

Introduzione

Il sistema immunitario e la sua regolazione: l'importanza del “cross talk” fra risposta innata e risposta adattativa

Il sistema immunitario si è lentamente evoluto al fine di dare una rapida ed efficace protezione dell'organismo contro i patogeni. Questo complesso sistema di difesa si è avvalso di differenti meccanismi di “killing” tutti estremamente potenti. Tra questi anche quello di regolare le stesse risposte immunitarie al fine di evitare lo sviluppo di autoimmunità conseguente ad un anomalo riconoscimento del “self”. Il sistema immunitario si compone di due tipi principali di risposta:

- non antigene-specifica (immunità innata)
- antigene-specifica (immunità adattativa).

La risposta innata fornisce una risposta immediata e stereotipata ossia caratterizzata da un “pattern” di riconoscimento fisso. Generalmente si sviluppa nel sito di invasione da parte del patogeno ed è amplificata dalla liberazione di diversi fattori solubili che attraggono e attivano altre popolazioni cellulari. L'immunità innata è mediata dalle cellule parenchimali di tutti i tessuti e da cellule con funzioni specifiche come i macrofagi e le cellule natural killer (NK).

L'immunità adattativa invece si sviluppa dopo un periodo di "priming" in organi specializzati lontani dal sito di infezione, è diversificata sulla base di una serie di modificazioni post-trascrizionali ed è caratterizzata dalla comparsa di una proliferazione cellulare antigene-specifica. L'immunità adattativa è mediata da cellule specializzate per la presentazione dell'antigene (cellule dendritiche, CD) e per il suo riconoscimento (linfociti T e B). Entrambe le cellule T e B sono capaci di esplicitare differenti tipi di risposta sia come tipo che come durata. Il coordinamento di queste risposte è essenziale sia per l'eliminazione del patogeno che per il controllo delle risposte contro il "self". Un modello di regolazione immunitaria in questo senso è presentato nella Figura 1 che riassume quanto sopra discusso. In questo modello la CD svolge un ruolo cruciale. Queste cellule sono capaci di processare gli antigeni provenienti dai patogeni così come da cellule apoptotiche o necrotiche nei tessuti periferici e possono presentarli in presenza di MHC specifici alle cellule T nella milza e nei linfonodi. La finalità di questa presentazione può variare ed è strettamente dipendente dalla presenza o meno di segnali aggiuntivi (costimolazione) derivanti dall'immunità innata. Infatti, gli antigeni derivati da cellule apoptotiche in assenza di segnali di costimolo da parte dell'immunità innata generano cellule T regolatorie capaci di sopprimere l'autoimmunità. Al contrario, gli antigeni provenienti da microorganismi esterni o da cellule infettate evocano una serie di segnali dell'immunità innata che provocano una potente attivazione delle risposte specifiche B e T. I diversi tipi di risposta T (T helper 1 o 2) sono il risultato di una selezione mediata da particolari citochine secrete come l'interleuchina (IL)-12. In accordo con questo modello, sia la tolleranza immunitaria nei confronti del "self" che

l'attivazione immunitaria contro i patogeni sono il risultato di meccanismi di processazione antigenica simili che differiscono nella sede e nel modo in cui l'antigene viene incontrato e processato. A tutti i livelli, la cross-comunicazione fra immunità innata e adattativa è soggetta a regolazione in senso positivo o negativo che può essere geneticamente variabile. Ne consegue che la manipolazione dell'interazione fra queste risposte può portare dei benefici nella prevenzione così come nel trattamento di diverse patologie che riconoscono una patogenesi immunitaria.

Vitamina D

Generalità

La vitamina D è un secosteroide che, insieme alle vitamine A, E e K, appartiene al gruppo delle vitamine liposolubili; fu scoperta da Mc Collum nel burro e nell'olio di tonno nei primi del 1900 (Mc Callum, 1922).

La vitamina D può essere assunta come tale con gli alimenti o sintetizzata nell'organismo. In quest'ultimo caso il 7-deidrocolesterolo, formato dalle cellule epidermiche, per effetto delle radiazioni ultraviolette subisce l'apertura fotochimica di un anello, formando la pre-vitamina D che viene poi lentamente trasformata in *vitamina D₃* o *colecalfiferolo* (Figura 2A). Il sistema di trasporto plasmatico è specifico per la struttura della vitamina D₃ ma non per la pre-vitamina. Molti tessuti animali e vegetali, utilizzati come alimenti, contengono un'altra pre-vitamina, l'*ergosterolo*, che per irradiazione possono essere arricchiti di *vitamina D₂* o *calciferolo* (Figura 2A). Il calciferolo è pertanto costituito

artificialmente dall'ergosterolo irradiato e costituisce la vitamina D₂. Le funzioni della vitamina D₃ sono connesse alla regolazione del metabolismo del calcio e del fosfato. L'interazione della vitamina D₃ con il suo recettore attiva la trascrizione inducendo la sintesi di proteine implicate nella regolazione del metabolismo del calcio e del fosforo. A livello intestinale la vitamina D₃ favorisce l'assorbimento di calcio e fosforo mentre a livello renale agisce sinergicamente al paratormone nel favorire il riassorbimento di calcio. In tal modo questa vitamina contribuisce a mantenere i livelli fisiologici di calcio nel siero e a favorirne il deposito nell'osso. Occorre infine sottolineare che la vitamina D₃ di per sé non rappresenta la sostanza attiva responsabile di questi effetti. Essa infatti attraverso una serie di reazioni nel fegato e nel rene deve essere prima convertita in un altro composto che rappresenta il prodotto finale attivo.

Metabolismo

Sia la vitamina D₂ che la vitamina D₃ assunte con gli alimenti si assorbono nel tenue e si accumulano nel fegato. Nel reticolo endoplasmatico dell'epatocita ha luogo l'idrossilazione del carbonio C25, per azione delle ossigenasi miste e del citocromo P 450. Il 25-OH colecalciferolo, formato nel fegato non è attivo di per sé, ma richiede l'ulteriore idrossilazione nel rene. Nei mitocondri delle cellule a livello renale, l'enzima 25-OH-D₃ 1- α -idrossilasi trasforma il precursore epatico nella forma attiva: 1,25(OH)₂D₃ o *calcitriolo*, presente anche in diverse formulazioni farmaceutiche.

La sintesi di 1,25(OH)₂D₃ nel rene risulta regolata dalla concentrazione plasmatica del calcio, del paratormone e dalla concentrazione del fosforo. L'ipocalcemia causa una riduzione della formazione del calcitriolo e determina l'aumento del paratormone che a sua volta attiva l'enzima 25-OH-D₃ 1- α -idrossilasi e stimola la

sintesi di calcitriolo. L'1,25(OH)₂D₃ viene trasferita nell'intestino, nelle ossa e nell'epitelio renale dove promuove rispettivamente il trasporto attivo del calcio e del fosfato dal lume intestinale al compartimento extracellulare, la mobilizzazione del calcio dall'osso fungendo da fattore permissivo dell'ormone paratiroideo e il riassorbimento tubulare del calcio. La conseguenza di questi processi è l'aumento della calcemia (Figura 2B). L'elevazione del calcio a sua volta inibisce la secrezione del paratormone e questo sospende la propria influenza stimolante sull'enzima idrossilasico che nel rene forma l'1,25(OH)₂D₃.

Cenni storici sugli effetti immunitari della 1,25(OH)₂D₃

Recettori della 1,25(OH)₂D₃ sulle cellule immunitarie

La prima evidenza che recettori della forma attiva della vitamina D₃, 1,25(OH)₂D₃, siano presenti sulle cellule del sistema immunitario è venuta dall'osservazione degli effetti pro-differenziativi della 1,25(OH)₂D₃ sulle linee cellulari murine mielomonocitarie (Abe et al, 1981) e da diversi studi di biochimica che dimostravano la presenza del recettore della vitamina D (Vitamin D Receptor, VDR) nel timo umano e nei leucociti periferici. Successivamente diversi Ricercatori hanno confermato la presenza costitutiva di VDR in monociti murini e umani e hanno dimostrato che la sua espressione può essere indotta da diversi segnali di attivazione sui linfociti (Bhalla et al, 1983; Manolagas et al, 1985 e 1986). In particolare, in tessuti come timo e tonsilla, l'espressione di VDR è confinata a cellule in stato precoce di attivazione e durante la mitogenesi.

Non appena sono stati identificati i segnali di attivazione e i diversi sottotipi T cellulari, è stato anche dimostrato che l'espressione di VDR è notevolmente aumentata durante l'attivazione del T Cell Receptor (TCR) e di recettori accessori, ed è comparabile nelle sottopopolazioni T linfocitarie CD4+ e CD8+.

Conseguenze immunitarie del deficit di 1,25(OH)₂D₃

In parallelo con le osservazioni sull'espressione di VDR nelle sottopopolazioni cellulari immunitarie, un piccolo numero di lavori scientifici ha documentato la presenza di alcune anomalie immunitarie sia in animali che pazienti con deficit di vitamina D. Bar-Shavit (Bar-Shavit et al, 1981) e Toss (Toss et al, 1983) hanno documentato un significativo deficit di risposta macrofagica e di risposte antigene-specifiche in condizioni di carenza di vitamina D. Più recentemente Yang (Yang et al, 1993) e collaboratori hanno dimostrato una ridotta risposta da ipersensibilità ritardata nei topi con severo deficit di vitamina D. Questi dati, in aggiunta con l'osservazione che i soggetti affetti da rachitismo hanno una particolare suscettibilità alle infezioni, rappresentano un apparente paradosso alla luce di un'abbondante documentazione scientifica che invece sostiene in maniera ormai piuttosto solida l'effetto immunosoppressivo della forma attiva della vitamina D e dei suoi analoghi. In sostanza si potrebbe ipotizzare che, mentre in condizioni fisiologiche, 1,25(OH)₂D₃ promuove, come molecola regolatrice, le risposte immunologiche normali, in condizioni patologiche questa funzione regolatoria viene a mancare manifestandosi con un'alterazione dei meccanismi sia dell'immunità innata che di quella adattativa.

Effetti immunitari della 1,25(OH)₂D₃ sui singoli tipi cellulari

Monociti, Macrofagi e Cellule Dendritiche

All'epoca in cui fu dimostrata la presenza di VDR sulla superficie dei monociti e sulle linee cellulari mielomonocitiche è stato anche evidenziato che il monocita altro non è che il precursore del macrofago tissutale capace di secernere una serie di citochine pro-infiammatorie e di provvedere, come cellula fagocitica, alla difesa contro le infezioni (Rigby et al, 1984; Xu et al, 1993). Diversi studi hanno dimostrato che l'1,25(OH)₂D₃ induce la differenziazione dei monociti in macrofagi. Adams e collaboratori hanno dimostrato che macrofagi di soggetti affetti da patologie granulomatose, come sarcoidosi e tubercolosi, sono in grado di generare 1,25(OH)₂D₃ (Barnes et al, 1989; Adams et al, 1985).

L'induzione dell'enzima 25-idrossi-D₃-1 α -idrossilasi nei macrofagi, a differenza di quanto accade nel rene, viene mediata dall'interferone (IFN)- γ (Overbergh et al, 2000). Overbergh ha inoltre dimostrato che può essere indotta anche dal lipopolisaccaride (LPS) o da infezioni virali (Overbergh et al, 2000).

Nel complesso le osservazioni riportate suggeriscono un ruolo della 1,25(OH)₂D₃ nella regolazione dei processi infiammatori localizzati e mediati dai macrofagi. In linea con questo modello, è stato riscontrato che il liquido pleurico di soggetti affetti da tubercolosi polmonare è ricco di 1,25(OH)₂D₃ (Barnes et al, 1989). Rigby e collaboratori hanno successivamente dimostrato che i monociti esposti a 1,25(OH)₂D₃ perdono la capacità di esporre MHC di classe II e diverse molecole di costimolo necessarie per una piena attivazione della cellula T (Rigby et al, 1990).

Una più chiara comprensione di questi risultati si è ottenuta grazie a una serie di studi in campo immunologico, in particolare quelli inerenti la caratterizzazione di recettori di costimolo espressi sulle APC quali CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) e CD40 e l'identificazione di sottotipi di APC specializzate, derivate dai monociti, ossia le CD. Oggi le CD sono considerate come le cellule induttrici delle risposte immuni T-mediate in vivo e, quando pienamente mature, capaci di esprimere elevati livelli di MHC di classe I, CD80, CD86, CD40 e di altre molecole accessorie con diverse funzioni (Mellman et al, 2001). Le CD sono presenti in tutti gli organi, hanno la capacità di migrare per incontrare e processare gli antigeni in modo da trasferirli nei tessuti linfoide specializzati dove la risposta immunitaria viene iniziata. Il processo attraverso il quale la CD diventa capace di stimolare pienamente la cellula T viene chiamato "maturazione" (Mellman et al, 2001). Poiché un'inappropriata stimolazione della cellula T può portare ad un'eccessiva e non necessaria risposta immune T-mediate, questo processo è soggetto a diversi meccanismi di regolazione positivi e negativi. Inoltre è stato recentemente scoperto un ruolo attivo per la CD immatura nei confronti della tolleranza verso antigeni "self" (Heath et al, 1998). In questo senso l' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è risultata essere una molecola importante in quanto capace di inibire la maturazione della CD attraverso un meccanismo VDR-dipendente (Griffin et al, 2000). Diversi studi condotti su monociti umani o su modelli animali hanno dimostrato che in presenza di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ si riduce l'espressione delle molecole MHC di classe II, delle molecole di costimolo CD80, CD86, e CD40 e di altre proteine accessorie (CD1a e CD83). Questo effetto sembra essere dose-dipendente. La secrezione di IL-12 da parte delle CD è anch'essa ridotta in presenza di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, mentre la produzione di IL-10 sembra essere aumentata anche se non tutti gli studi l'hanno confermato (Penna et al, 2000; Van Halteren et al, 2002). Di fatto, funzionalmente,

la capacità delle CD trattate con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ di indurre attivazione, proliferazione, e secrezione di citochine è profondamente inibita.

Linfociti T

Oltre all'effetto della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sulle CD sia sul piano fisiologico che su quello terapeutico, è stato dimostrato anche un effetto inibitorio diretto della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sulle cellule T. Un'estesa serie di lavori è stata pubblicata fra il 1984 e il 1990 da diversi gruppi quali quelli di Rigby, Manolagas, e Lemire. In questi lavori è stato ampiamente dimostrato che in cellule umane concentrazioni di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ comprese fra 10^{-12} e 10^{-8}M sono capaci di inibire la proliferazione T cellulare indotta da stimolazione antigenica o da leptina, la secrezione di IL-2, e la progressione dalla fase G_{1a} a quella G_{1b} . (Rigby et al, 1984, 1985, 1987, 1988, 1990; Manolagas et al, 1986; Lemire et al, 1984, 1985, 1995). L'intensità di questa inibizione si è rivelata essere alquanto variabile e in alcuni studi sembra poter essere parzialmente o completamente superata dall'aggiunta di IL-2 o di stimoli più potenti. Che la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ abbia un'azione diretta di inibizione sulle cellule T è emerso dagli studi sulle cellule T purificate e sui cloni T (Reichel et al, 1987; Rigby et al, 1990). Sebbene l'inibizione della produzione di IL-2 sia stata ripetutamente provata nei diversi studi come un meccanismo centrale di inibizione T, altri studi hanno dimostrato un'inibizione della produzione di IFN- γ , di GM-CSF e di IL-4, IL-2-indipendente. Anche se l'espressione di VDR è a livelli comparabili nelle cellule CD4+ e in quelle CD8+, è stato evidenziato da più studi che le cellule CD4+ sono il target preferenziale dell'inibizione $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -mediata durante l'attivazione primaria in vitro (Provvedini et al, 1989). Se questo target preferenziale occorra anche in vivo o durante l'attivazione secondaria

(“memory”) resta da essere determinato, sebbene Meehan e DeLuca abbiano osservato che nel modello murino di malattia demielinizzante (Encefalomielite Allergica Sperimentale, EAE) l’effetto protettivo esercitato dalla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ viene preservato nei topi privi di cellule CD8^+ (Meehan et al, 2002). L’identificazione di sottopopolazioni di cellule T CD4^+ con differente pattern citochinico T helper1(Th1) e T helper2 (Th2) così come la recente scoperta di un altro sottotipo cellulare con attività soppressoria (cellule T regolatorie, T-reg) ha stimolato molto interesse verso questa popolazione e verso i possibili effetti della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ su di essa, particolarmente nel contesto delle patologie immuno-mediate. La polarizzazione delle cellule T CD4^+ attivate verso il fenotipo Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- α secernente) o verso il fenotipo Th2 (IL-4, 5, 10, 13 secernente) rappresenta il maggior determinante nella natura delle successive risposte immunitarie cellulari e umorali essendo anche capace di perpetuare la propria risposta in quanto un sottotipo è capace di inibire l’altro. L’influenza della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sulla polarizzazione T helper è stata oggetto di numerosi studi (Lemire et al, 1995; Boonstra et al, 2001). Sebbene i risultati di alcuni studi siano stati conflittuali, si possono comunque fare tre principali considerazioni: 1) la generazione di risposte di tipo Th1 è potentemente inibita dalla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sia in vivo che in vitro; 2) durante l’attivazione delle cellule T che occorre in particolari condizioni, la presenza di concentrazioni sopra fisiologiche di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ favorisce l’emergenza di un predominante fenotipo Th2; 3) la produzione di IFN- γ da parte di cellule T precedentemente attivate è inibita potentemente, molto più che non la produzione di IL-4. A questo proposito diversi studi evidenziano che $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ non up-regola direttamente IL-4 ma può invece avere un modesto effetto inibitorio sul promotore di IL-4 nelle cellule T naives, pertanto la sua influenza sulla polarizzazione T helper sembrerebbe

favorire il fenotipo Th2, particolarmente dopo ripetute stimolazioni (Staeva-Vieira et al, 2002). A riprova di ciò, nei topi protetti da EAE, da lupus murino, e da diabete mellito autoimmune attraverso la somministrazione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è stata documentata la polarizzazione Th2 in vivo (Cantorna et al, 1995; Overberg et al, 2000). Da alcuni gruppi è stata inoltre dimostrata la capacità da parte della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ di indurre il fenotipo T-reg. Le caratteristiche principali delle cellule T-reg includono la coespressione del CD4 e del CD25, la secrezione di citochine ad azione inibitoria quali IL-10 e TGF- β , e l'abilità di inibire potentemente l'attivazione antigene-specifica delle cellule T. Il fatto che sia stato riportato che la capacità inibitoria delle T-reg si espliciti sia attraverso meccanismi contatto-dipendenti che attraverso meccanismi contatto-indipendenti suggerisce che coesistono più popolazioni all'interno delle T-reg stesse. In un modello murino di trapianto di isole pancreatiche, Gregori e collaboratori hanno dimostrato che la combinazione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e micofenolato mofetile, un comune immunosoppressore, non soltanto protegge dal rigetto ma aumenta la proporzione di cellule CD4+CD25+ nei linfonodi loco-regionali. Inoltre il traferimento di queste cellule negli animali non trattati conferisce protezione dal rigetto, una caratteristica questa propria delle cellule T-reg (Gregori et al, 2001). Osservazioni simili sono state fatte dallo stesso gruppo nel modello animale di diabete (Gregori et al, 2002). In questo modello, il trattamento con un analogo della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ si è dimostrato sufficiente nell'indurre un'attività protettiva T-reg-mediata. Gli Autori concludono che la promozione delle cellule T-reg da parte della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è il risultato di un effetto diretto della stessa sulle CD piuttosto che sulle cellule T. In un sistema in vitro privo di cellule APC, Barrat e collaboratori hanno dimostrato che ripetute stimolazioni delle cellule CD4+ in presenza di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e desametasone hanno indotto la selezione di una popolazione

cellulare capace di secernere IL-10 con capacità di sopprimere il processo di demielinizzazione autoimmune in vivo in modo antigene-specifico (Barrate et al, 2002). Pertanto sebbene il ruolo della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nella generazione di una popolazione T-reg capace di indurre tolleranza al self sia ancora “speculativo”, la combinazione di agonisti della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con agenti immunomodulanti potrebbe rappresentare una specifica promessa a questo riguardo.

Linfociti B e Cellule Natural Killer

L'influenza della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ su altri tipi cellulari come cellule B secernenti anticorpi e cellule NK è stata poco studiata. Diversi Autori hanno dimostrato un'inibizione di produzione di immunoglobuline IgM e IgG mitogeno- e antigene-stimolata da parte di diversi agonisti della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, in vitro e in vivo (Yang et al, 1993; Iho et al, 1986; Jordan et al, 1990) Di fatto tuttavia in questi studi non è stato possibile verificare se il risultato fosse l'effetto indiretto sulle cellule T o piuttosto quello diretto sulle cellule B. Provvedini e collaboratori hanno però dimostrato un effetto di inibizione ad opera della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sulla produzione di immunoglobuline in cellule B Epstein Barr-trasformate. Nello stesso studio è stato dimostrato che le cellule B trasformate possono esprimere il recettore per $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, provando quindi che anche queste cellule, in particolari condizioni, possono rispondere a quest'ormone (Provvedini et al, 1986). Per ciò che concerne le cellule NK, un sottotipo di cellule T e non-T capaci di indurre lisi cellulare, non si conoscono in modo dettagliato ad oggi gli effetti indotti dalla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Alcuni Autori hanno riportato un effetto inibitorio sull'attività delle NK ma non è stato dimostrato alcun effetto sulla loro azione citotossica (Merino et al, 1989).

La modulazione dei segnali intracellulari 1,25(OH)₂D₃

indotti

L'attivazione dei linfociti e delle cellule APC è il risultato dell'espressione genica iniziata attraverso diverse vie di segnalazione intracellulare. I meccanismi di "signaling" intracellulari sono in parte propri delle cellule T e APC in parte condivisi da altri tipi cellulari. Di nota, il meccanismo d'azione di molti immunomodulatori è da ricondurre proprio all'azione su una o più di queste vie. In linea generale il primo meccanismo d'azione della 1,25(OH)₂D₃ è quello di regolare la trascrizione di singoli geni attraverso un complesso legante il DNA con il VDR ed altre proteine (Carlberg et al, 1998). Un target genico della 1,25(OH)₂D₃ abbastanza studiato è NFκB. La via di NFκB è rappresentata da una serie di molecole che quando traslocate al nucleo come etero- o omodimeri regolano l'espressione genica di molte proteine. Questa via controlla la differenziazione, maturazione, attivazione e sopravvivenza delle APC, dei linfociti e di altri tipi cellulari. Esiste evidenza del coinvolgimento di NFκB nella regolazione di diverse funzioni del sistema immunitario. La modificazione dei livelli intracellulari e della funzione di proteine legate ad NFκB come Rel-B e c-Rel indotta dalla 1,25(OH)₂D₃ da sola o in combinazione con altri immunosoppressori si associa a una serie di effetti quali la secrezione di IL-12, la regolazione delle molecole MHC, l'espressione di molecole di costimolo in risposta a segnali dell'immunità innata, la proliferazione e la sopravvivenza T cellulare (D'Ambrosio et al, 1998; Yu et al, 1995). Ci sono evidenze di complessi VDR-1,25(OH)₂D₃-dipendenti con regioni promotore di attivazione genica T cellulare. A questo proposito Cippitelli e Santoni

hanno osservato che l'inibizione dell'attività del promotore dell'IFN- γ umano è associata a una specifica affinità di VDR e del recettore X retinoico per due differenti regioni del promotore (Cippitelli et al, 1998). Il meccanismo dell'inibizione trascrizionale conseguente al legame con il DNA non è stato identificato ma può includere l'interferenza con il reclutamento di fattori addizionali di trascrizione come AP-1 o una diretta interferenza con la macchina di trascrizione. E' possibile che altri meccanismi molecolari, sia nucleari che citoplasmatici, verranno identificati come capaci di causare gli effetti immunomodulatori della 1,25(OH) $_2$ D $_3$.

Gli effetti della supplementazione con 1,25(OH) $_2$ D $_3$ nei modelli sperimentali di patologia immuno-mediata

Sono stati condotti molti studi in vivo allo scopo di verificare gli effetti della 1,25(OH) $_2$ D $_3$ e dei suoi analoghi nelle patologie immuno-mediate. Questi modelli, nella maggior parte dei casi sviluppati nel topo e nel ratto, hanno avuto il pregio di dimostrare l'effetto terapeutico potenziale della 1,25(OH) $_2$ D $_3$ rispetto a una possibile applicazione nel corrispettivo patologico umano. Inoltre lo sviluppo di diversi analoghi della 1,25(OH) $_2$ D $_3$ e il loro impiego nei modelli animali ha permesso di testarne l'efficacia e la tossicità sempre in vista di un possibile loro impiego nella patologia umana. I modelli animali impiegati per lo studio dell'immunomodulazione della 1,25(OH) $_2$ D $_3$ possono essere raggruppati in tre categorie principali:

1) Patologie autoimmuni su base genetica. Molte anche se non tutte le patologie autoimmuni umane hanno una base genetica. L'influenza dei polimorfismi singoli o multipli è stata ampiamente dimostrata. Due modelli in particolare sono stati

esaminati per studiare l'effetto immunomodulatorio della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Il primo di questi è il modello murino di lupus eritematoso $\text{MRL}^{\text{lpr/lpr}}$ dove una singola mutazione genetica porta all'inattivazione della via apoptotica Fas-mediata. Fra le varie manifestazioni di autoimmunità sistemica ci sono la linfoproliferazione sistemica, la nefrite da immunocomplessi, la poliartrite, le manifestazioni cutanee e la generazione di anticorpi anti-DNA. Koizumi et al hanno dimostrato che i topi $\text{MRL}^{\text{lpr/lpr}}$ trattati dalla nascita per diverse settimane con analoghi della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hanno presentato una significativa riduzione della linfoproliferazione, della nefrite, dell'artrite con un'aumentata sopravvivenza (Koizumi et al, 1985). Lemire ha studiato gli effetti della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sui topi $\text{MRL}^{\text{lpr/lpr}}$ a concentrazioni non ipercalcemizzanti e ha evidenziato un miglioramento della nefrite e delle lesioni cutanee senza osservare modificazioni della linfoproliferazione (Lemire et al, 1992). Un secondo modello, sempre murino, nel quale sono stati ampiamente studiati gli effetti terapeutici della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è quello del diabete mellito non associato ad obesità (non-obese diabetes (NOD) mouse). In questo modello polimorfismi multipli portano nel loro insieme allo sviluppo di un diabete mellito autoimmune. Il gruppo di Mathieu e Bouillon ha dimostrato che il trattamento dei topi NOD con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o suoi analoghi prima dell'inizio della malattia può ridurre considerevolmente il conseguente sviluppo di infiltrazione linfocitaria nel pancreas senza indurre una condizione di immunodepressione (Mathieu et al, 1992). Questo dato è stato recentemente confermato da Gregori e collaboratori usando analoghi della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ privi di effetto ipercalcemizzante (Gregori et al, 2002). Questi dati hanno suggerito come la somministrazione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o dei suoi analoghi possa esercitare un effetto benefico quando intrapresa prima dell'inizio delle manifestazioni cliniche della patologia. Casteels et al hanno inoltre esaminato

l'efficacia terapeutica di diversi analoghi della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ somministrati dopo lo sviluppo dell'insulite in topi NOD che hanno ricevuto trapianto di isole pancreatiche e nei quali è ricorrente l'autoimmunità. Nello studio è emerso che mentre la monosomministrazione di un analogo della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ esercita un lieve effetto sul processo autoimmune e sulla distruzione delle isole pancreatiche, la co-somministrazione di un analogo della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con altri agenti immunosoppressori quali ciclosporina o $\text{IFN-}\beta$ può ritardare significativamente la progressione o la ricorrenza dell'aggressione autoimmune (Casteels et al, 1998). Lo stesso gruppo ha esaminato il ruolo protettivo di un analogo della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nei confronti del diabete autoimmune nei topi NOD. In particolare nei topi NOD è stata dimostrata una soppressione delle risposte Th1, un effetto "permissivo" sulle risposte Th2, lo sviluppo di cellule T-reg auto-antigene specifiche e il recupero dell'apoptosi da parte dei timociti e delle cellule T effettrici (Casteels et al, 1998; Overberg et al, 2000; Gregori et al, 2002).

2) *Patologie immuno-mediate indotte.* Rispetto alle patologie autoimmuni geneticamente indotte, questi modelli offrono l'opportunità di studiare l'efficacia dell'intervento terapeutico in un momento definito dello sviluppo della patologia in un animale precedentemente sano. Alcuni esempi di patologia immunitaria indotta sperimentalmente nella quale $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ha prodotto un effetto benefico sono: la nefrite indotta da cloruro di mercurio (Lillevang et al, 1992), la nefrite di Heymann (Branisteanu et al, 1993) e l'artrite collagene-indotta (Cantorna et al, 1998). In questi modelli, l'effetto della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o dei suoi analoghi si caratterizza per una parziale inibizione del fenotipo di malattia quando la somministrazione viene iniziata prima o al momento dell'induzione della patologia. Nel caso dell'artrite collagene-indotta, comunque, una completa prevenzione della malattia o il trattamento della stessa può essere ottenuto con la

somministrazione di alte dosi di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Cantorna et al, 1998). Per la nefrite indotta da cloruro di mercurio (Lillevang et al, 1992) e per la tiroidite autoimmune sperimentale (Fournier et al, 1990), un effetto terapeutico additivo può essere ottenuto associando analoghi della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con ciclosporina. Un altro modello di patologia autoimmune indotta nell'animale è l'EAE. L'inoculazione nell'animale geneticamente suscettibile di omogenato spinale contenente la proteina basica della mielina (MBP) o di peptidi MBP-derivati, provoca lo sviluppo di una patologia demielinizzante con "relapse" o remittente, simile alla sclerosi multipla umana. I meccanismi autoimmuni alla base di questa patologia sono stati ampiamente studiati e hanno dimostrato la presenza di una risposta immunitaria di tipo Th1 (Mattner et al, 2000). Effetti benefici da parte della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e dei suoi analoghi è stata riportata da Lemire, Cantorna, Branistenau, e Mattner. Nello studio di Lemire la somministrazione di 100 ng di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a giorni alterni da tre a quindici giorni dall'inoculazione di omogenato spinale porta a una significativa riduzione dell'attività di malattia, a una riduzione degli anticorpi anti-MBP e a un aumento della sopravvivenza rispetto al controllo (Lemire et al, 1991). Cantorna e collaboratori hanno mostrato che la supplementazione orale quotidiana di 20 ng di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è sufficiente a prevenire la demielinizzazione primaria (Cantorna et al, 1996). Inoltre il trattamento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ può bloccare la progressione della malattia demielinizzante anche se questo effetto si perde con la sospensione del trattamento stesso. Simili effetti sono stati osservati da Mattner e collaboratori usando un analogo della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con scarsi effetti ipercalcemizzanti (Mattner et al, 2000). Branistenau e collaboratori hanno dimostrato un effetto benefico della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a dosi sub-terapeutiche quando associata a ciclosporina o sirolimus (Branistenau et al, 1995 e 1997). Quanto al meccanismo

d'azione responsabile del ruolo terapeutico della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nel modello di EAE, i dati sono contrastanti. Cantorna e collaboratori descrivono un aumento dei trascritti di IL-4 e TGF- β nell'encefalo di topi affetti da EAE e una ridotta efficacia della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nei topi "knockout" per IL-4, ipotizzando un effetto terapeutico secondario a una deviazione verso le risposte di tipo Th2 (Cantorna et al, 1998 e 2000). Al contrario Mattner e collaboratori evidenziano un'assenza di effetto sulla produzione di IL-4 quanto piuttosto una profonda soppressione delle risposte Th1 (in particolare un'inibizione dell'IFN- γ) (Mattner et al, 2000).

3) *Trapianto*. Il successo del trapianto d'organo o cellulare è altamente dipendente dalla terapia immunosoppressiva e il modello animale in questo senso rappresenta un importante passaggio per validare nuove molecole immunosoppressive. Uno dei principali scopi della ricerca nel trapianto è volto a cercare di ridurre la tossicità a lungo termine associata all'uso dei comuni immunosoppressori e a identificare gli agenti che possano promuovere immunotolleranza nei confronti del "graft" senza compromettere l'immunità protettiva. Diversi studi sperimentali hanno evidenziato che la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ può esercitare un benefico effetto nell'ambito dell'immunosoppressione post-trapianto perché in grado di esercitare gli effetti sopra descritti con scarsa o assente tossicità. L'efficacia e la sicurezza di questa vitamina sono state infatti indagate in diversi modelli sperimentali di trapianto inclusi quello di cute (Veyron et al, 1993), cuore (Lemire et al, 1992, Johnsson et al, 1995), rene (Redaelli et al, 2002), pancreas (Gregori et al, 2001), intestino (Johnsson et al, 1994) e fegato (Redaelli et al, 2001). In particolare, la combinazione di analoghi della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e ciclosporina o micofenolato mofetile, entrambi comunemente impiegati nel trapianto umano, si è dimostrata in grado di migliorare la sopravvivenza del "graft" comparata all'uso dei singoli agenti. Il beneficio derivato dall'uso della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nel post-trapianto può

inoltre conseguire all'azione favorevole svolta dalla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sulla mineralizzazione ossea e sulla resistenza alle infezioni (Cantorna et al, 1998). Gregori et al hanno evidenziato che nel modello sperimentale di trapianto di isole pancreatiche la combinazione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con micofenolato mofetile può promuovere immunotolleranza specifica inducendo lo sviluppo di cellule T-reg capaci di proteggere il "graft" (Gregori et al, 2001).

Applicazione clinica degli effetti immunomodulatori della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: considerazioni terapeutiche

Nonostante l'abbondanza dei dati scientifici, l'uso degli agonisti della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ per il trattamento delle patologie immunomediate si è limitato all'applicazione topica della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ per il trattamento della psoriasi. Indubbiamente la prima ragione per questo ritardo è legata alla tossicità sistemica della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. C'è attualmente considerevole ottimismo riguardo gli analoghi della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ virtualmente privi di tossicità e con stesso effetto immunomodulatorio (in vitro). In questo senso hanno rilevanza i risultati degli studi sui modelli animali nei quali gli analoghi della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hanno mostrato un vantaggio terapeutico con scarsi effetti collaterali.

Potenza in vitro versus in vivo

La biodisponibilità sistemica della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in vivo dipende dalla sua concentrazione sierica e da quella delle proteine leganti la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (vitamin D Binding Protein, DBP). L'intensità dell'effetto rispetto a uno specifico tessuto target è dipendente dai livelli intracellulari di VDR, dalla concomitante espressione di membri addizionali come il complesso legante il DNA, il recettore retinoico X, e dal "rate" di conversione della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a metaboliti inattivi. Gli analoghi della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ possono differire considerevolmente dalla molecola di partenza sia nella biodisponibilità che nella potenza rispetto al tessuto target sulla base dell'affinità per le proteine di legame, della suscettibilità verso la degradazione e dell'affinità per le modificazioni conformazionali di VDR. Queste complessità in vivo dovrebbero essere tenute in considerazione quando si valuta e interpreta l'effetto della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e dei suoi analoghi in vitro. Infatti sebbene in molti sistemi di coltura sia presente siero, che rappresenta una fonte di DBP, è ovvio che le concentrazioni possono variare considerevolmente. Inoltre la presenza nelle colture cellulari di enzimi degradanti potrebbe non riflettere ciò che invece avviene nei tessuti e negli organi in vivo. Come dimostrato da Bouillon, analoghi della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con bassa affinità per le DBP possono presentare elevata potenza in vitro rispetto alla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e bassa potenza in vivo secondariamente al rapido metabolismo intracellulare (Bouillon et al, 1991). La combinazione di una parziale affinità per le DBP, attenuata suscettibilità per l'inattivazione metabolica e la preservata affinità per VDR identifica analoghi con elevata potenza in vivo.

Ipercalcemia

L'effetto collaterale più importante della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è l'induzione di ipercalcemia come risultato dell'incrementato assorbimento di calcio a livello intestinale e della sua mobilizzazione ossea. E' chiaro da molti studi effettuati su modelli animali di patologie immuno-mediate che l'efficacia della terapia con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è limitata dall'insorgenza di ipercalcemia in funzione sia del dosaggio che della durata del trattamento (Lemire et al, 1992; Lillevang et al, 1992). Per questo è stata studiata da diversi gruppi la capacità dei diversi analoghi di indurre ipercalcemia o di ridurre la mobilizzazione del calcio a livello osseo (Lemire et al, 1994; Gregori et al, 2002; Casteels et al, 1998). Sebbene la maggior parte degli analoghi della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ abbia scarsa tendenza ad incrementare i livelli di calcio quando somministrata a dosaggi adeguati, è altrettanto vero che gli stessi sembrano presentare minori effetti farmacologici rispetto alla controparte nativa. Il meccanismo alla base di questo ridotto effetto ipercalcemico non è stato completamente spiegato ma è possibile che, oltre alle modificazioni strutturali che favoriscono l'accumulo intracellulare, gli analoghi inducano modificazioni conformazionali nel VDR che determinano a loro volta delle modificazioni strutturali e funzionali all'intero complesso legante il DNA. Secondo questa teoria è stato proposto che gli analoghi della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, quando legati al VDR, siano responsabili di una modificazione dell'espressione genica rispetto a quella indotta dal fisiologico legame $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR}$ (Carlberg et al, 1998). Ulteriori studi degli eventi molecolari responsabili dell'effetto ipercalcemico degli agonisti della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ potranno permettere lo sviluppo di altri analoghi con elevata azione immunosoppressiva e scarso effetto ipercalcemizzante.

Tempo e durata della terapia

I tempi ottimali di inizio e durata della terapia con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o con analoghi dovrebbero essere esaminati attentamente nella fase di creazione dei trials clinici sulla base dei dati provenienti dagli studi nei modelli animali. In alcuni di questi studi infatti la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e i suoi analoghi si sono dimostrati capaci di modificare le risposte immunitarie con un “range” di dose accettabile (Gregori et al, 2002; Lemire et al, 1991 e 1992). In altri studi, piccole modificazioni del dosaggio o della frequenza della dose sono state associate a perdita di efficacia o emergenza di tossicità (Abe et al, 1990). Pertanto sarebbero necessari studi preclinici sugli analoghi della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ per trovare il dosaggio dotato di massimo effetto immunomodulante con minima tossicità. In linea generale, nel modello animale, l’inizio della terapia con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ prima o in coincidenza con l’induzione della malattia è stata associata con il massimo effetto terapeutico. Inoltre è stato osservato che la progressione della patologia o il “relapse” della stessa si manifestano quando la terapia è stata interrotta (Cantorna et al, 1996). Questo suggerisce che gli agonisti della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ potrebbero essere impiegati anche nella prevenzione delle patologie (trapianto o stato prediabetico per esempio) o per il mantenimento della remissione dopo “relapse” (sclerosi multipla). Ci sono esempi sperimentali in cui sono stati ottenuti miglioramenti significativi. In questi studi, dosaggi più alti e manipolazioni aggiuntive si sono rese necessarie per evitare l’ipercalcemia. Queste osservazioni preliminari suggeriscono che gli analoghi della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con ridotta tossicità potrebbero essere efficaci sia in monoterapia che in associazione con altri immunosoppressori (Casteels et al, 1998).

Effetti combinati con altri agenti immunosoppressori

Gli effetti determinati dalla combinazione della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o dei suoi analoghi con altri immunosoppressori sono stati studiati sia in vitro che in vivo e hanno evidenziato un'azione additiva o sinergica. Tra i comuni agenti immunosoppressori di cui è stato dimostrato un incremento degli effetti quando associati a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o ai suoi analoghi, ci sono: corticosteroidi (Koizumi et al, 1985), ciclosporina e tacrolimus (Lillevang et al, 1992; Veyron et al, 1993, Redaelli et al, 2002), sirolimus (Van Etten et al, 2000), acido micofenolico (Van Etten et al, 2000), leflunamide (Van Etten et al, 2000) e interferone- β (Gysemans et al, 2002). Van Etten ha studiato l'effetto della somministrazione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o di suoi analoghi con diversi immunosoppressori sia in vitro nelle colture T cellulari che in vivo nel modello di EAE. I suoi risultati confermano la sinergia sia in vitro che in vivo fra $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e gli inibitori della calcineurina e il sirolimus (Van Etten et al, 2000). E' auspicabile, quindi che i regimi di combinazione della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con altri immunosoppressori nella pratica clinica possano essere utilizzati con il massimo di efficacia e la minima tossicità.

Influenza della dieta

Una considerazione finale riguardo l'ottimizzazione dell'efficacia degli analoghi della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nelle patologie immuno-mediate è stata fatta da De Luca e Cantorna sul ruolo dell'apporto di calcio con la dieta in diverse condizioni sperimentali (Cantorna et al, 1999). Questi Ricercatori hanno evidenziato che gli effetti benefici della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nella EAE e nel Lupus murino sono significativamente attenuati in presenza di un ridotto apporto di calcio. Inoltre

l'induzione di ipercalcemia durante trattamento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ non consente di ottenere nessun effetto terapeutico se l'animale è stato nutrito con una dieta a basso contenuto di calcio. Sebbene il meccanismo alla base di questo fenomeno sia ancora non chiaro, i risultati di più studi confermano quanto sopra esposto.

Importanza del ruolo fisiologico della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nelle funzioni del sistema immunitario

Molti dati di letteratura hanno documentato gli effetti della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ su macrofagi, CD e linfociti fornendo una forte evidenza circa il ruolo fisiologico di questa importante via “steroidica” per un normale funzionamento del sistema immunitario. L'abilità di alcuni se non tutti i tipi cellulari di produrre $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in alcune condizioni suggerisce la presenza di un fenomeno paracrino nel quali appropriati stimoli inducono concentrazioni di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con effetto immunomodulatorio nel microambiente di un tessuto infiammato o di un organo linfoide. Sulla base di questa ipotesi, si potrebbe pensare che la produzione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ indotta localmente ha la funzione di regolare le risposte immuni innate e adattative e la loro interazione. In particolare:

1) *Aumento dell'immunità innata attraverso il reclutamento di macrofagi e loro differenziazione.* Come precedentemente descritto, alcuni studi hanno dimostrato che l'esposizione alla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce la differenziazione di monociti e mielomonociti in macrofagi (Rigby et al, 1984). Inoltre, è stata documentata da Zhu e colleghi l'incrementata produzione di chemochine macrofago-specifiche come MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , e fattori di crescita come CSF-1 da parte di

monociti o cellule midollari esposte a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. (Zhu et al, 2002) Il fatto che la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ possa incrementare l'efficienza delle risposte dell'immunità innata è indirettamente confermata dal dato riportato sugli animali e sull'uomo in base al quale la carenza di vitamina D3 può indurre suscettibilità alle infezioni (Bar-Shavit et al, 1981; Toss et al, 1983).

2) *Prevenzione dell'autoimmunità attraverso l'inibizione dell'abilità delle CD di indurre risposte di tipo Th1.* Un numero svariato di patologie autoimmuni indotte da autoanticorpi organo-specifici è causato da uno squilibrio delle risposte di tipo Th1. Questo tipo di risposta è classicamente caratterizzato da un'infiltrazione linfocitaria locale massiccia e distruttiva, è stimolato dalle CD che funzionano come cellule APC in presenza di IL-12 ed è contraddistinto dall'abbondante produzione di IFN- γ . L'inibizione del processo che porta allo sviluppo di questa risposta ha un ruolo anche nell'inibire l'insorgenza di autoimmunità. In questo senso ci sono dati in letteratura riguardo l'inibizione indotta dalla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verso le risposte di tipo Th1 (Lemire et al, 1995). Queste includono l'effetto documentato della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nell'inibire la maturazione delle CD, la produzione di IL-12 (Penna et al, 2000; Piemonti et al, 2000) e l'interferenza in senso negativo a livello della trascrizione del gene per l'IFN- γ (Reichel et al, 1989; Rigby et al, 1990). Una diretta inibizione della produzione di IL-2 e della proliferazione delle cellule T attivate ha un ruolo anche nel limitare l'espansione clonale di cellule CD4+ e l'help verso le CD8+ citotossiche (Bemiss et al, 2002). Inoltre nei modelli animali di EAE e diabete mellito autoimmune, due patologie tipicamente di tipo Th1, è stato ampiamente documentato l'effetto protettivo e curativo della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Per ognuno di questi modelli Cantorna e De Luca hanno riportato che i topi carenti di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sviluppano la patologia autoimmune molto più rapidamente rispetto al controllo con livelli normali di

1,25(OH)₂D₃ (Cantorna et al, 1996; De Luca et al, 2001). Infine da studi epidemiologici c'è evidenza che lo stato della 1,25(OH)₂D₃ influenza l'incidenza di patologie autoimmuni di tipo Th1. Dati dallo studio EURODIAB, che ha indagato quali siano i fattori di rischio per lo sviluppo del diabete mellito autoimmune, hanno documentato che la 1,25(OH)₂D₃ è un fattore indipendente protettivo (EURODIAB, 1999). Il polimorfismo del gene VDR è stato associato alla suscettibilità a sviluppare il morbo di Chron, patologia immuno-mediata di tipo Th1 (Simmons et al, 2000). L'associazione fra sclerosi multipla e la residenza alle latitudini Nord ha fatto postulare una relazione con il deficit di 1,25(OH)₂D₃ (Cantorna, 2000). Nel loro insieme questi dati testimoniano il ruolo della 1,25(OH)₂D₃ nel regolare le risposte Th1.

3) *Promozione della tolleranza al "self" attraverso un effetto permissivo sulla generazione di risposte Th2 o di quelle T-reg.* Come descritto in precedenza, c'è evidenza da un numero di studi in vitro e in vivo che la somministrazione di agonisti della 1,25(OH)₂D₃ sia associato alla promozione di risposte Th2 o T-reg (Cantorna et al, 1998; Gregori et al, 2001 e 2002). Resta però da essere chiarito se questo fenomeno sia il risultato della soppressione delle risposte Th1 o rappresenti una specifica stimolazione di quelle di tipo 2. Non è chiaro se questi effetti siano mediati da una modificazione della maturazione delle CD, da un effetto diretto sulle cellule T o da entrambi questi processi. Questi quesiti potrebbero trovare una risposta nei risultati degli studi condotti su animali privi del gene VDR e non responsivi alla 1,25(OH)₂D₃. Infatti tali studi hanno evidenziato la presenza di un'ipertrofia dei linfonodi sottocutanei con incrementata proporzione di CD mature (Griffin et al, 2001). Questi animali però non sembrano avere sviluppare autoimmunità o difetti in vitro della funzione linfocitaria (Mathieu et al, 2001).

Disegno Sperimentale

Gli studi fin qui riportati hanno documentato l'importante effetto della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ su alcune funzioni del sistema immunitario in condizioni fisiologiche e patologiche. L'applicazione terapeutica di queste scoperte è al momento oggetto di grande interesse anche per la possibilità di utilizzare non solo la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ma anche i suoi analoghi con un buon profilo costo-beneficio rispetto ai possibili effetti collaterali. Nuovi studi clinici sono pertanto necessari per confermare l'efficacia e la sicurezza della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ come molecola immunomodulante nelle patologie immuno-mediate e nel trapianto.

Sulla base di queste premesse si è concretizzato il progetto di ricerca sulla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ che si è svolto seguendo tappe successive volte a verificare l'effetto immunomodulatorio di quest'ormone sia in vitro su soggetti sani e su pazienti trapiantati per cirrosi epatica da virus C, sia in vivo su pazienti affetti da epatopatia cronica HCV-positiva sottoposti a supplementazione con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Qui di seguito sono riportate le tappe successive di svolgimento del progetto di ricerca:

- **Parte prima.** Effetto della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sulla funzione dei monociti di soggetti sani, in particolare sulla capacità di inibire l'attività pro-infiammatoria CD40L-mediata.
- **Parte seconda.** Effetto della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sulla capacità proliferativa e sulla produzione di citochine da parte dei linfociti di soggetti trapiantati per cirrosi epatica HCV-positiva.
- **Parte terza.** Studio degli effetti clinici prodotti dalla supplementazione con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in soggetti affetti da epatopatia cronica da virus C.

Parte Prima

Introduzione

Come già riportato, la forma attiva della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oltre al suo ruolo noto nella regolazione dell'omeostasi calcica esercita una serie di effetti immunomodulatori attraverso il recettore VDR espresso su gran parte delle cellule immunitarie (Adorini et al., 2001). In particolare presenta un effetto regolatorio sul monocyte anche se i dati in letteratura non sono univoci. Müller e coll. hanno evidenziato che l' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è in grado di inibire in modo dose-dipendente la produzione di IL-1 α , IL-6 e TNF- α da parte dei monociti LPS-stimolati (Müller et al, 1992). Inoltre il trattamento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ riduce l'espressione basale di HLA-DR, CD4, CD86 e l'induzione di CD80 mediata dal TNF- α nei monociti (Rigby et al, 1990; Xu et al, 1993; Clavreul et al, 1998). Infine, nei monociti trattati con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è stata dimostrata una alterata capacità di promuovere l'attivazione dei linfociti T ritenuta conseguenza della ridotta espressione di MHC e CD80 (Rigby et al, 1992).

I monociti occupano una posizione centrale in diversi processi infiammatori. Essi promuovono le risposte infiammatorie e fungono da cellule effettrici che mediano il danno tissutale. Inoltre possono processare e presentare l'antigene alle cellule T. I monociti possono essere preattivati dalle cellule T attraverso l'interazione CD40ligando (CD40L)-CD40, membri della famiglia del TNF-TNFR

(Hollenbaugh et al, 1994; Grewal, 1997 et al, Foy et al, 1996). L'ingaggio del CD40 con il CD40L induce la produzione di citochine pro-infiammatorie come il TNF- α e l'IL-1 β e l'up-regolazione di molecole di superficie come il CD40, il CD80 e il CD86 (Alderson et al, 1993; Kiener et al, 1995; Brossart et al, 1998). Inoltre la stimolazione del CD40 sui monociti gioca un ruolo chiave nel controllo del "killing" intracellulare dei patogeni grazie alla liberazione di IL-12 (Chaussabel et al., 1999). L'induzione di citochine attraverso il triggering del CD40 sui monociti è anche importante nella patogenesi di diverse patologie immunomediate come il lupus eritematoso sistemico (LES) (Goules et al., 2006), l'artrite reumatoide (Li uet al., 2001), la sclerosi multipla (Jensen et al., 2001) e il rigetto d'organo (Lederer et al., 2004). È interessante notare che il blocco dell'interazione ligando-recettore porta a una riduzione dell'incidenza e della severità di molte malattie immunomediate incluse quelle sopra riportate (Blazard et al, 1997; Liossis et al, 2004; Guillonneau et al, 2005).

Scopo dello studio

Sulla base di questi dati abbiamo voluto studiare l'effetto immunologico esercitato dalla 1,25(OH) $_2$ D $_3$ sulla via CD40/CD40L nei monociti umani al fine di stabilire se i monociti possono essere un altro importante target terapeutico della 1,25(OH) $_2$ D $_3$.

Materiali e Metodi

Preparazione delle cellule.

Le cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC, acronimo dall'inglese Peripheral Blood Mononuclear Cells) di donatori sani sono state separate mediante centrifugazione su gradiente di densità. I monocito-macrofagi sono stati successivamente purificati mediante centrifugazione contro-corrente. Le cellule così ottenute sono monociti per più del 90%, come dimostrato dalla verifica effettuata con criteri morfologici e attraverso l'espressione del CD14 (mediante citofluorimetria).

Le cellule sono state risospese in terreno per colture cellulari Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 contenente 2mM di glutamina, 50U/mL di penicillina, 50µg/ml di streptomicina e siero fetale bovino (FCS, "fetal calf serum") al 20%, inattivato. Le cellule sono state coltivate nel termostato a 37° in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Per la stimolazione è stato utilizzato CD40L (500 ng/ml) trimerico ricombinante.

1,25(OH)₂D₃.

La 1,25(OH)₂D₃ è stata opportunatamente diluita utilizzando etanolo (0,01%) e mezzo di coltura in accordo alle istruzioni dell'azienda produttrice e in modo da ottenere delle soluzioni di stock (10 µM) che sono state conservate a -20° protette dalla luce. La 1,25(OH)₂D₃ è stata aggiunta a concentrazioni comprese tra 0.01 e 10nM.

Citofluorimetria.

La citofluorimetria è stata impiegata per l'analisi dell'espressione delle molecole di superficie e per la determinazione delle citochine intracitoplasmatiche. Per

l'analisi al citofluorimetro sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali: anti-CD14, anti-CD40, anti-CD80, anti-CD86, anti-IL-1 β , anti-IL10, anti-TNF- α , e anti-IFN- γ .

Dopo stimolazione in presenza o assenza di 1,25(OH) $_2$ D $_3$, le cellule sono state lavate e incubate con gli anticorpi monoclonali per 30 minuti al buio. Successivamente sono state analizzate al citofluorimetro per determinare l'espressione degli antigeni di superficie. L'espressione di CD80, CD86 e CD40 è stata calcolata rispetto alle cellule CD14+ al FACS. Per la determinazione delle citochine intracitoplasmatiche le cellule sono state risospese nella soluzione Cytofix/Cytoperm per 20 minuti al buio. Le cellule così permeabilizzate sono state risospese in "phosphate-buffered saline" (PBS) e paraformaldeide (0.4%) e analizzate al FACS.

I dati di fluorescenza sono stati espressi come "mean fluorescence intensity" (o MCF, "mean channel fluorescence") o come percentuale di cellule positive dopo sottrazione dei valori di background.

Dosaggio di TNF- α e IL-1 β mediante ELISA.

La concentrazione di TNF- α e IL-1 β nel sovranatante è stata ottenuta mediante saggio ELISA dopo conservazione dei sovranatanti (150 μ l/condizione sperimentale) delle colture cellulari utilizzate per l'analisi citofluorimetrica. I sovranatanti sono stati conservati a -20°. Tutti i campioni sono stati testati in triplicato in ciascun esperimento. Le concentrazioni delle citochine sono state espresse in pg/ml.

Stimolazione cellulare.

Per valutare la capacità della 1,25(OH) $_2$ D $_3$ di sopprimere la risposta citochinica al CD40L da parte dei macrofagi, i monociti sono stati coltivati (2x10 5 cellule/pozzetto/250 μ l) per 18 ore nel mezzo di coltura contenente CD40L e

brefeldina A (1 µg/ml) in presenza o assenza di 1,25(OH)₂D₃. Alla fine dell'incubazione le cellule sono state analizzate al FACS per la produzione intracitoplasmatica di citochine.

Per valutare invece la capacità della 1,25(OH)₂D₃ di up-modulare l'espressione del CD40, CD80 e CD86, i monociti sono stati coltivati per 72 ore nel mezzo di coltura con CD40L in presenza o assenza di 1,25(OH)₂D₃. Alla fine dell'incubazione è seguita l'analisi al FACS per la valutazione dell'espressione delle molecole di superficie.

Infine gli esperimenti volti a valutare l'effetto della 1,25(OH)₂D₃ di interferire con la capacità costimolatoria del CD40L sono stati condotti come segue. Dalle PBMC dello stesso donatore sono state separate le cellule T CD4⁺ per selezione negativa con biglie magnetiche e sono state congelate. I monociti dello stesso soggetto sono stati coltivati per 72 ore in presenza di CD40L con o senza 1,25(OH)₂D₃. Alla fine del periodo di incubazione le cellule sono state opportunamente lavate per rimuovere il CD40L e la 1,25(OH)₂D₃ e trasferite in piastre nelle quali era stato fatto aderire l'anti-CD3 (10µg/ml) in presenza di cellule T CD4⁺ autologhe precedentemente scongelate in rapporto 1:1 con i monociti. Una parte dei monociti attivati come precedentemente descritto è stata posizionata sulla parte superiore delle piastre dotate di una membrana porosa (0.45µm di diametro) mentre le cellule T CD4⁺ autologhe sono state posizionate sulla parte inferiore delle medesime piastre in cui era stato fatto aderire l'anti-CD3 con aggiunta di anti-CD28 solubile (1µg/ml). Per la rivelazione delle citochine intracitoplasmatiche le co-culture sono state coltivate per 18 ore in presenza di brefeldina A. Per lo studio della proliferazione 0.25mCi/pozzetto di timidina triziata sono stati aggiunti dopo 72 ore di coltura alle condizioni

precedentemente descritte. Diciotto ore dopo le cellule sono state raccolte e la quantità di timidina triziata accumulata è stata calcolata mediante β -counter.

Valutazione della “viability” cellulare.

Per quantificare la percentuale di cellule necrotiche e apoptotiche, i monociti (1×10^6) sono stati incubati in RPMI-1640 per 72 ore con o senza FCS al 20%, con FCS 20% + $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, con CD40L, o con CD40L + $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10nM). Alla fine dell'incubazione, le cellule sono state lavate con PBS, staccate delicatamente dai pozzetti e raccolte mediante centrifugazione a bassa velocità. Le cellule così ottenute sono state risospese in PBS contenente ioduro di propidio (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) per la quantificazione della necrosi o fissate in etanolo al 70% per 24 ore e risospese in soluzione ipotonica con fluorocromo, RNasi (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e ioduro di propidio per la quantificazione delle cellule apoptotiche. La fluorescenza allo ioduro di propidio è stata misurata al FACS. Questa fluorescenza di colore rosso è il risultato del legame al DNA ed è stata calcolata su una scala logaritmica. Nei campioni fissati le cellule apoptotiche causano un picco tipicamente ipodiploide mostrando una bassa fluorescenza rossa per il DNA. Nelle cellule non fissate invece il propidio lega soltanto le cellule necrotiche dando un'intensa fluorescenza rossa.

Analisi statistica.

La normalità delle curve relative alle variabili studiate è stata analizzata utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnov. Per il confronto nella distribuzione di due variabili per un singolo gruppo sono stati impiegati il test di Student e il Mann Whitney U secondo necessità. Tutte le $p < 0.05$ sono state considerate significative. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il programma SPSS (Version 10.0).

Risultati

1,25(OH)₂D₃ inibisce la risposta citochinica dei monociti CD40L-attivati.

L'analisi al FACS dopo "staining" intracitoplasmatico ha rivelato un significativo incremento delle citochine intracitoplasmatiche nelle cellule attivate con il CD40L (Figura 3). Nella Figura 3 il grafico A riassume i dati al FACS sulla percentuale di cellule citochino-positive. Le cellule coltivate in terreno di coltura con e senza etanolo 0.01% [la più alta concentrazione impiegata per la diluizione della 1,25(OH)₂D₃ alla quale sono esposte le cellule in coltura] sono state impiegate come controllo. Nel grafico 3B sono riportati i risultati al citofluorimetro dell'espressione delle citochine intracitoplasmatiche in un donatore rappresentativo. La percentuale delle cellule citochino-positive è stata calcolata rispetto alle cellule CD14+ selezionate al FACS. La risposta citochinica indotta dal CD40L è stata significativamente soppressa dalla 1,25(OH)₂D₃. Questa soppressione è risultata significativa a partire da concentrazioni di 0.1 nM raggiungendo il massimo di soppressione alla concentrazione di 10nM (Figura 3). Questi dati sono stati confermati da quelli derivanti dai saggi ELISA sulla concentrazione citochinica dei sovrinatanti (Figura 4). Analogamente a ciò che è stato riscontrato nell'espressione citochinica intracitoplasmatica, la secrezione di TNF- α e IL-1 β è significativamente ridotta nei monociti stimolati con CD40L in presenza di 1,25(OH)₂D₃ rispetto alle cellule stimolate in assenza dell'ormone. Le cellule coltivate in terreno di coltura con e senza etanolo 0.01% sono state

impiegate come controllo. Nel complesso questi dati indicano che la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ interferisce sulla capacità da parte dei monociti di produrre e liberare alcune importanti citochine in risposta alla stimolazione con CD40L.

1,25(OH)₂D₃ riduce l'espressione delle molecole di superficie nei monociti CD40L-attivati.

I dati sulla capacità da parte della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ di interferire con l'espressione CD40L-mediata di molecole di costimolo sono mostrate nella Figura 5. Gli esperimenti sono stati condotti al citofluorimetro. Nel grafico 5A i dati di fluorescenza sono espressi come "mean fluorescence intensity", nel grafico 5B come percentuale di cellule positive dopo sottrazione del background. Nel grafico 5C sono riportati i risultati al citofluorimetro dell'espressione delle molecole di costimolo in un donatore rappresentativo. L'analisi dei marcatori di superficie ha mostrato che la stimolazione con CD40L per 72 ore ha provocato un'elevata espressione di CD80, CD86 e CD40. Di nota, più del 90% delle colture CD40L-stimate ha mostrato un'elevata espressione di CD14, tipico marcatore monocitario. L'aggiunta di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ alle colture di monociti CD40L-stimolati induce una significativa riduzione dell'espressione di CD80 e CD86. Al contrario l'espressione del CD40 non viene significativamente modificata dalla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($p > 0.05$). L'effetto inibitorio della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sull'espressione del CD80 e del CD86 è risultato dose-dipendente, essendo significativo a concentrazione 1 nM e diventando massimale alla concentrazione 10 nM (Figura 5). Non è stata osservata alcuna modifica significativa delle molecole di costimolo nelle cellule coltivate in terreno di coltura con e senza etanolo 0.01%.

1,25(OH)₂D₃ interferisce con l'abilità da parte del CD40L di indurre funzioni di costimolo da parte dei monociti.

L'esperimento è stato condotto valutando la capacità dei monociti CD40L-attivati di stimolare i linfociti T CD4⁺ in presenza o assenza di 1,25(OH)₂D₃. Cellule T CD4⁺ sono state stimolate con anticorpo anti-CD3 in presenza o assenza di monociti CD40L-attivati con o senza 1,25(OH)₂D₃. La risposta proliferativa è stata esaminata mediante l'uptake della timidina (Figura 6A) e quella citochinica mediante esame citofluorimetrico (Figura 6B). La co-coltura di cellule T CD4⁺ stimolate con anti-CD3 e con monociti autologhi CD40L-attivati induce una buona proliferazione T CD4⁺ con espressione di IFN- γ e solo una minima produzione di IL-10. Al contrario, la co-coltura con monociti attivati in presenza di 1,25(OH)₂D₃ mostra una significativa riduzione della proliferazione T e dell'espressione di IFN- γ . La produzione di IL-10 è risultata significativamente maggiore in presenza di 1,25(OH)₂D₃. Inoltre, l'aggiunta di anti-CD28 alle co-culture 1,25(OH)₂D₃-trattate ripristina solo parzialmente la proliferazione T-cellulare e l'espressione di IFN- γ , mentre non ha effetti sulla produzione di IL-10. Non è stata osservata alcuna modifica significativa della proliferazione e dell'espressione di IFN- γ e IL-10 nelle cellule coltivate in terreno di coltura con e senza etanolo 0.01%.

Per rispondere alla domanda se fattori solubili potessero essere responsabili dell'effetto sull'attivazione T-cellulare, sono stati condotti esperimenti utilizzando membrane microporose. In questi esperimenti i monociti 1,25(OH)₂D₃-stimolati sono stati coltivati, separati da una membrana semipermeabile, con i linfociti T CD4⁺ autologhi anti CD3/CD28-attivati. I linfociti T CD4⁺ coltivati in presenza

di anticorpo anti CD3/CD28 sono stati considerati come controllo. La risposta proliferativa è stata esaminata mediante l'uptake della timidina e quella citochinica mediante esame citofluorimetrico. Come mostrato nella Figura 7, in assenza di contatto cellula-cellula le co-culture di cellule T con monociti 1,25(OH)₂D₃-trattati non modulano la proliferazione e l'espressione citochinica.

1,25(OH)₂D₃ inibisce la capacità del CD40L di proteggere i monociti dalla morte cellulare indotta dall'assenza di FCS.

La percentuale di DNA ipodiploide è stata quantificata con la citofluorimetria dopo colorazione con ioduro di propidio (Figura 8). I picchi di DNA nel range ipodiploide dovuti alla presenza di nuclei apoptotici sono stati identificati anche in presenza di FCS al 20%. CD40L ha prevenuto la maggior parte dei processi apoptotici. L'incubazione con 1,25(OH)₂D₃ non ha modificato l'entità dell'apoptosi nelle colture trattate con FCS. Al contrario, l'aggiunta di 1,25(OH)₂D₃ alle cellule stimulate con CD40L ha indotto un significativo incremento dei livelli di apoptosi.

Discussione

In accordo con altri lavori pubblicati (Brossart et al, 1998; Chaussabel et al, 1999; Bolacchi et al, 2001) come primo punto abbiamo dimostrato la potente azione di stimolo sulla produzione citochinica da parte del CD40L nei monociti. Il meccanismo di attivazione CD40/CD40L-mediato, inducendo un'importante produzione di citochine pro-infiammatorie, rappresenta una delle più importanti

vie alla base dei processi infiammatori cronici. Infatti elevati livelli di espressione del CD40L sono stati rilevati sulla superficie di linfociti T di pazienti affetti da LES (Koshy et al, 1996), artrite reumatoide (Liu et al, 2001) e sclerosi multipla (Jensen et al, 2001). Elevati valori sierici di CD40L solubile sono stati descritti in corso di LES (Kato et al, 1999) e artrite reumatoide (Tamura et al, 2001) in correlazione con l'attività clinica di malattia. Sulla base di questi dati scientifici alcuni Ricercatori hanno pensato che l'interruzione del meccanismo di attivazione CD40/CD40L-mediato portando ad un'inibizione dell'attivazione monocito-macrofagica possa indurre una riduzione clinicamente evidente del danno immunomediato in diverse patologie infiammatorie. In questo senso l'intervento terapeutico con l'anticorpo anti-CD154 si è dimostrato utile in diverse patologie immunomediate tra le quali anche il rigetto dopo trapianto d'organo (Blazar et al, 1997; Guillonnet et al, 2005) . Ma d'altro canto troppi e gravi sono stati gli effetti collaterali riportati. Recentemente è stato evidenziato che la concentrazione plasmatica della vitamina D₃ si correla con l'insorgenza di alcune patologie autoimmuni nell'uomo. Recentemente è stato dimostrato che donne con elevato intake di vitamina D₃ presentano un basso rischio di sclerosi multipla (Munger et al, 2004). Inoltre l'"intake" di vitamina D₃ sembra essere inversamente correlato con l'insorgenza di artrite reumatoide nelle donne (Merlino et al, 2004). Questi dati come già riportato in precedenza, hanno indotto a pensare ad un effetto protettivo di questa vitamina nei confronti di molti processi infiammatori cronici, inclusi l'autoimmunità e il rigetto.

In questo studio abbiamo riportato che i linfociti T CD4⁺ costimolati con monociti CD40L-attivati in presenza di 1,25(OH)₂D₃ presentano una bassa capacità proliferativa e un'incrementata produzione di IL-10, citochina anti-infiammatoria. L'abilità da parte della 1,25(OH)₂D₃ di modulare la funzione di

costimolo da parte dei monociti potrebbe essere correlata alla loro perdita di responsività che a sua volta potrebbe essere di giovamento nel trattamento delle patologie sostenute da risposte auto- o allo-reattive.

Le cellule T in grado di liberare IL-10 sembrano essere simili alle T-reg descritte in letteratura e capaci di sopprimere la proliferazione e le funzioni dei linfociti Th1. Lo sviluppo di cellule T IL10-positivo può essere ottenuto secondo diverse vie. Barrat e collaboratori hanno dimostrato (Barrat et al, 2002) che la combinazione di vari agenti immunosoppressivi, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e desametasone, porta allo sviluppo di una popolazione omogenea di cellule T capaci di produrre IL-10. Inoltre diversi agenti possono indurre la proliferazione di CD tollerogeniche e alcuni studi in vitro hanno dimostrato che cellule T con funzione regolatoria possono essere ottenute attraverso la manipolazione delle CD per aumentarne la capacità tollerogena. In questo contesto alcuni Autori hanno studiato la capacità da parte di alcuni agonisti del VDR di ottenere CD tollerogeniche e cellule T-reg (Jonuleit et al, 2000; Penna et al, 2007). Comunque, oltre alle CD mature anche i monociti sono potenti attivatori delle cellule T vergini. In particolare i macrofagi splenici sono potenti cellule APC capaci di indurre proliferazione e attivazione delle risposte Th1 (Gajewski et al, 1991) e i macrofagi peritoneali anche di quelle Th2 (Chang et al, 1990). Pertanto la modulazione dell'attività APC dei macrofagi da parte della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ potrebbe interferire con lo sviluppo delle risposte cellulari T-mediate.

L' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è risultata anche capace di modificare l'espressione delle molecole di costimolo CD80 e CD86 sulla superficie dei monociti. L'interazione CD28-B7 (CD80-86) gioca un ruolo chiave nel fornire segnali di costimolo alle cellule T. Questo legame infatti induce la produzione da parte delle cellule T di fattori di crescita e proliferazione T (Damle et al, 1992). E' quindi possibile che l'alterata

capacità costimolatoria dei monociti CD40L-attivati in presenza di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sia da ricondurre ad una riduzione dell'espressione di queste molecole. Inoltre la stimolazione diretta del CD28 con l'anticorpo monoclonale anti-CD28 nelle cellule T costimolate dai monociti attivati in presenza di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ solo parzialmente ristora la proliferazione e l'espressione di IFN- γ da parte dei linfociti T CD4+ e non ha effetti sulla produzione di IL-10.

L'inibizione della proliferazione T cellulare, della liberazione di IFN- γ e dell'aumentata secrezione di IL-10 è indotta da CTLA-4, un antagonista della costimolazione con CD28 (Walunas et al, 1996). Un'ottimale costimolazione con CD28 è essenziale per il legame con CTLA-4 a cui consegue la sua azione inibitoria (Bharat et al, 2006). Pertanto l'alterata risposta proliferativa e citochinica osservata nei linfociti T anti-CD3/CD28-stimolati potrebbe riflettere la capacità da parte dei macrofagi $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -trattati di up-regolare e/o di legare CTLA-4. Questa ipotesi è supportata dal fatto che gli esperimenti condotti sulle co-culture di macrofagi $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -trattati con linfociti T hanno dimostrato che è necessaria un'interazione cellula/cellula e non la presenza di fattori solubili per inibire le funzioni T cellulari. Inoltre poiché la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ down-modula l'espressione del CD80 e del CD86 ma non del CD40 questo indirettamente suggerisce che l'effetto modulatorio non è semplicemente dovuto ad una riduzione dell'espressione del CD40 e conseguentemente dell'attivazione cellulare.

Dal momento che il corretto funzionamento dell'omeostasi cellulare si basa sul giusto rapporto fra proliferazione e morte cellulare, lo sviluppo delle patologie infiammatorie croniche potrebbe essere la conseguenza della rottura di questo delicato equilibrio. Recenti studi hanno dimostrato che i monociti che vengono reclutati nel sito di infiammazione vanno incontro ad apoptosi se non ricevono

stimoli di attivazione adeguati che ne consentano la sopravvivenza (Manga et al, 1991). In corso di infiammazione, come già sottolineato, l'attivazione dei monociti è indotta dal legame con i linfociti T attraverso l'interazione CD40/CD40L. Questo legame inibisce l'apoptosi nei monociti (Alderson et al, 1993; Manga et al, 1991). Questo processo è stato proposto come uno dei meccanismi alla base della perpetuazione dell'infiammazione nelle patologie immuno-mediate. Pertanto la capacità da parte della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ di indurre apoptosi nei monociti CD40L-attivati potrebbe essere interpretato come un altro effetto anti-infiammatorio di quest'ormone.

I macrofagi rapidamente rispondono agli stimoli esterni con importanti modificazioni dell'espressione genica (Lang et al, 2002). La natura o la combinazione degli stimoli determinano il tipo e l'intensità della risposta immunitaria. A corollario si può ipotizzare che differenti popolazioni di macrofagi possano essere reclutate in risposta a differenti stimoli. Generalmente la presenza di IFN- γ e TNF- α sono un ottimo stimolo per il reclutamento e l'attivazione dei macrofagi (Nathan et al, 2000). Una seconda popolazione di macrofagi diversa da quella appena citata viene reclutata in risposta a citochine di tipo 2 (IL-4 e o IL-13) (Stein et al, 1992). Ci sono dati limitati riguardanti il tipo di attivazione macrofagica ottenuta dopo stimolazione con CD40L. L'interazione CD40/CD40L induce la produzione di citochine pro-infiammatorie e immunomodulatorie come l'IL-12, e l'espressione di molecole di costimolo. E' pertanto molto probabile che quest'interazione svolga un ruolo chiave sia nella risposta contro virus e batteri che in quella infiammatoria non infettiva. Inoltre è stato evidenziato che il CD40L è capace di indurre la differenziazione dei monociti plasmatici in CD in assenza di altri fattori attivanti come il GM-CSF o il TNF- α (Brossart et al, 1998). La maturazione dei monociti in CD attraverso il CD40L da solo richiede un periodo

di stimolazione di sette giorni (Brossart et al, 1998) che è maggiore rispetto a quello da noi adottato. Sebbene nelle nostre colture CD40L-stimate non abbiamo ricercato la presenza di CD (fenotipicamente) è possibile che una parte della nostra popolazione cellulare possa avere acquisito un fenotipo CD. Perciò non possiamo escludere del tutto la possibilità che l'effetto esercitato dalla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sui monociti possa essere stato esercitato anche sulle CD. Studi futuri sono necessari per meglio definire il ruolo del CD40L rispetto alle risposte dell'immunità innata e adattativa e il ruolo di agenti che modulano il fenotipo e la funzione di queste cellule. I nostri dati dimostrano un nuovo effetto immunomodulatorio della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e supportano l'interesse per quest'ormone come nuovo agente immunosoppressore.

Parte Seconda.

Introduzione

L'epatite da virus C è ad oggi una delle prime cause di cirrosi e scompenso epatico, responsabile di almeno il 50% dei trapianti di fegato in Europa (Adam R, 2003). La ricorrenza di infezione dopo trapianto riguarda quasi tutti i pazienti e presenta un decorso rapido e infausto. Dopo trapianto la terapia immunosoppressiva viene considerata indispensabile al fine di garantire la tolleranza nei confronti del "graft" ma i farmaci comunemente impiegati possono favorire la replicazione virale facilitando il danno d'organo virus-indotto.

In linea generale il rigetto è caratterizzato dalla proliferazione e dall'attivazione dei linfociti T sia nel fegato che nel sangue periferico e dalla produzione e liberazione di citochine pro infiammatorie (Martinez et al, 1992; Gorczynski et al, 1996; Scirren et al, 2000). Citochine come IFN- γ e TNF- α sono coinvolte nel rigetto d'organo attraverso diversi meccanismi quali l'up-regolazione delle molecole MHC di classe I e II, la stimolazione macrofagica, l'attivazione endoteliale, l'up-regolazione di molecole di adesione che sono indispensabili per il reclutamento dei leucociti (Chollet-Martin et al, 1990; Luscinskas et al, 1991; Mosmann et al, 1996). La collaborazione fra cellule T helper ed effector è inoltre cruciale per indurre il rigetto e le cellule CD4⁺ giocano un ruolo centrale perché

in grado di liberare citochine effettrici e indurre l'attivazione di cellule CD8+, cellule B e macrofagi (Golshayan et al, 2007).

Come già riportato, è stato evidenziato che l' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, oltre alla ben nota attività nell'ambito dell'omeostasi ossea, esercita una funzione immunomodulante sia in vitro che in vivo (Rigby et al, 1985, 1987; Lemire et al, 1992, 1995; Thomasset, 1994; Vanham et al, 1989; Staeva-Veira et al, 2002). Questo sulla scorta dell'evidenza che il recettore per la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è espresso sulla superficie dei linfociti T attivati e sui monociti/macrofagi (Bhalla et al, 1983; Manolagas et al, 1985). In seguito al legame con il suo recettore, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ esercita diverse attività di immunoregolazione come l'inibizione della proliferazione T linfocitaria, la soppressione delle risposte Th1 e un aumento di quelle Th2-mediate (Boonstra et al, 2001).

L'attività immunoregolatrice di questa vitamina è stata esaminata in alcuni modelli animali di patologie immunomediate in cui il danno d'organo è conseguente all'attivazione di risposte immuni dirette contro il "self". Tra questi, l'encefalomielite allergica (Cantorna et al, 1996), la tiroidite autoimmune (Fournier et al, 1990), il diabete mellito di tipo 1 (Gregori et al, 2002) e la nefrite di Heymann (Branisteanu et al, 1993) sono, ad oggi, i modelli sperimentali più studiati. L'efficacia della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è stata verificata in diversi modelli sperimentali di trapianto fra i quali quello di cuore (Hullett et al, 1998), di rene (Redaelli et al, 2002), di isole pancreatiche (Gregori et al, 2001) e di fegato (Redaelli et al, 2001). Di nota, in alcuni di questi modelli, l'aggiunta di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a ciclosporina o micofenolato ha indotto una significativa maggiore sopravvivenza del "graft" rispetto al controllo in monoterapia (Gregori et al, 2001; Redaelli et al, 2001; Veyron et al, 1993).

Questi risultati hanno suggerito che la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ potrebbe essere impiegata in altre patologie come il trapianto d'organo in cui l'inibizione delle risposte Th1 potrebbe essere di beneficio ai fini del controllo della patologia stessa. Inoltre se documentato l'effetto immunosoppressore della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in vivo si potrebbe ipotizzare una terapia di combinazione che consentirebbe la riduzione del dosaggio dei comuni immunosoppressori e degli effetti collaterali spesso connessi ad un rapido e infausto decorso clinico.

Scopo dello studio

Scopo del presente studio è stato quello di indagare se la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ può esercitare una funzione di immunoregolazione in vitro sulle cellule mononucleate periferiche di pazienti trapiantati per cirrosi epatica HCV-positiva in terapia con i comuni immunosoppressori.

In particolare abbiamo indagato se la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, a differenti concentrazioni, è in grado di:

- 1) inibire la proliferazione T linfocitaria mitogeno- e anti-CD3/CD28-indotta.
- 2) inibire la produzione di IFN- γ e TNF- α , citochine pro-infiammatorie.

Pazienti e Metodi

Pazienti.

Lo studio ha coinvolto 16 pazienti trapiantati per cirrosi epatica da virus C fra il 1995 e il 2004 presso il nostro Centro. L'età media dei pazienti è stata di 60 anni (range 47-68), di cui 11 di sesso maschile; la mediana dei mesi dal trapianto è stata 72 (range, 24-132). Tutti i pazienti risultavano anti-HCV e HCV-RNA positivi e istologicamente presentavano i segni tipici della ricorrenza di malattia da virus C. La terapia immunosoppressiva di mantenimento era con ciclosporina (dosaggio medio, 150 mg/die) o tacrolimus (2 ng/die). Due pazienti erano invece in terapia con micofenolato al dosaggio di 1500 mg/die. Nessun paziente ha assunto steroidi. Le caratteristiche cliniche, biochimiche e istologiche dei pazienti raccolte al momento del prelievo ematico per la raccolta delle cellule sono riportate in Tabella 1. In esperimenti selezionati, un gruppo omogeneo per sesso ed età di 10 soggetti sani è stato considerato come controllo. I criteri di esclusione dallo studio sono stati i seguenti: pazienti con pregressi episodi di rigetto acuto o pazienti con rigetto cronico; negatività per Citomegalovirus, Epstein-Barr virus o infezione da virus B.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico Tor Vergata, Roma. Il consenso informato è stato ottenuto da ciascun paziente incluso nello studio.

1,25(OH)₂D₃.

La 1,25(OH)₂D₃ è stata opportunamente diluita e conservata come precedentemente descritto (pagina 31).

Anticorpi.

Per l'analisi al citofluorimetro (FACS) sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RO, anti-CD45RA, anti-TNF- α , anti-IFN- γ .

Preparazione e stimolazione cellulare.

Le PBMC sono state separate mediante centrifugazione su gradiente di densità e conservate in azoto liquido. Le cellule sono state successivamente scongelate mediante immersione in bagnetto a 37° per un minuto e rapidamente lavate in RPMI-1640. Sono state poi risospese in terreno di coltura cellulare (RPMI-1640 contenente 2mM di glutamina, 50U/mL di penicillina, 50 μ g/ml di streptomicina e siero umano AB al 10%).

Saggio di proliferazione.

Dopo scongelamento, le cellule T sono state isolate dalle PBMC attraverso un processo di selezione negativa usando biglie magnetiche e risospese in mezzo di coltura alla concentrazione di 10⁶ cellule/ml. Le cellule sono state successivamente coltivate in piastre da 96 pozzetti e stimolate con fitoemagglutinina (PHA, 5 μ g/ml) o con anticorpo anti-CD3 (5 μ g/ml) precedentemente fatto aderire alle pareti della piastra*, e anti-CD28 (1 μ g/ml) in presenza o assenza di 1,25(OH)₂D₃ a concentrazioni comprese fra 0.001 (concentrazione fisiologica) e 10nM (concentrazione farmacologica non tossica). [*50 μ l/ pozzetto di anti-CD3 (10 μ g/ml) in tampone TRIS-HCL (pH 8) sono stati lasciati incubare a 4°C per 12 ore. Il giorno seguente sono state aggiunte le cellule stimolate con l'anticorpo anti-CD28 (1 μ g/ml)]. 0.25mCi/pozzetto di timidina triziata sono stati aggiunti al quarto giorno di incubazione. Diciotto ore dopo la stimolazione le cellule sono state raccolte e la quantità di timidina triziata

accumulata è stata calcolata mediante β -counter. La percentuale di inibizione della proliferazione cellulare è stata calcolata come segue: $[1 - \text{cpm} / \text{cpm}] \times 100$ in presenza di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /cpm in assenza di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$].

Citofluorimetria.

La produzione intracellulare di citochine (TNF- α e IFN- γ) e l'espressione di membrana di CD3, CD4, CD45RO e CD45RA sono state valutate al FACS mediante "staining" con anticorpi monoclonali coniugati con fluorocromi. Dopo scongelamento le cellule sono state stimulate con Forbolo Miristato Acetato (PMA, 20 ng/ml) e Ionomicina (IO, 500 ng/ml) in presenza o assenza di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, con l'aggiunta di brefeldina A (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) per impedire la fuoriuscita dalle cellule del materiale presente nel reticolo endoplasmatico.

Alla fine del periodo d'incubazione le cellule sono state centrifugate, lavate in PBS, fissate in paraformaldeide al 0,4% e dopo un ulteriore lavaggio risospese in saponina (0,1%) e marcate con gli anticorpi specifici per 30 minuti. Le cellule sono state quindi lavate in saponina, risospese in PBS e analizzate al citofluorimetro. Per valutare l'espressione di molecole di membrana le cellule alla fine del periodo di incubazione sono state lavate in PBS, incubate per 15 minuti con gli anticorpi e dopo due ulteriori lavaggi sono state risospese in PBS e analizzate al citofluorimetro.

Le cellule vive sono state differenziate dalle cellule morte sulla base dei valori di "forward scatter" e "side scatter" e sono stati acquisiti almeno 10.000 eventi per ogni campione. L'autofluorescenza è stata valutata attraverso campioni di controllo senza anticorpi monoclonali.

Dosaggio di TNF- α e IFN- γ mediante ELISA.

La concentrazione di TNF- α e IFN- γ nel sovrinatante è stata ottenuta mediante saggio ELISA dopo conservazione dei sovrinatanti (150 $\mu\text{l}/\text{condizione}$

sperimentale) delle colture cellulari utilizzate per il saggio di proliferazione prima dell'aggiunta della timidina triziata. I sovranatanti sono stati conservati a -20°. Tutti i campioni sono stati testati in triplicato per ciascun esperimento. Le concentrazioni delle citochine sono state espresse in pg/ml.

Dosaggio ematico della 25(OH)D.

I livelli ematici della 25(OH)D (forma ormonale della vitamina D3 normalmente impiegata per il dosaggio ematico) nei pazienti e nei controlli sono stati quantificati utilizzando un kit commerciale radioimmunoenzimatico.

Valutazione della "viability" cellulare.

Il numero di cellule vive è stato determinato attraverso il saggio con il tripan blu. Lo staining con propidio ioduro e l'analisi fluorocitometrica sono stati impiegati per quantificare la percentuale di cellule apoptotiche e necrotiche. Brevemente le cellule sono state raccolte e risospese in PBS contenente ioduro di propidio (2µg/ml) per la quantificazione delle cellule necrotiche o fissate in etanolo al 70% per 24 ore e risospese in soluzione ipotonica con fluorocromo, RNasi (10µg/ml) e ioduro di propidio per la quantificazione delle cellule apoptotiche. La fluorescenza al ioduro di propidio è stata misurata al FACS. La fluorescenza di colore rosso è il risultato del legame al DNA ed è stata calcolata su una scala logaritmica. Nei campioni fissati le cellule apoptotiche causano un picco tipicamente ipodiploide mostrando una bassa fluorescenza rossa per il DNA. Nelle cellule non fissate invece il propidio lega soltanto le cellule necrotiche dando un'intensa fluorescenza rossa. Almeno 10⁴ cellule per ciascun campione sono state analizzate.

Analisi statistica.

La normalità delle curve relative alle variabili studiate sono state analizzate utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnov. I due gruppi [con e senza 1,25(OH)₂D₃] sono stati comparati impiegando il test di Student, il Mann Whitney U o il test ANOVA secondo necessità. L'analisi di regressione lineare è stata effettuata con il test di Pearson. Tutte le $p < 0.05$ sono state considerate significative. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il programma SPSS (Version 10.0).

Risultati

Effetto della 1,25(OH)₂D₃ sulla proliferazione linfocitaria.

I linfociti T sono stati purificati dalle PBMC e stimolati con PHA o con CD3/CD28. La proliferazione non è risultata significativamente differente nei pazienti trapiantati e nei controlli sia con stimolazione aspecifica che con stimolazione con CD3/CD28 (cellule PHA-stimolate: 32,562±14,618 cpm vs. 30,684±8327 cpm, $p > 0.05$; cellule CD3/CD28-stimolate: 21,885±7,746 cpm vs. 24,080±7632 cpm, $p > 0.05$). L'1,25(OH)₂D₃ ha potentemente inibito la proliferazione T cellulare in modo dose-dipendente nei soggetti trapiantati (Figure 9A e 9B) e nei controlli. Non sono state trovate differenze significative nei pazienti rispetto ai controlli sulla capacità inibitoria della 1,25(OH)₂D₃ alle differenti concentrazioni (Figure 9C e 9D). Inoltre, con il test al propidio si è evidenziato che la capacità di inibire la proliferazione T cellulare da parte della 1,25(OH)₂D₃ non è risultata secondaria a un effetto tossico diretto (necrosi o apoptosi) (dati non presentati).

Effetto della 1,25(OH)₂D₃ sulla produzione citochinica.

Le PBMC sono state stimulate con PMA e IO e marcate con anticorpi anti-CD3 e anti-CD4 per la determinazione del fenotipo. La stimolazione è avvenuta in presenza di 1,25(OH)₂D₃ e a questa ha fatto seguito l'analisi al FACS per la determinazione intracellulare di TNF- α e IFN- γ . I dati riportati nella Figura 10 indicano che la risposta citochinica da parte dei linfociti T è significativamente maggiore nei trapiantati che nei controlli. La capacità di inibire la produzione di queste citochine non è risultata diversa nei due gruppi (Figura 11). Un esempio dell'effetto inibitorio della 1,25(OH)₂D₃ sulla produzione intracitoplasmatica di TNF- α e IFN- γ in un paziente trapiantato è riportato in Figura 12. Questi dati sono stati confermati dalla determinazione della concentrazione di queste citochine nel sovrantante. Come dimostrato nella Figura 13, la secrezione di TNF- α e IFN- γ da parte dei linfociti T PHA-stimolati, è significativamente ridotta in presenza di 1,25(OH)₂D₃ (attività inibitoria media, 52% per TNF- α , $p < 0.05$, e 65% per IFN- γ , $p < 0.05$). Per meglio caratterizzare la modulazione esercitata dalla 1,25(OH)₂D₃ sull'espressione citochinica, abbiamo poi studiato il pattern citochinico in due diverse popolazioni cellulari T: "naive" CD4+CD45RA+ e "memory" CD4+CD45RO+. I dati mostrati nella Tabella 2 indicano che la 1,25(OH)₂D₃ (10nM) inibisce la produzione di queste citochine in entrambe le sottopopolazioni indagate.

Livelli sierici di 25(OH)D.

I livelli sierici di 25(OH)D sono risultati nella norma in entrambi i due gruppi (pazienti trapiantati, 220 ± 93.2 ; controlli, 186.2 ± 63 nM). Non sono state trovate correlazioni significative fra i livelli sierici di 25(OH)D e la risposta proliferativa

T cellulare con PHA o con CD3/CD28 (cellule stimulate con PHA: $r=-0.056$, $p>0.05$; cellule stimulate con CD3/CD28: $r= -0.06$, $p>0.05$) (Figura 14A) o rispetto alla produzione citochinica PMA/IO indotta (IFN- γ : $r= 0.28$, $p>0.05$; TNF- α : 0.11 , $p>0.05$) (Figura 14B) . Inoltre non sono state trovate correlazioni significative fra i livelli sierici di 25(OH)D e i dati biochimici e virologici dei pazienti.

Discussione

L'1,25(OH)₂D₃ controlla la proliferazione e la differenziazione cellulare e gioca un ruolo chiave come immunomodulatore. Recenti progressi sono stati fatti nella conoscenza di quelli che sono i meccanismi alla base di questi effetti e delle eventuali applicazioni terapeutiche della 1,25(OH)₂D₃ e dei suoi analoghi. Per questo motivo abbiamo voluto indagare la capacità della 1,25(OH)₂D₃ di interferire con l'attivazione T linfocitaria di pazienti trapiantati per cirrosi epatica da virus C.

L'infezione da virus C è una delle prime cause di cirrosi epatica e di più del 50% dei trapianti di fegato in Europa (Adam et al, 2003). La ricorrenza di infezione dopo trapianto riguarda quasi tutti i pazienti e presenta un decorso rapido e infausto. Anche se alcune evidenze indicano che il fegato è un organo “privilegiato” con riferimento al trapianto per una minore aggressione immunologica, purtroppo il rigetto rappresenta ancora una temibile conseguenza essendo la prima causa di ritrapianto in Europa (Adam et al, 2003). Perciò dopo trapianto la terapia immunosoppressiva resta ancora un cardine imprescindibile e

indispensabile al fine di evitare il rigetto. I farmaci comunemente impiegati possono favorire la replicazione virale facilitando il danno d'organo virus-indotto. Le citochine di tipo 1 come TNF- α e IFN- γ , rappresentano il principale determinante del danno epatico sia nel rigetto che nella replicazione virale (Imagawa et al, 1990; Martinez et al, 1992; Gorczynski et al, 1996; Platz et al, 1996; Scirren et al, 2000). I farmaci immunosoppressori più comunemente impiegati quali ciclosporina, tacrolimus e micofenolato direttamente o indirettamente inibiscono gli effetti di trasduzione del segnale mediato dal TCR sui linfociti T e hanno solo un limitato effetto sulla produzione citochinica. I nostri dati hanno documentato un'elevata risposta citochinica di tipo 1 nei pazienti trapiantati rispetto ai controlli. Questi dati sono in linea con quelli ottenuti da altri gruppi e suggeriscono che l'aumentata produzione citochinica potrebbe essere dovuta al tentativo da parte del sistema immunitario di inibire la replicazione virale attraverso la liberazione di citochine di tipo 1 anche se questo meccanismo risulta insufficiente a indurre la completa clearance virale. Nel nostro studio è interessante notare che nonostante sia presente un'aumentata risposta citochinica delle cellule T nei pazienti trapiantati, l'effetto della 1,25(OH) $_2$ D $_3$ non è differente in questi rispetto ai controlli. Degno di nota è inoltre il fatto che l'effetto della 1,25(OH) $_2$ D $_3$ sulla down-modulazione citochinica non è ristretto ad un singolo compartimento T cellulare ma coinvolge cellule CD4+, CD8+, naive e memory. Questo risultato è di particolare interesse dal momento che le cellule T memory, in particolare le CD4+, hanno una bassa espressione del VDR. Comunque è stato osservato che l'espressione del VDR in queste cellule può essere indotto dopo attivazione in vitro con mitogeni. Inoltre l'up-modulazione del VDR mitogeno indotta potrebbe spiegare come mai la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ produce un effetto inibitorio molto forte sulla proliferazione T cellulare dove le cellule sono lasciate in coltura

con i mitogeni per 96 ore in confronto al saggio di inibizione citochinica in cui le cellule sono esposte ai mitogeni per 18 ore. Infine per meglio definire il ruolo della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ endogena sulla risposta T linfocitaria, abbiamo correlato i livelli sierici di $25(\text{OH})\text{D}$, la forma circolante dell'ormone, che correla fortemente con le concentrazioni di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in vivo, con la risposta proliferativa e citochinica T linfocitaria. I dati ottenuti indicano che, alle concentrazioni incluse nel range di normalità, non sembra esserci correlazione con entrambe proliferazione e produzione citochinica. Questo suggerisce che probabilmente solo concentrazioni farmacologiche di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (come quelle da noi utilizzate sperimentalmente) sono indispensabili per ottenere un effetto sulla funzione linfocitaria in vivo.

Studi precedenti hanno dimostrato che la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ può interferire sull'attività linfocitaria anche in vivo (Thomasset M, 1994; Lemire JM, 1995). Esperimenti su modelli animali hanno dimostrato che la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ può prevenire o attenuare l'evoluzione del diabete autoimmune sperimentale (Gregori et al, 2002), della tiroidite autoimmune (Fournier et al, 1990) e dell'EAE (Cantorna et al, 1996). Risultati simili ai nostri sono stati ottenuti in un recente studio di Stio e collaboratori nel quale è stato indagato l'effetto della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e di alcuni suoi analoghi sulla proliferazione dei linfociti T di pazienti affetti da rettocolite ulcerosa (Stio et al, 2002).

In conclusione, con il presente studio abbiamo evidenziato che i linfociti T di pazienti trapiantati per cirrosi epatica da virus C sono sensibili alla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, come dimostrato da una profonda inibizione della capacità proliferativa e di quella di produrre citochine pro-infiammatorie. Fatto questo tutt'altro che scontato dal momento che tutti i pazienti erano in terapia di mantenimento con i comuni immunosoppressori.

Studi clinici futuri dovranno essere condotti per dimostrare l'efficacia di una terapia di combinazione con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e comuni immunosoppressori che potrebbe consentire la riduzione del dosaggio di questi ultimi e degli effetti collaterali spesso connessi ad un rapido e infausto decorso clinico nei pazienti trapiantati per cirrosi epatica da virus C.

Parte Terza

Introduzione

Come già sottolineato in precedenza l'attività immunoregolatrice di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è stata esaminata in diversi modelli sperimentali di patologie immunomediate tra le quali l'EAE (Cantorna et al, 1996), la tiroidite autoimmune (Fournier et al, 1990) e il diabete mellito di tipo 1 (Gregori et al, 2001 e 2002). Nell'uomo, l'effetto dell' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in vitro è stato studiato in patologie quali la cirrosi biliare primitiva (CBP) (Almerighi et al, 2005) e la rettocolite ulcerosa (Stio et al, 2002). In entrambi i casi, l'inibizione della proliferazione dei linfociti T ex vivo indotta dalla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ si è dimostrata essere intorno al 40% e nella CBP la percentuale di riduzione della produzione di IFN- γ , citochina pro-infiammatoria, è stata stimata essere intorno al 60%, in maniera dose-dipendente.

Studi clinici volti a verificare la presenza di un effetto immunomodulante dopo supplementazione con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sono stati condotti su pazienti affetti da sclerosi multipla (Mahon et al, 2003), diabete mellito di tipo 1 (Hypponen et al, 2001) e insufficienza cardiaca congestizia (Schleithoff et al, 2006). Nei pazienti affetti da sclerosi multipla e trattati con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ si è osservato un incremento dei livelli circolanti di TGF- β , un'importante citochina anti-infiammatoria (Mahon et al, 2003), mentre in quelli con scompenso cardiaco congestizio trattati con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ si è dimostrato un incremento dei livelli di IL-10 (Schleithoff et

al, 2006). I risultati raggiunti complessivamente hanno suggerito che l'1,25(OH)₂D₃ potrebbe essere impiegata in altre patologie immunomediate in cui l'inibizione delle risposte immunitarie aggressive e/o l'incremento di quelle protettive potrebbe essere di beneficio ai fini del controllo della patologia stessa. Come già riportato l'epatite da virus C è una delle principali cause di cirrosi epatica e scompenso essendo responsabile del 50% dei trapianti in Europa (Adam et al, 2003). Le elevate concentrazioni di citochine pro-infiammatorie svolgono un ruolo chiave nella patogenesi e nella storia naturale dell'infezione da HCV (Cerny et al, 1999).

Scopo dello studio

Scopo del presente studio preliminare è stato valutare l'effetto della supplementazione con 1,25(OH)₂D₃ in una piccola popolazione di pazienti con epatopatia cronica da virus C affetta da osteoporosi. In particolare sono stati valutati:

1. Misurazione dei livelli plasmatici di IFN- γ prima (T0), a 30 giorni (T1) e a 180 giorni (T2) dall'inizio della supplementazione con 1,25(OH)₂D₃.
2. Valutazione ai tempi T0, T1 e T2 dei seguenti parametri biochimici: GOT, GPT, GGT, creatinina, calcio sierico e HCV-RNA.
3. Misurazione dei livelli plasmatici di 25(OH)D al tempo T0.

Pazienti e Metodi

Pazienti.

Sette donne di cui sei affette da epatite cronica HCV-positiva e una da ricorrenza di malattia da virus C dopo trapianto di fegato (dimostrata istologicamente) sono state arruolate nello studio (Tabella 3). La supplementazione con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Rocaltrol 0,5 μg bis/die) è stata iniziata dopo diagnosi di osteoporosi effettuata in altra sede. Nessuna paziente è stata trattata per l'infezione da virus C al momento della supplementazione con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o il trattamento si è concluso quantomeno sei mesi prima dell'inizio del presente studio. Campioni ematici sono stati ottenuti prima (T0), a 30 (T1) e a 180 giorni (T2) dall'inizio della supplementazione. I dati biochimici e virologici sono stati raccolti contestualmente ai prelievi ematici. La $25(\text{OH})\text{D}$ è stata determinata, come precedentemente descritto (pagina 48) prima dell'inizio della supplementazione con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. La calcemia è stata dosata settimanalmente per le prime 4 settimane poi mensilmente. La creatinemia è stata dosata ai tempi T0 e T2.

Dosaggio di IFN- γ plasmatico mediante ELISA.

Il test ELISA è stato impiegato per determinare i livelli di IFN- γ plasmatico seguendo le indicazioni della casa produttrice. Le concentrazioni sono espresse in pg/ml.

Analisi statistica.

I dati sono stati analizzati utilizzando il test di Student e il test ANOVA secondo necessità. I risultati sono stati riportati come media \pm deviazione standard o come mediana(range). Tutte le $p < 0.05$ sono state considerate significative. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il programma SPSS (Version 10.0).

Risultati e Discussione

I risultati ottenuti indicano che la supplementazione con 1,25(OH)₂D₃ porta ad una diminuzione significativa dei livelli di IFN- γ plasmatico a 30 giorni dall'inizio della supplementazione [0,35 \pm 0,26 (T0) vs 0,31 \pm 0,23 (T1) pg/ml, $p=0,03$] (Figura 15). La concentrazione ottenuta si è mantenuta tale nei mesi successivi, fino al sesto mese di supplementazione [0,31 \pm 0,23 (T1) vs 0,30 \pm 0,23 (T2) pg/ml, $p>0,05$; 0,35 \pm 0,26 (T0) vs 0,30 \pm 0,23 (T2) pg/ml, $p=0,03$] (Figura 15). I livelli di 25(OH)D dosati all'inizio dello studio sono risultati nella norma (70,6 \pm 25ng/ml). L'analisi della variazione dei parametri biochimici e virologici in risposta alla supplementazione con la 1,25(OH)₂D₃ non ha documentato nessuna modifica significativa (Figura 16). Non si sono osservate modificazioni dei livelli di creatinina e calcemia durante la supplementazione.

I dati ottenuti al momento sono più che preliminari sia per l'esiguità e la disomogeneità del campione che per l'assenza di un controllo con soggetti senza positività per il virus C. Ciò nonostante rappresentano un passo importante per la realizzazione futura di uno studio clinico ampio e randomizzato che possa verificare la reale efficacia della supplementazione con 1,25(OH)₂D₃ nell'indurre un'attenuazione clinicamente evidente del danno immunomediato in questa patologia.

Conclusioni

In questo studio, svolto per tappe successive, abbiamo potuto confermare il ruolo della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ come molecola immunomodulante capace di interferire con importanti vie di attivazione immunitaria, cruciali nell'innescare e/o mantenere i processi infiammatori. In particolare è stata documentata l'inibizione della via di attivazione mediata dal CD40L e la down-regolazione di una delle vie di costimolazione indispensabile per una piena attivazione delle risposte T-dipendenti. Nei soggetti trapiantati per cirrosi epatica da virus C abbiamo dimostrato un chiaro effetto immunosoppressivo della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, effetto dimostrato anche nei controlli. Non è irrilevante osservare che i pazienti fossero tutti in terapia immunosoppressiva di mantenimento suggerendo la possibilità di un'effetto mediato dalla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ IL-2-indipendente.

Sia nello studio condotto sui monociti di donatori che in quello sui linfociti dei pazienti trapiantati abbiamo evidenziato un effetto da parte della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dose-dipendente con un massimo di efficacia a concentrazioni farmacologiche non tossiche. Infatti sono state appositamente escluse concentrazioni più alte dotate sicuramente di maggiore efficacia in vitro ma non traslabili in vivo per sicuri effetti tossici.

I risultati più che preliminari ottenuti su una piccola popolazione di pazienti HCV-positive mostrano incoraggianti riscontri anche se la supplementazione con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è stata attuata a dosaggi probabilmente troppo bassi per ottenere un effetto "visibile" clinicamente. Inoltre come già sottolineato l'esiguità e la disomogeneità del campione rendono il risultato se pur promettente ancora troppo esiguo.

Pertanto sono necessari studi clinici randomizzati per testare i diversi dosaggi e verificare l'effettiva utilità clinica dell'1,25(OH)₂D₃. In questo senso studi clinici con gli analoghi dell'1,25(OH)₂D₃ potrebbero essere utili anche rispetto alla gestione degli effetti collaterali connessi con questa terapia primi fra tutti l'ipercalcemia.

Iconografia