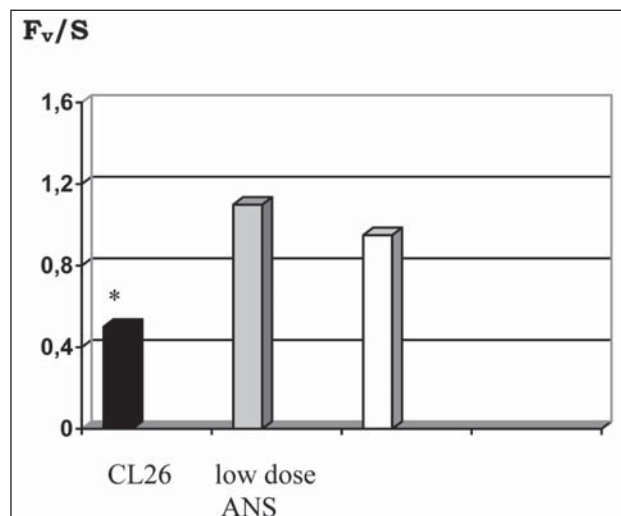


Fig. 5. Effetto di L-NAME su  $F_v/S$  in ratti pretrattati con anticorpi monoclonali anti-CD/18 (CL26), o con 0,1-0,2 ml/kg di ANS (low dose), barre scure. La barra bianca indica valori calcolati assumendo che non vi siano alterazioni della permeabilità e utilizzando le misurazioni della pressione arteriolare  $P_a$  e della concentrazione plasmatica proteica, inserite nella 2.

che sull'endotelio capillare i problemi da chiarire sono tanti. Quali scambi di messaggi esistono fra l'endotelio venulare post-capillare e l'endotelio capillare? La loro attivazione è contemporanea oppure, come sembra, viene "attivato" prima l'endotelio venulare e poi quello capillare, per il tramite di mediatori che si spostano da cellula a cellula, superando le giunzioni interstiziali, oppure da mediatori che dalle venule raggiungerebbero le arteriole adiacenti e quindi i capillari (4)? Domande che possono sembrare oziose ma che, al contrario, possono indirizzare la ricerca farmacologica in un senso piuttosto che in un altro e che al momento non hanno risposte certe.

### ■ Venule

Si ritiene che la risposta proinfiammatoria più intensa dopo I/R sia quella dovuta all'endotelio delle venule post-capillari, o forse è molto più consistente la letteratura riferita all'endotelio venulare.

Il coinvolgimento venulare nella I/R 4 consiste in:

- a) incremento della adesività leucocitica-endoteliale
- b) migrazione leucocitaria transendoteliale
- c) aggregazione piastrinica-leucocitaria
- d) fuga di albumina nell'interstizio
- e) incremento nella produzione di specie radicaliche

È tuttavia opportuno ricordare che altre cellule, mast-cellule e macrofagi, che normalmente si trovano negli spazi

immediatamente adiacenti alle venule post capillari, sono attivate dalla I/R (10).

Molti studi concordano nel ritenere che l'aumento di espressione delle proteine della adesività sia sui leucociti che sull'endotelio, sia uno dei punti cruciali nel fenomeno della I/R (11).

Per capire più a fondo il problema si riportano alcuni dati relativi a colture di cellule endoteliali umane da vena ombelicale (HUVEC) (12).

Dopo esposizione per 60' ad anossia, le colture venivano poste in aria ambiente e analizzate in periodi da 15' a 600' dopo la riossigenazione. Alle colture erano addizionati PMN marcati con  $^{51}Cr$ , al fine di valutare la adesività post I/R al monostrato di endotelio venulare fig. 6.

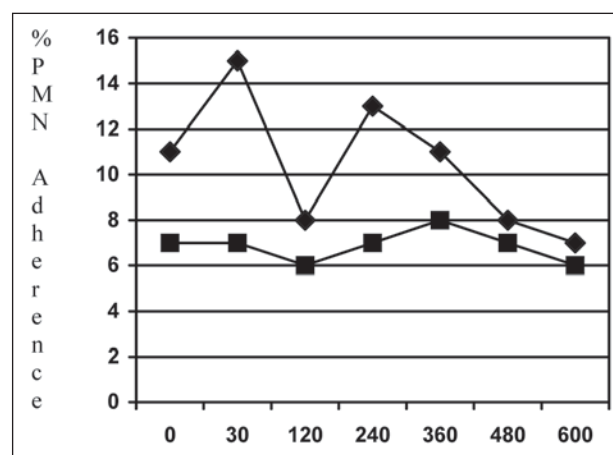


Fig. 6. Percentuale di adesività di neutrofili radiomarcanti con  $^{51}Cr$  e aggiunti a colture monostrato di HUVEC. In ascissa il tempo in minuti, in ordinata % di adesività.

◆ Adesività di colonie esposte alla I/R  
 ■ Adesività di colonie non esposte alla I/R  
 Si notano due picchi nella adesività a 30' e a 240', detti Fase 1 e Fase 2.

Ad alcune colture venivano aggiunte catalasi (CAT), superossido dismutasi (SOD), Oxypurinolo (OXY) e antagonisti dei recettori del Platelet-Activating Factor (WEB2086) fig. 7.

È interessante notare come in Fase 1 l'adesività dei PMN sia significativamente ridotta per CAT, OXY e WEB ma non per SOD, mentre in fase 2 solo la riduzione della adesività dovuta a WEB (numero 6) rimane significativa. È sorprendente la mancata azione sia in Fase 1 che in Fase 2 della SOD (numero 4).

Solo nella coltura trattata con anticorpi anti P-selectine (numero 3) si ha una significativa riduzione della adesività dei PMN sia in Fase 1 che in Fase 2. La somministrazione di anticorpi anti ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecole-1), controrecettori specifici di CD/18, riduce in modo significativo la adesività solo in Fase 1 ma non in Fase 2, dato piuttosto inatteso.

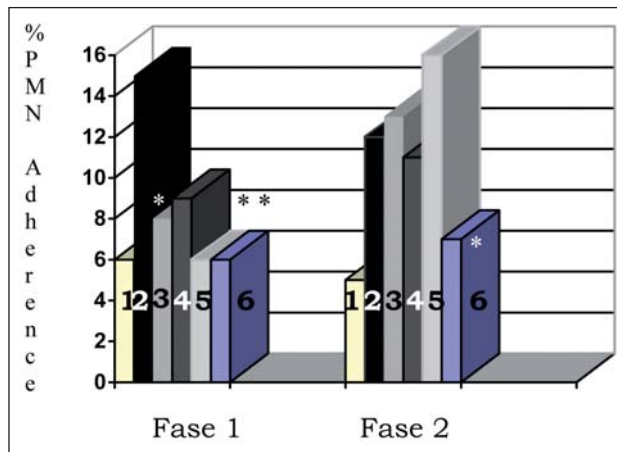


Fig. 7.

- 1) Colture di controllo in normossia
- 2) Colture in anossia per 60'
- 3) Colture sottoposte a I/R e quindi trattate con CAT (1.000 U/mL)
- 4) Colture sottoposte a I/R e quindi trattate con SOD (1.000 U/mL)
- 5) Colture sottoposte a I/R e quindi trattate con OXY (100 µmol/L)
- 6) Colture sottoposte a I/R e trattate con WEB2086

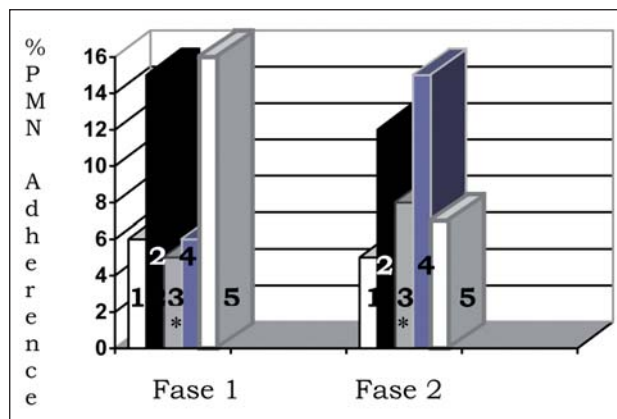


Fig. 8.

- 1) Colture di controllo in normossia
- 2) Colture in anossia per 60'
- 3) Colture sottoposte a I/R e quindi trattate con anticorpi monoclonali anti-P-selectine (20 µg/mL)
- 4) Colture sottoposte a I/R e quindi trattate con anticorpi monoclonali anti-ICAM-1 (20 µg/mL)
- 5) Colture sottoposte a I/R e quindi trattate con anticorpi monoclonali anti-E-selectine (20 µg/mL)

Così pure il dato di una mancata riduzione della adesività in Fase 1 e della comparsa di una riduzione significativa in Fase 2, dovuto alla somministrazione di anticorpi anti E-selectine (numero 5) è piuttosto inatteso. La somministrazione di anticorpi specifici anti CD/18,

abolisce drasticamente la risposta in incremento della adesività nelle colture sottoposte a I/R (il dato non compare nel grafico).

Tuttavia la mancata risposta all'atteso decremento dell'adesività dei PMN al monostrato endoteliale, con l'aggiunta di anticorpi monoclonali anti ICAM-1 alle colture, fa sorgere dubbi sul ruolo reale di CD/18. Ma una successiva sperimentazione (fig. 9) ha chiarito tali dubbi.

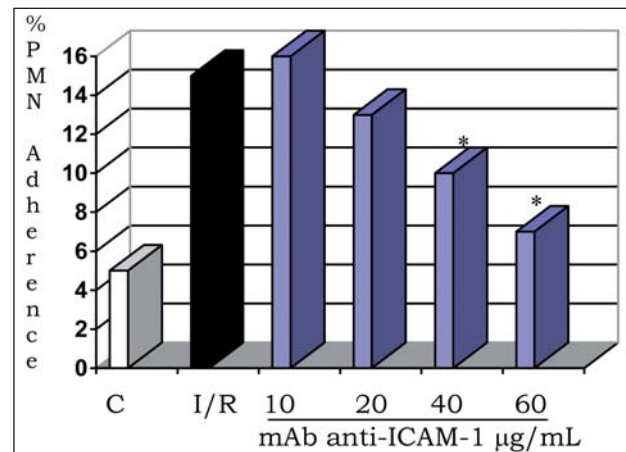


Fig. 9.

C: colture in normossia  
 I/R: colture sottoposte a I/R  
 10, 20, 40, 60: progressivo incremento della dose di anticorpi monoclonali anti ICAM-1.  
 È evidente come vi sia un effetto dose dipendente degli anticorpi anti-ICAM-1. Infatti alla dose standard di 20 µg/mL non si ha alcuna riduzione della adesività, solo raddoppiando la dose si ottiene il dato significativo.

Ma un dato molto importante è l'osservazione per cui solo nella Fase 2, dopo 240 dalla riossigenazione, si assiste ad un picco significativo di ICAM-1. Se le proteine ICAM-1, come sembra, sono gli unici recettori delle CD/18, allora è evidente che devono trascorrere almeno 240' dalla riperfusione perché si abbia l'azione fra agonista e recettore specifico. L'argomento verrà ripreso più avanti. In fig. 10 viene riportato quanto sopra esposto.

Per chiarire inoltre il ruolo del perossido di Idrogeno, le colture di cellule endoteliali monostrato, sono state sottoposte a concentrazioni crescenti di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (fig. 11) e valutata la percentuale di adesività, mentre nella fig. 12, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è somministrata assieme a Catalasi e WEB2086 in Fase 1 e Fase 2.

Da ciò che si vede dalla fig. 11 è evidente che esiste un effetto dose dipendente sulla adesività dei PMN e il perossido di Idrogeno sia in Fase 1 che in Fase 2, tuttavia la risposta in Fase 2, a parità di concentrazione, è nettamente superiore.

È altrettanto evidente che in Fase 1 sia CAT che WEB2086, sono in grado di controllare la risposta in incremento della

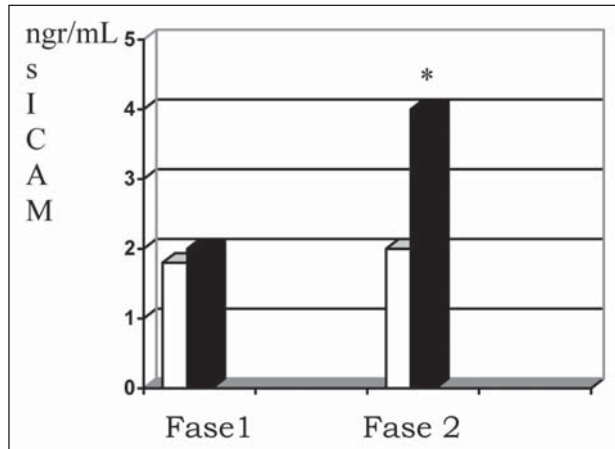


Fig. 10.  
 Colonne chiare: colture in normossia  
 Colonne scure: colture sottoposte a I/R  
 Sono state dosate le ICAM-1 solubili a 30' e 240'.  
 Si ritiene che vi sia una diretta proporzionalità fra le ICAM-1 solubili (s) e le ICAM-1 di membrana.

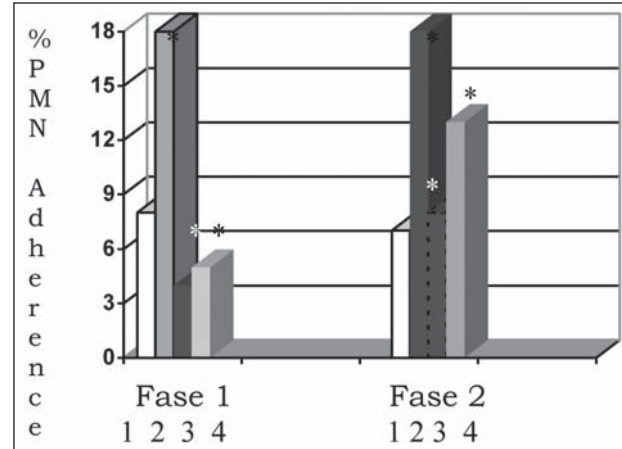


Fig 12.  
 1) Controlli  
 2) Esposizione a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mmol/L) in Fase 1 e in Fase 2  
 3) Esposizione a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + CAT (1,000 U/mL) in Fase 1 e Fase 2  
 4) Esposizione a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + WEB2086 (10 μmol/L) in Fase 1 e Fase 2  
 Tutte le colture erano in normossia.

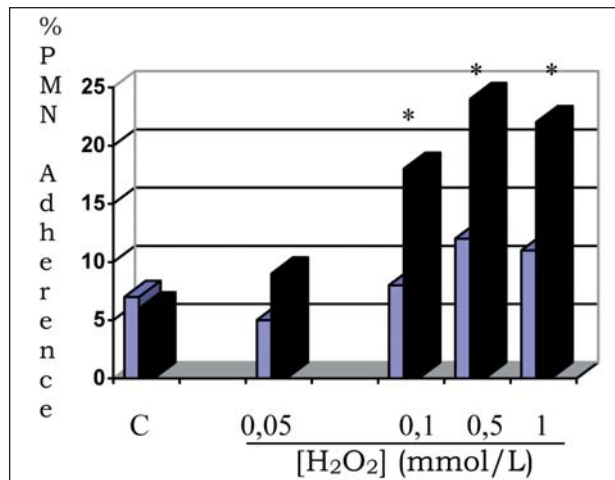


Fig 11.  
 Colonne chiare: valutazione dopo 30' dall'esposizione (Fase 1). Colonne scure: valutazione dopo 240' dall'esposizione (Fase 2).  
 C: controlli. Alle concentrazioni di 0,1-0,5-1 (mmol/L) di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, i valori in Fase 2 sono significativamente più elevati rispetto a quelli in Fase 1.  
 Tutte le colture erano mantenute in normossia.

adesività dei PMN che viene comunque attenuata in Fase 2. Visto l'effetto di WEB2086, è logico supporre un ruolo importante dei PAF di membrana endoteliale nella risposta "ossidativo-mediata" alla adesività dei PMN. I dati che si possono trarre da questo modello biologico, basato sullo studio del comportamento dell'endotelio della vena ombelicale umana alla I/R, portano a concludere che in Fase 1, vale a dire entro pochi minuti dalla I/R, inizia

una produzione di perossido di Idrogeno in parte mediata dalla Xantino-ossidasi che sostiene a sua volta la produzione di PAF da parte della membrana endoteliale. In questa fase sia Cat che WEB2086, sono in grado di annullare la risposta all'incremento della adesività, fig. 7. In contrasto con questi dati, in Fase 2 solo WEB2086 è in grado di inibire in modo significativo la risposta in incremento della adesività dei PMN. Per spiegare il dato bisogna considerare la presenza di Xantino-ossidasi endogena (e.g. mitocondriale), per cui CAT esogena può essere in grado di detossificare il perossido di Idrogeno immediatamente fuori dalla membrana endoteliale, che può essere anche di derivazione dalla NADPH leucocitaria, ma può non avere accesso al perossido di Idrogeno generato in Fase 2 di probabile origine endogena. Così Cat rimane inefficace in Fase 2 ma è ancora attiva WEB2086 in quanto, in qualche modo, il perossido di Idrogeno continua a elicitar la risposta verso la formazione di PAF, fig. 7. Il dato certo, non riportato in istogramma, è che in entrambe le Fasi della I/R le β<sub>2</sub>-Integrine sono in grado di indurre una potente risposta verso l'incremento della adesività dei PMN nei confronti dell'endotelio venulare, è evidente, da quanto detto, che il contributo all'incremento di adesività non è costante nelle due fasi descritte per tutte le proteine. Infatti in Fase 1 sembra che solo P-selectine e ICAM-1, ma non E-selectine, contribuiscano alla adesività dei neutrofili. In Fase 2 aumentano significativamente le E-selectine e ICAM-1 che rimane elevato per circa 10 ore, nonostante la progressiva riduzione della adesività endoteliale. Il comportamento delle proteine della adesività in Fase 1,



può essere spiegato con la presenza di ICAM-1 costitutive, con una rapida mobilitazione da pool preformati nel citosol endoteliale per P-selectine e da rapido affioramento di  $\beta_2$ -Integrine preformate da sacche del citosol di PMN "attivati" da gran numero di "attivatori", fra cui sicuramente i PAF.

Nella Fase 2 il modello di comportamento di E-selectine e in parte di ICAM-1 e P-selectine, fa supporre l'intervento di un meccanismo trascrizione-dipendente.

Molti lavori (12-13) hanno portato l'attenzione sui fattori di trascrizione nucleare, Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) e Activator Protein-1 (AP-1), quali attivatori della trascrizione nucleare per molte proteine della adesività.

Infatti, 3-aminobenzamide, (14) del lavoro, un inibitore specifico di AP-1, è in grado di inibire la risposta al perossido di Idrogeno nell'elicitazione di ICAM-1, mentre un inibitore dell'attivazione di NF $\kappa$ B, MG 132, 25 del lavoro, riduce la risposta alla sintesi di E-selectine, in modelli di I/R su endotelio venulare. Anche oligonucleotidi fosforotati che hanno copie multiple di siti leganti DNA, in comune con NF $\kappa$ B e AP-1, sono in grado di bloccare la trascrizione dipendente da NF $\kappa$ B e AP-1.

In realtà si è dimostrato (15) che la soppressione della traslocazione nucleare del fattore NF $\kappa$ B in colture di endotelio venulare, riduce l'espressione non solo di alcune proteine della adesività dell'endotelio, ma anche quelle espresse dai PMN attivati, in particolare  $\beta_2$ -Integrine fig. 13, fig. 14, fig. 15. Infatti un farmaco, Rebamipide, noto per contrastare il sanguinamento delle prime vie digerenti attraverso un intenso effetto di "scavenging" nei confronti di radicali liberi dell'ossigeno dopo I/R, specificamente inibisce la traslocazione nucleare del fattore NF $\kappa$ B in colture di endotelio venulare, da vena ombelicale umana, dopo I/R, per il momento il meccanismo inibitorio di tale traslocazione è ignoto.

Valutazione, fig. 13, fig. 14, della densità ottica (O.D.) alla  $\lambda$  di 450 nm di E-selectine e P-selectine, in colture endoteliali venulari umane, sottoposte a 60' di anossia (95% N<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) e quindi a riossigenazione normobarica per 4 ore.

C: controlli

B: valori basali di O.D. delle colture non sottoposte a I/R, ma trattate con Rebamipide 1000  $\mu$ M

NR: valori di O.D. in colture sottoposte a I/R e non trattate con Rebamipide

R100: valori di O.D. a 100  $\mu$ M di Rebamipide

R300: valori di O.D. a 300  $\mu$ M di Rebamipide

R1000: valori di O.D. a 1000  $\mu$ M di Rebamipide

° P<0.05 vs C

\* P<0.05 vs NR

\*\* P<0.01 vs NR

L'azione della Rebamipide è messa in evidenza anche come inibitore della adesività dei PMN attivati, fig. 16.

°P< 0.05 vs C

\*P< 0.05 vs NR

\*\* P< 0.01 vs NR

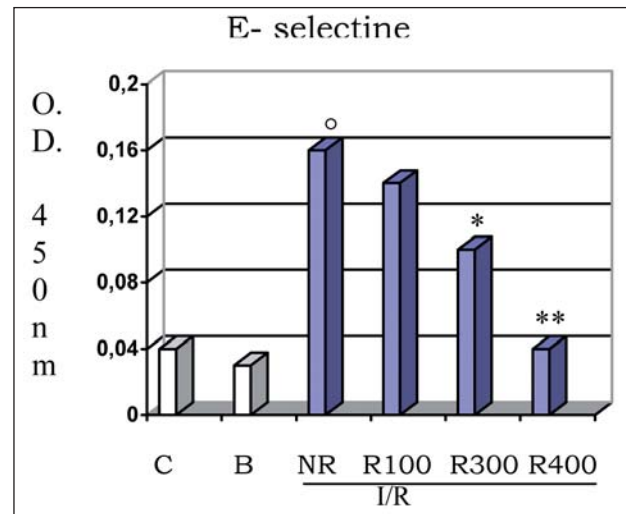


Fig. 13.

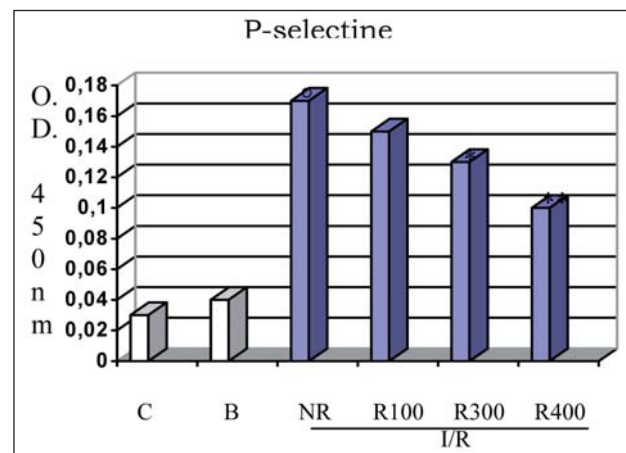


Fig. 14.

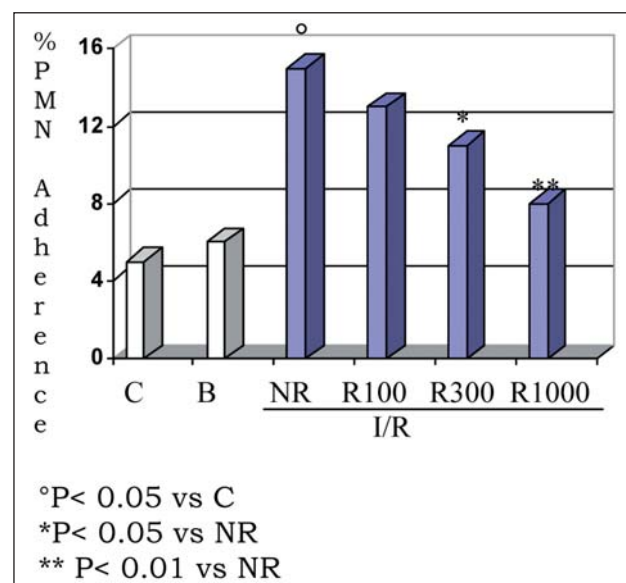


Fig. 15.

L'azione della Rebamipide sul fattore trascrizionale NF- $\kappa$ B è documentata mediante elettroforesi (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) delle colture dopo I/R. Gli EMSA degli estratti nucleari dimostrano un'azione dose dipendente di Rebamipide nell'inibire la traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B (Kim).

È indubbio l'interesse dell'associazione Rebamipide e Ossigeno iperbarico nel trattamento della I/R, ricerca che attende di essere effettuata.

### ■ Lo squilibrio ossido nitrico/anione superossido quale causa di alterazione del microcircolo e suo rapporto con HBO

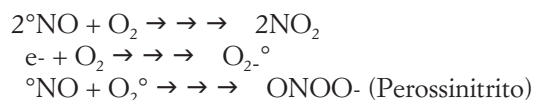
Nella norma nelle cellule endoteliali la sintesi ossido nitrico ( $^{\circ}\text{NO}$ ) eccede notevolmente la sintesi di anione superossido ( $\text{O}_2^{\circ}$ ), ma pochi minuti dopo un episodio di I/R si verifica uno squilibrio a favore della produzione di superossido. È noto da anni che HBO anche in dosi cliniche, interagisce in modo complesso nel delicato equilibrio  $^{\circ}\text{NO}$ /Specie radicaliche dell'ossigeno (soprattutto  $\text{O}_2^{\circ}$ ) a livello endoteliale, con interazioni fra  $^{\circ}\text{NO}$  e  $\text{O}_2$  molecolare, fra  $\text{O}_2^{\circ}$  e  $^{\circ}\text{NO}$ .

Le interazioni sopradescritte a livello endoteliale in specie nel microcircolo dipendono soprattutto, ma non solo, da:

1. Concentrazione di  $\text{O}_2$ , durata dell'esposizione
2. Generazione di  $\text{O}_2^{\circ}$
3. Attività endogena della (SOD)
4. Dall'entità della produzione di  $^{\circ}\text{NO}$
5. Dalle isoforme di NOS (Ossido Nitrico Sintetasi) che sono coinvolte

Tutti questi fattori possono differire da specie/specie, da organo/tessuto e dal tipo di vaso sanguigno considerato (16).

In alcuni distretti vascolari (arti inferiori e circolo cerebrale) in corso di HBO elevate concentrazioni di ossigeno possono ridurre la biodisponibilità di  $^{\circ}\text{NO}$ , come dimostrato nelle reazioni chimiche sottoscritte, provocando vasocontrazione mediante la riduzione dell'attività di cGuanilato Ciclastasi Solubile (GCs) (visto l'effetto di stimolo di  $^{\circ}\text{NO}$  sull'eme di GCs), e quindi riduzione della disponibilità di Guanilato Monofosfato Ciclico (GMPc), con incremento del tono della muscolatura liscia perivascolare.



D'altra parte nel circolo polmonare prevale uno stato di vasodilatazione anche in corso di esposizioni a dosi cliniche di HBO per il diverso embriarsi dei fattori sopramenzionati ai punti 1, 2, 3, 4, 5 e una maggior biodisponibilità di  $^{\circ}\text{NO}$ .

### ■ Interazione fra PMN, proteine dell'adesività e HBO

Nella fig. 16 (17) sono riportati i dati dell'inibizione della adesività dei PMN all'endotelio del circolo cerebrale in ratti dopo intossicazione da monossido di carbonio (CO) pannello A. L'adesività è documentata come attività mieloperossidasi (MPL) valutata nello spettro di assorbimento  $A_{460} \times 10^3/\text{min/g}$  di tessuto cerebrale omogenato. È evidente la riduzione di detta attività (colonna n. 3), se i ratti sono trattati a 2.8 ATA per 45' dopo l'intossicazione rispetto ai ratti non trattati. Nel pannello B sono riportati i dati relativi al danno polmonare dopo inalazione di fumo in ratti, valutato come attività MPL prima e dopo trattamento iperbarico. Anche in questo caso i dati sono significativi. Nel pannello C è valutata l'adesività leucocitaria a colonne di nylon, attraverso le quali viene fatto passare un campione di sangue prelevato a ratti che respirano aria, oppure ossigeno a 1 o 2.8 ATA per 45 minuti. È evidente come al numero 9 vi sia una drastica riduzione della adesività leucocitaria. Questa metodica è considerata specifica per valutare l'adesività dei PMN attivati, dipendente dalle  $\beta_2$ -Integrine.

Accertata l'importanza delle  $\beta_2$ -Integrine nel meccanismo della adesività PMN-endotelio, si ritiene che vi siano almeno due vie attraverso cui è possibile realizzare tale meccanismo: una via coinvolge recettori di membrana e un'altra si crea per mezzo di agenti permeabili alla membrana che attivano direttamente enzimi della famiglia delle protein-chinasi (PKC), responsabili di numerose fosforilazioni che producono a loro volta incremento della adesività.

Nella fig. 17 (17) sono riportati i dati della adesività di PMN ottenuti dal lavaggio peritoneale di ratti prima esposti a 2.8 ATA per 45', HBO e variamente trattati con agonisti della adesività dei neutrofili e il gruppo controllo in aria A anch'esso trattato.

Data l'ipotesi dell'interazione fra HBO e funzione di GMPc nei PMN, si rende opportuno focalizzare le caratteristiche di Guanilato Ciclastasi solubile (GCs). Solo il 2% del GMPc è prodotto da GCs di membrana, che, priva di eme, sembra non essere sensibile all'azione di  $^{\circ}\text{NO}$ , ma a quella del peptide natriuretico atriale (ANP), al contrario GC citosolica che è sensibile all'azione di  $^{\circ}\text{NO}$ . I dati attuali depongono per la possibilità che HBO agisca solamente su GC di membrana vedi fig. 18 (17) e seguenti.

Sono stati trattati due gruppi di ratti: controllo in aria ambiente, e gruppo HBO, trattato per 45' a 2.8 ATA, da entrambi i gruppi sono stati ricavati PMN da lavaggi peritoneali che sono stati messi in coltura per 1' con  $0.1 \mu\text{M}$  di FMLP o PMA e quindi è stato valutato il contenuto in Fento-moli/ $1 \times 10^6$  PMN cGMP. Si osserva che non c'è risposta con FMLP nei PMN dopo HBO, mentre viene mantenuta con PMA, il che permette di ipotizzare una mancanza d'azione di HBO su GC citosolica. Al fine di approfondire il problema è stata valutata l'attività della

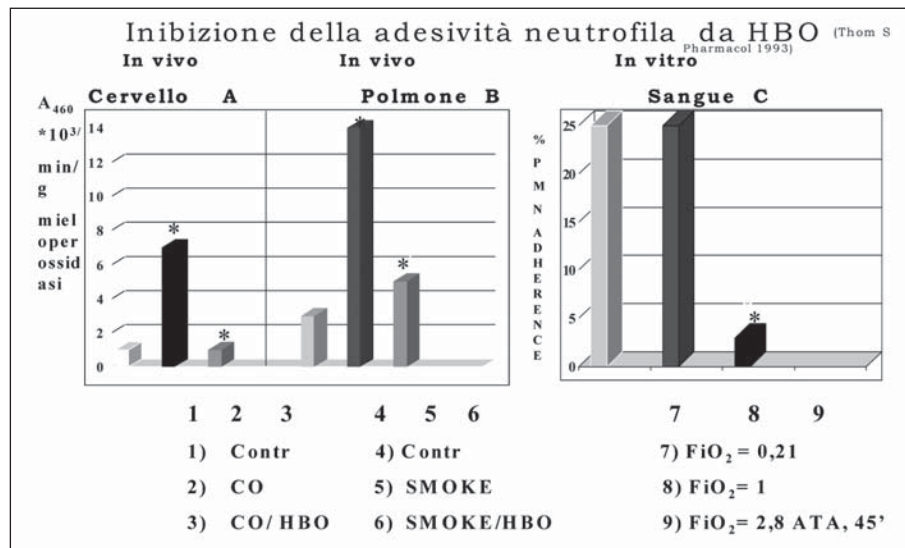


Fig. 16.

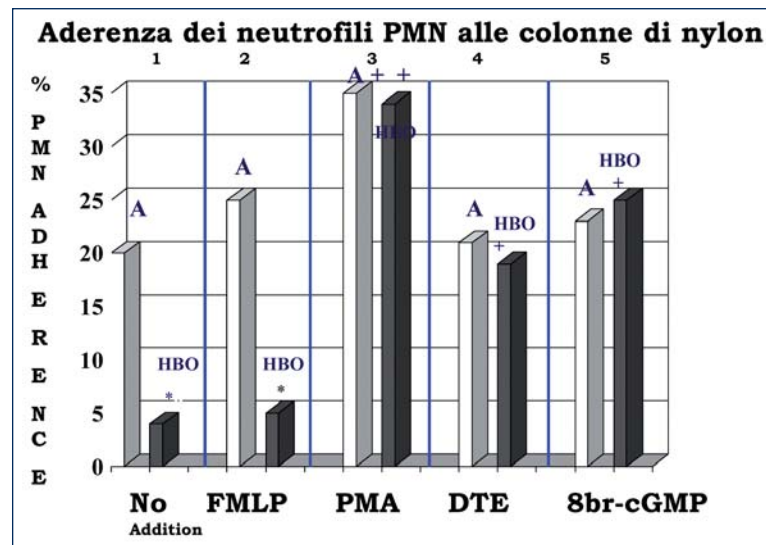


Fig. 17.

Colonna 1: riduzione significativa della % di adesività dopo HBO senza alcuna addizione di sostanza, rispetto al gruppo controllo in aria A.

Colonna 2: i neutrofil, sia del gruppo A che del gruppo HBO, sono stati incubati con 0.1 µM di Fenil-Metionil-Leucin-Fenilalanina (FMLP) per 30'.

Colonna 3: incubazione con 0.1 µM Forbolo-Miristato-Acetato (PMA) per 30'.

Colonna 4: incubazione con 3 µM Di-Tio-Eritrolo (DTE).

Colonna 5: incubazione con 10 µM di 8-bromo-Guanosin-monofosfato-Ciclico (8br-cGMP).

Discussione:

nella colonna 1 si ottengono i dati già noti relativi alla inibizione della adesività dei PMN, quando esposti ad HBO.

Nella colonna 2 si nota come FMLP che è attivatore di processi enzimatici cellulari tramite recettori di membrana, non modifica la risposta di HBO e incrementa al limite della significatività la risposta del gruppo A.

Nella colonna 3, al contrario, si vede come la risposta sia a HBO che ad A sia completamente annullata da PMA che è un attivatore di processi enzimatici PKC, citoplasmatici, e pertanto si può ritenere che HBO eserciti il suo effetto su componenti della membrana dei PMN, lasciando integri processi interni cellulari dell'adesività.

Nella colonna 4 e 5 gli effetti sono simili, e poiché il DTE è un potente riducente di gruppi sulfidrilici di membrana e 8br-cGMP un analogo di membrana al GMPc, ma inattivo, si può verosimilmente concludere che HBO induce uno "stress" ossidativo su componenti associati a gruppi sulfidrilici di membrana.

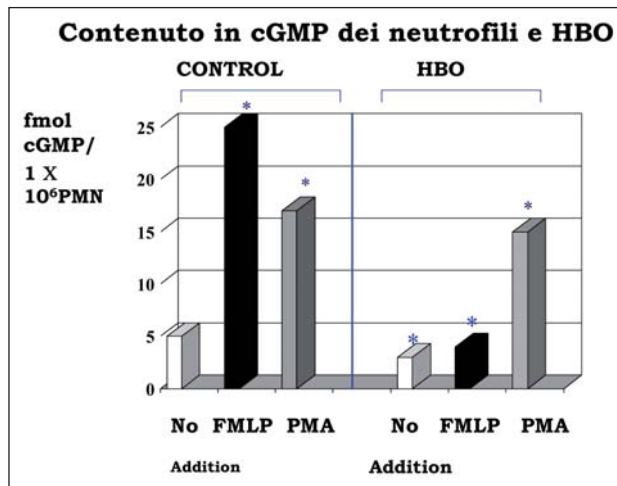


Fig. 18.

GCs di membrana in frammenti isolati di membrana di PMN fig. 19 (17).

I dati soprariportati erano noti da tempo, ma rimangono molti punti oscuri, soprattutto occorre chiarire il complesso rapporto °NO, adesività dei PMN e HBO (fig. 20) (17).

Produzione di cGMP da neutrofilii ottenuti dal lavaggio peritoneale di ratti.

Il gruppo 1 è stato esposto a 0.1 µM di FMLP o PMA per 1', il gruppo 2 è stato inoltre esposto ad un flusso di °NO di 13 nM/2', generato da 50 nM di dietilendiamina di NONOato. È interessante notare come il flusso di °NO sia in grado di ridurre significativamente la produzione di cGMP quando stimolata da FMLP, ovvero tramite l'interazione con recettori di membrana, ma non ha effetto sulla produzione di cGMP quando ottenuta mediante incubazione con PAM, attivatore di chinasi intracellulari. Molto suggestivo è l'istogramma riportato in alto a destra, già visto alla fig. 18, in cui i dati ottenuti con HBO sono identici a quelli ottenuti con °NO.

Nella fig. 21 (17) viene riportata l'attività di GC di frammenti di membrana di PMN come controllo, barre nere, quando incubati con 0.1 µM di FMLP o 0,1 µM di ANP più 330 M AT per 10'. Nelle colonne grigie è riportata la stessa sperimentazione ma con flusso di °NO di 13 nM/2', generato da 50 nM di dietilendiamina di NONOato.

Si osserva come la presenza di °NO sopprima la produzione di cGMP, si dimostra inoltre che la GC colpita è quella di membrana, sensibile all'azione di ANP.

Nell'istogramma in piccolo si riportano i risultati ottenuti con HBO, già visti alla fig. 19, al posto di °NO, e si ottengono le stesse modificazioni.

Viene rafforzata l'ipotesi che HBO agisca su recettori di membrana che cointeressano l'attività di GC e quindi la produzione di cGMP e quindi l'adesività β<sub>2</sub>-Integrine mediata.

Vista la specularità degli effetti di °NO e HBO, almeno

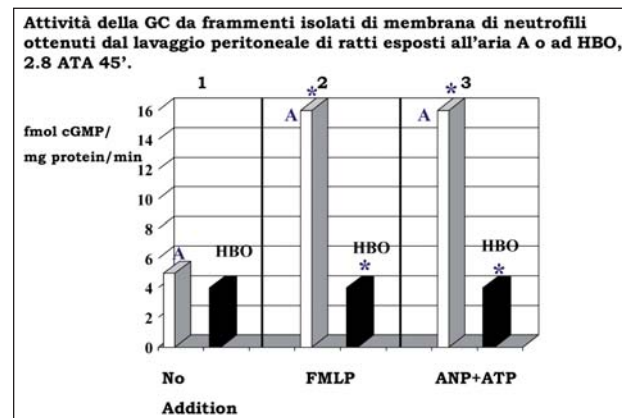


Fig. 19. Nella colonna 1 non si evidenziano differenze significative fra i due gruppi.

Nella colonna 2 i frammenti di membrana sono stati incubati per 10' con 0.1 mM FMLP e nella colonna 3 con 0.1 mM di ANP più 330 M ATP.

Dalla sperimentazione si deduce come HBO sia in grado di ridurre l'attività di GC di membrana, considerando che sono GC di membrana è sensibile all'azione di ANP, pertanto il probabile meccanismo d'azione di HBO sulle β<sub>2</sub>-Integrine è mediato dall'inibizione di HBO su GC di membrana, mentre rimane da chiarire il rapporto tra GC, e quindi produzione di cGMP, e β<sub>2</sub>-Integrine.

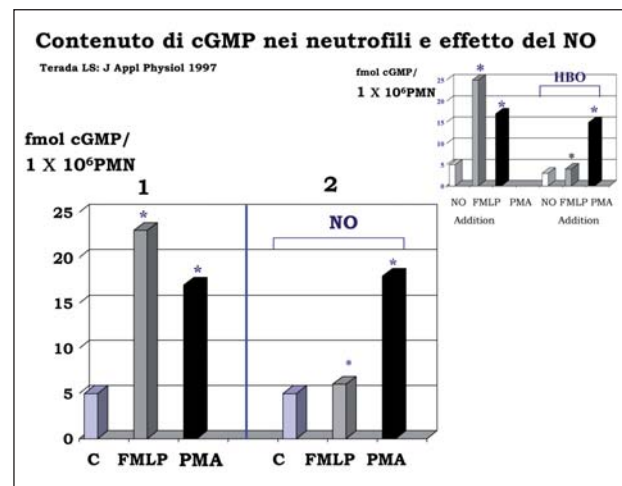


Fig. 20.

in queste sperimentazioni, è necessario indagare se esiste un rapporto dose/dipendente fra flusso di °NO e % di adesività leucocitaria (fig. 22) (17).

Furono ottenuti PMN da lavaggio peritoneale di ratti e quindi esposti a concentrazioni di etilendiamina NONOato per 2', in concentrazioni tali da produrre flussi di °NO progressivamente crescenti da 2 a 133 nmol/mL.

In parte con questa sperimentazione si capisce il ruolo di °NO: inibitore della adesività dei PMN fino a 13 nmol/mL, stimolatore della adesività a concentrazioni crescenti

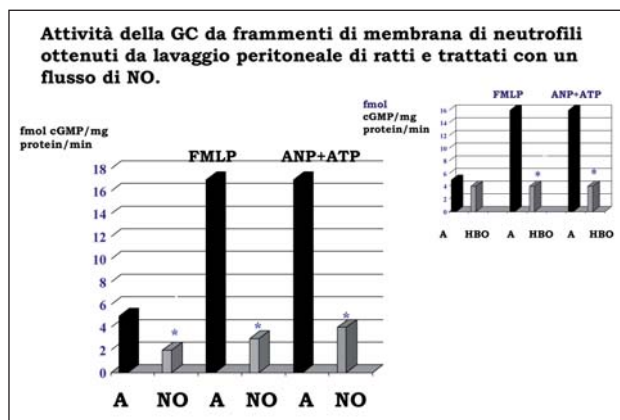


Fig. 21.

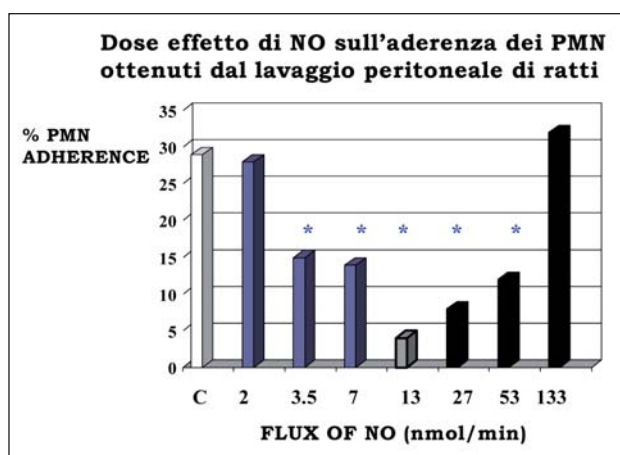


Fig. 22.

e quindi, in ultima analisi, dotato di potere pro-infiammatorio a flussi più elevati. Nel diagramma sottostante, fig. 23, (17) si è cercato di rappresentare, in modo sintetico, le interazioni fra °NO, HBO, β<sub>2</sub>-Integrine.

■ **Aspetti clinici della I/R**

Situazioni patologiche che sottendono il fenomeno di I/R

1. F.ischemia-riperfusionem del m. scheletrico (18-19)
2. F. i.-r. cerebrale (20)
3. Sequestro polmonare di PMN dopo i.-r. intestinale (21-22)
4. I.-r. cerebrale dopo avvelenamento da CO (23)
5. Sequestro di neutrofilii cerebrali dopo MDD (24)
6. Sequestro polmonare di neutrofilii dopo inalazione di fumo (25)
7. I.-r. dopo trombolisi coronarica (26)

A parere del sottoscritto al momento sono indicazioni

accettabili della HBO quelle indicate ai numeri 1, 4 e 5. Per le altre indicazioni sono necessarie ulteriori studi clinici.

Strategie terapeutiche:

1. Deplezione dei neutrofilii.
2. Blocco dell'attivazione endocellulare o distorsione della sintesi di RNAm, tramite oligonucleotidi antisenso specifici.
3. Inibizione dei fattori nucleari di sintesi delle proteine della adesività (NF-kB).
4. Blocco della funzione recettore-agonista (anticorpi monoclonali e altri mezzi: HBO, AO = Ossigeno acqueo, utilizzato dopo trombolisi coronaria per limitare i danni da ri-perfusione).

Al momento ciò che è possibile attuare in clinica sembrerebbe limitato a quanto riportato nel numero 4, in realtà, a titolo informativo, si è visto come un controllo severo della glicemia abbia un notevole effetto endotelio-protettore, fig. 24 (27).

Il controllo "intensivo" della glicemia è comunemente accettato come uno dei risultati da ottenere rapidamente entro 12 ore sia nella terapia degli stati di sepsi acute sia in tutte le situazioni patologiche in cui sia necessario infondere glucosio. Gli stati iperglicemici favoriscono varie complicanze: dall'infezione degli apparecchi endovascolari, alla lesione diretta dell'endotelio. La somministrazione controllata di insulina ha migliorato l'outcome di pazienti ricoverati per varie patologie in terapia intensiva.

Nei diagrammi soprariportati, fig. 24, si configura una possibile relazione fra glicemia e livelli di circolanti di °NO, ICAM-1 e E-selectine, confermando che il controllo intensivo della glicemia migliora "l'outcome" clinico.

Nel diagramma di sinistra: in ordinata è riportato il valore di °NO circolante come nitrato, le barre bianche sono i valori di °NO del gruppo di pazienti (n = 224) sottoposti ad insulino-terapia in modo convenzionale, misurato nel giorno del ricovero (Adm) e a 7 giorni, le barre grigie sono i valori di °NO, misurati negli stessi tempi, nel gruppo pazienti (n = 181) sottoposti a insulino-terapia "intensiva".

La barra scura indica i valori di un gruppo controllo. La riduzione di °NO circolante è significativa a 7 giorni nel gruppo sottoposto a terapia insulinica intensiva.

Nel diagramma di destra sono misurati negli stessi gruppi di pazienti, negli stessi tempi, i valori di ICAM-1 e E-selectine circolanti, riportati in ordinata, si ritiene che vi sia una proporzionalità diretta fra queste proteine dell'adesività circolante e la loro espressione di membrana. È evidente per entrambe le misurazioni una riduzione significativa dei livelli sierici di proteine a 7 giorni.

L'insulina dunque come farmaco anche endotelio protettore.

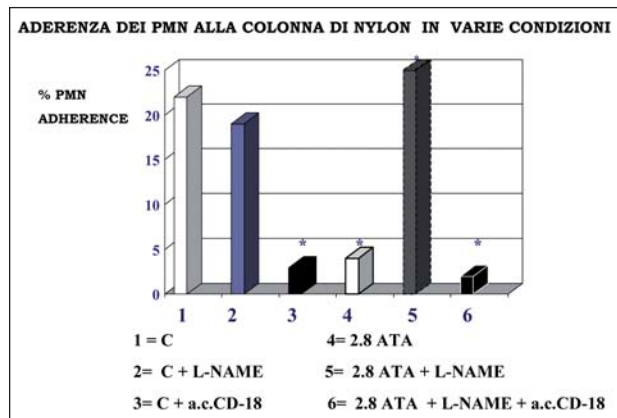


Fig. 23.

1. C = sangue ottenuto da ratti controllo  
 2. C+L-NAME = sangue ottenuto da ratti pretrattati con 40mg/kg di L-Nitroarginina-metil estere (inibitore di NOS) e quindi sacrificati dopo 2, 45 ore, oppure pretrattati con L-Name e quindi sottoposti dopo due ore a 2.8 ATA per 45' (5), oppure a L-NAME +2.8 ATA + a.c. CD 18 (6)  
 3. C+a.c. CD18 = sangue ottenuto da ratti trattati con anticorpi specifici anti CD18 (200 mg/ml).  
 Tutti i campioni di sangue sono stati fatti passare attraverso colonne di nylon e quindi valutata la % di adesività dei PMN. Si evidenzia come L-NAME di per sé non abbia effetto sulla adesività, mentre gli anticorpi anti CD18 la bloccano fortemente, così come l'esposizione ad HBO, ma la somministrazione di L-NAME inibisce l'azione di HBO, con forte incremento della adesività, che viene ripristinata in presenza di a.c. anti CD18. Pertanto si evince che l'azione di HBO è sicuramente diretta sulla funzione delle  $\beta_2$ -Integrine (CD18), tramite una via  $^{\circ}\text{NO}$  dipendente.

### ■ Bibliografia essenziale

- 1) Vezzani G. È utile conoscere le  $\beta_2$ -Integrine? Med. Sub.Iper. 1997;7-11.
- 2) Grace PA. Ischemia-Reperfusion Injury. London: Blackwell Science,1999.
- 3) Carden DL. Pathophysiology of ischemia-reperfusion. J Pathol 2000;190:255-66.
- 4) Banda MA et al. Post-ischemic endothelium-dependent vascular reactivity in preserved in adhesion molecule-deficient mice. Am J Physiol 1997;273:H2721-2725.
- 5) Kuo L. Endothelial modulation of arteriolar tone. NIPS 1992;7:5-9.
- 6) Skalak R. Flow behaviour of leukocytes in small tubes. Physiology and Pathophysiology of Leukocyte Adhesion New York: Oxford University Press, 1995:97-115.
- 7) Jerome SN et al. Microvascular dysfunction in post-ischemic skeletal muscle. J Invest Surg. 1994;7:3-16.
- 8) Horie Y et al. Hepatic leukostasis and hypoxic stress in adhesion molecule deficient mice after gut ischemia-reperfusion. J Clin Invest 1997;99:781-8.
- 9) Harris NR. Opposing effects of L-NAME on capillary filtration rate in the presence or absence of neutrophils. Am J Physiol 1997;273:G1320-1325.
- 10) Kubes P. Leukocyte-endothelial cell interactions invoked by mast cells. Cardiovasc Res 1996;32:699-708.
- 11) Ichikawa H et al. Molecular mechanisms of anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. Circ Res 1997;81:922-931.
- 12) Kurose I et al. Molecular determinants of reperfusion-

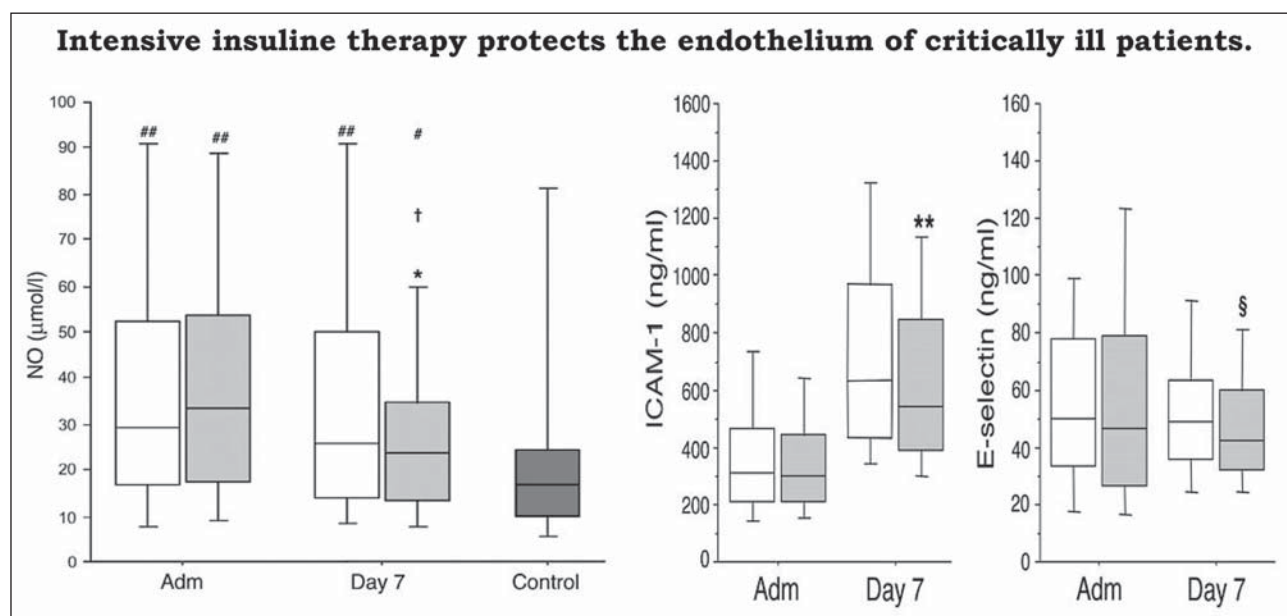


Fig. 24.

- induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res* 1994;74:336-43.
- 13) Carden DL et al. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol* 1998;275:H385-92.
  - 14) Kubes P et al. Nitric Oxide donors prevent integrin-induced leukocyte adhesion, but not P-Selectin dependent rolling in post-ischemic venules. *Am J Physiol* 1994;267:H931-7.
  - 15) Kim CD et al. Rebamipide Inhibits Neutrophil Adhesion to Hypoxia/Reoxygenation-Stimulated Endothelial Cells via Nuclear Factor- $\kappa$ B Dependent Pathway. *J Pharmacol Experiment Therapeutics*; 2000; vol 294,3,864-869.
  - 16) Thom SR. Oxygen and the endothelium. *Lezione magistrale* 2006, 03, 28. *Master Medicina Subacquea e Iperbarica*. C.N.R. Pisa.
  - 17) Thom SR. Effects of hyperoxia in neutrophil adhesion. *UHM* 2004; vol. 31, No 1.
  - 18) Zamboni WA et al. Morphologic analysis of the microcirculation during reperfusion of ischemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen. *Plastic Reconstruct Surg* 1993;91:1110-1123.
  - 19) Wong HP et al. Effect of hyperbaric oxygen on skeletal muscle necrosis following primary and secondary ischemia in a rat model. *Surgical Forum* 1996; 97:706-707.
  - 20) Atochin DA et al. Neutrophil sequestration and the effect of hyperbaric oxygen in a rat model of temporary middle cerebral artery occlusion. *Undersea and Hyperb Med* 2001;27:195-190.
  - 21) Tjarnstrom J et al. Effects of hyperbaric oxygen treatment on neutrophil activation and pulmonary sequestration in intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Eur. Surg. Res.* 1999;31:147-154.
  - 22) Yang ZJ et al. Hyperbaric O<sub>2</sub> reduces intestinal ischemia-reperfusion-induced TNF- $\alpha$  production and lung neutrophil sequestration. *Eur J Appl Physiol* 2000;85:96-103.
  - 23) Thom SR. Functional inhibition of neutrophil  $\beta_2$  integrins by hyperbaric oxygen in carbon monoxide mediated brain injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;123-248-256.
  - 24) Martin JD et al. Vascular leukocyte sequestration in decompression sickness and prophylactic hyperbaric oxygen therapy in rats. *Aviat Space Environ Med* 2002;73:565-569.
  - 25) Thom SR et al. Inhalation-induced alveolar lung injury is inhibited by hyperbaric oxygen. *Undersea and Hyper Med* 2001;29:28:175-179.
  - 26) Trabattoni D et al. Perfusione iperossiemica dell'infarto miocardico acuto. *G. Ital. Card. Invasiva*; 2004;1-11.
  - 27) Langouche Lies et al. Intensive insulin therapy protects the endothelium of critically ill patients. *J Clin Invest*;2005,115:2277-2286.