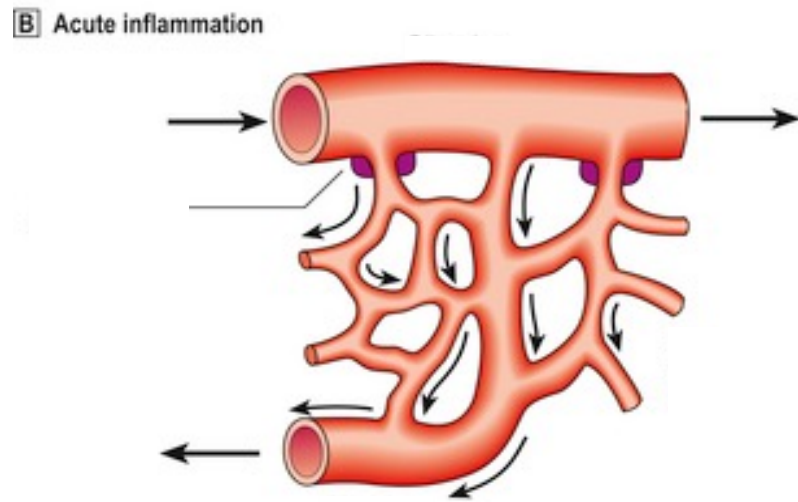
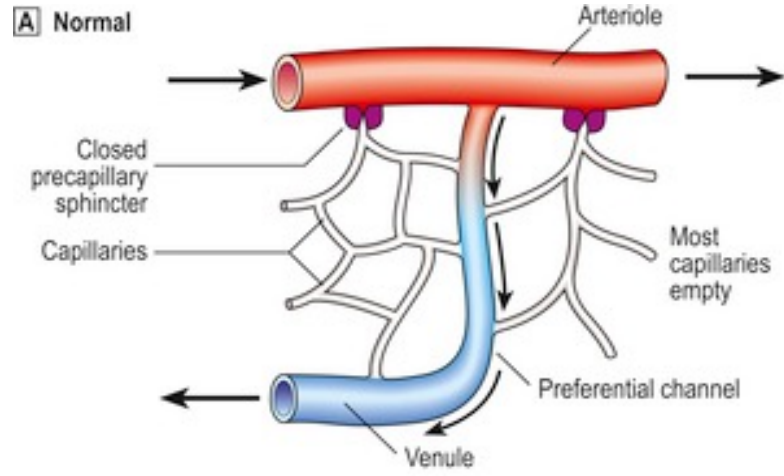
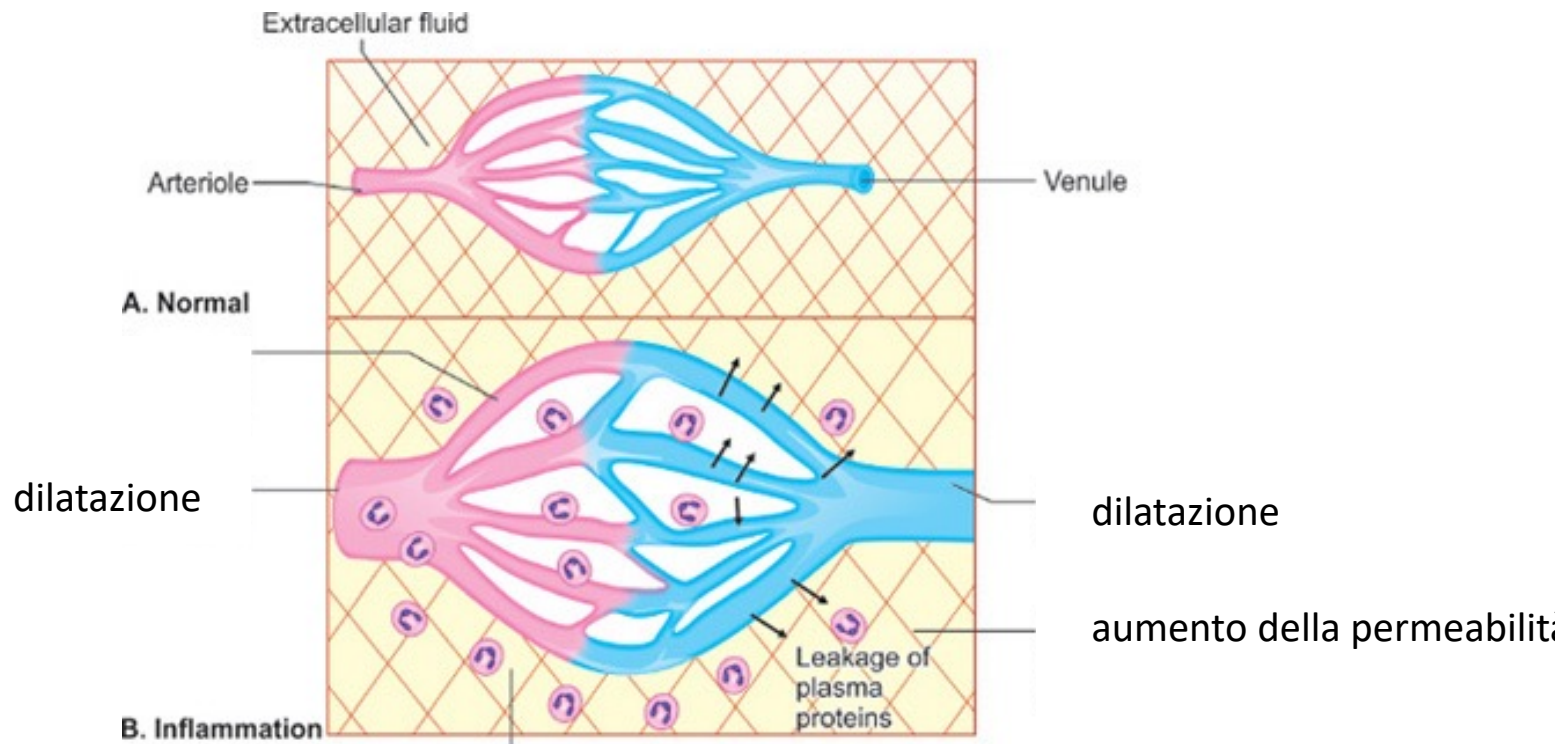


# Modificazioni vascolari durante l'infiammazione



dilatazione

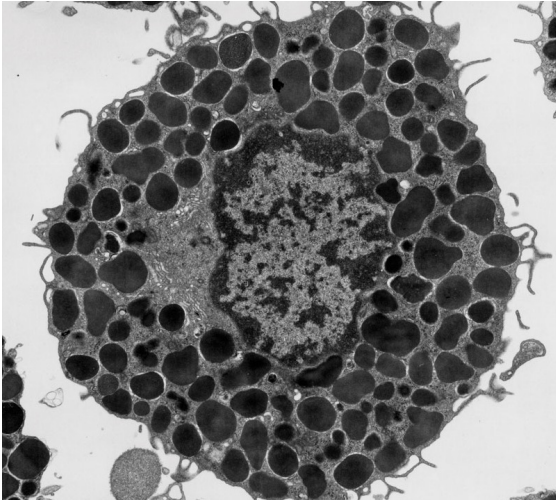
aumento permeabilità



dilatazione

aumento della permeabilità

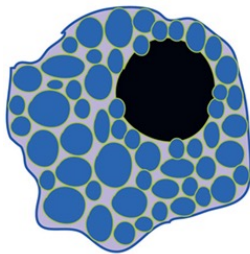
# Ruolo dei mastociti nell'infiammazione



Le modificazioni emodinamiche sono mediate dal rilascio di mediatori vasoattivi da parte di cellule tissutali quali i mastociti.

I mastociti rilasciano: istamina e sintetizzano eicosanoidi (metaboliti dell'acido arachidonico) causando la **vasodilatazione** responsabile del calore (calor) e del rossore (rubor), e **aumento della permeabilità dei vasi**, causa del rigonfiamento (tumor).

## Mast cell



Granule content  
*Histamine*  
*Heparin*  
*Serine proteases*  
*Carboxypeptidase A3*

I mastociti sono cellule ampiamente presenti nell'organismo e si localizzano nel tessuto connettivo e nelle mucose in prossimità dei vasi sanguigni e dei vasi linfatici.

I mastociti sono numerosi nella pelle, nel tratto respiratorio e nel tratto gastrointestinale.

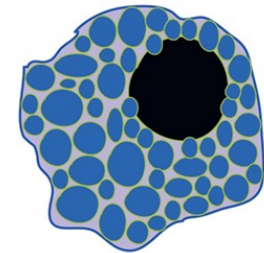
I mastociti sono caratterizzati dalla presenza di granuli citoplasmatici contenenti: istamina, proteasi e citochine quali il  $\text{TNF-}\alpha$

## Caratteristiche dei mastociti

Caratteristica	Mastociti
Principale sito di maturazione	Tessuto connettivo
Principali tipi di cellule circolanti	No
Cellule mature reclutate nei tessuti dal sangue	No
Cellule mature residenti nei tessuti connettivi	Sì
Capacità proliferativa delle cellule mature	Sì
Emivita	Da settimane a mesi
Fattore principale nello sviluppo (citochina)	Fattore della cellula staminale, IL-3
Espressione di FcεRI	Livelli elevati
Contenuto principale dei granuli	Istamina, eparina e/o condroitinsolfato, proteasi

I mastociti sono cellule di origine midollare e la loro maturazione è influenzata dal fattore delle cellule staminali (stem cell factor, SCF) e altre citochine quali l'IL-3, IL-4, IL-9, IL-10.

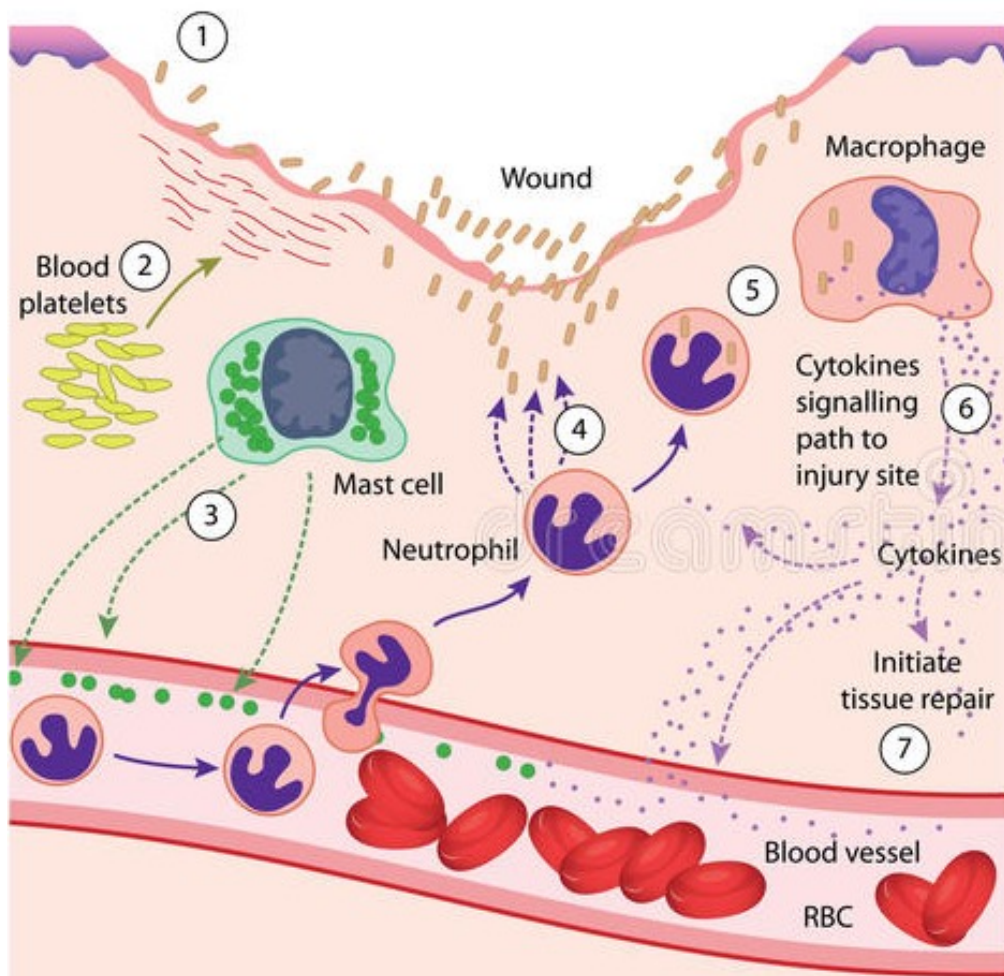
### Mast cell



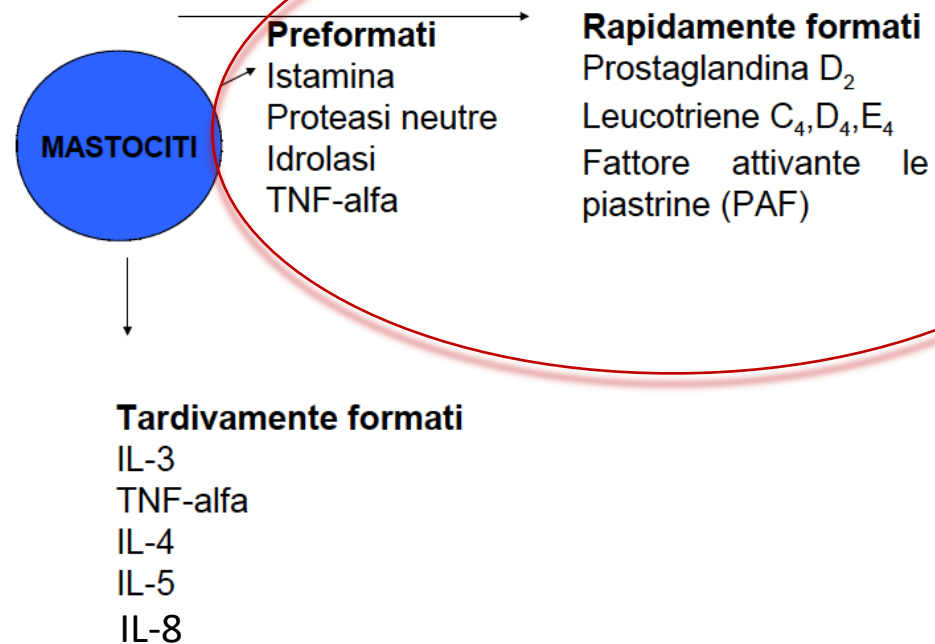
Granule content  
*Histamine*  
*Heparin*  
*Serine proteases*  
*Carboxypeptidase A3*

## Mediatori vasoattivi prodotti dai mastociti

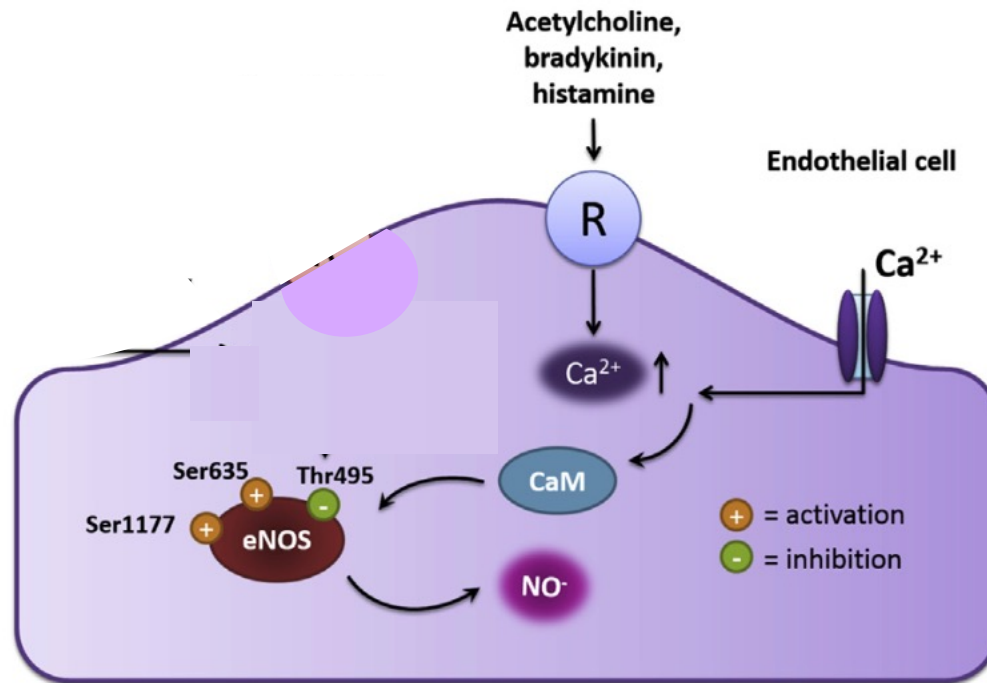
I mastociti producono fattori che mediano la vasodilatazione e l'aumento della permeabilità vasale. Questi includono l'istamina e i metaboliti dell'acido arachidonico.



### MEDIATORI PRODOTTI DAI MASTOCITI



# L'istamina



L'istamina è una amina vasoattiva.

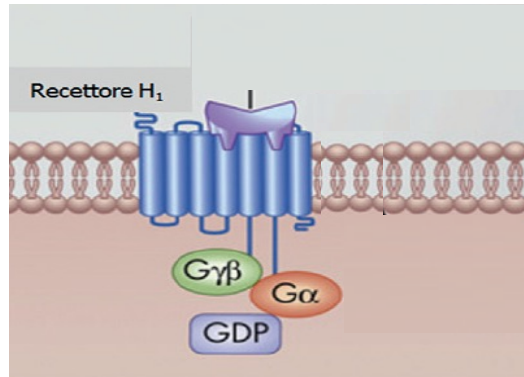
L'istamina deriva dalla decarbossilazione dell'istidina ed agisce legandosi a recettori espressi sulle cellule bersaglio (H1, H2, H3, H4).

L'istamina legando il recettore H1 sulle cellule endoteliali media:

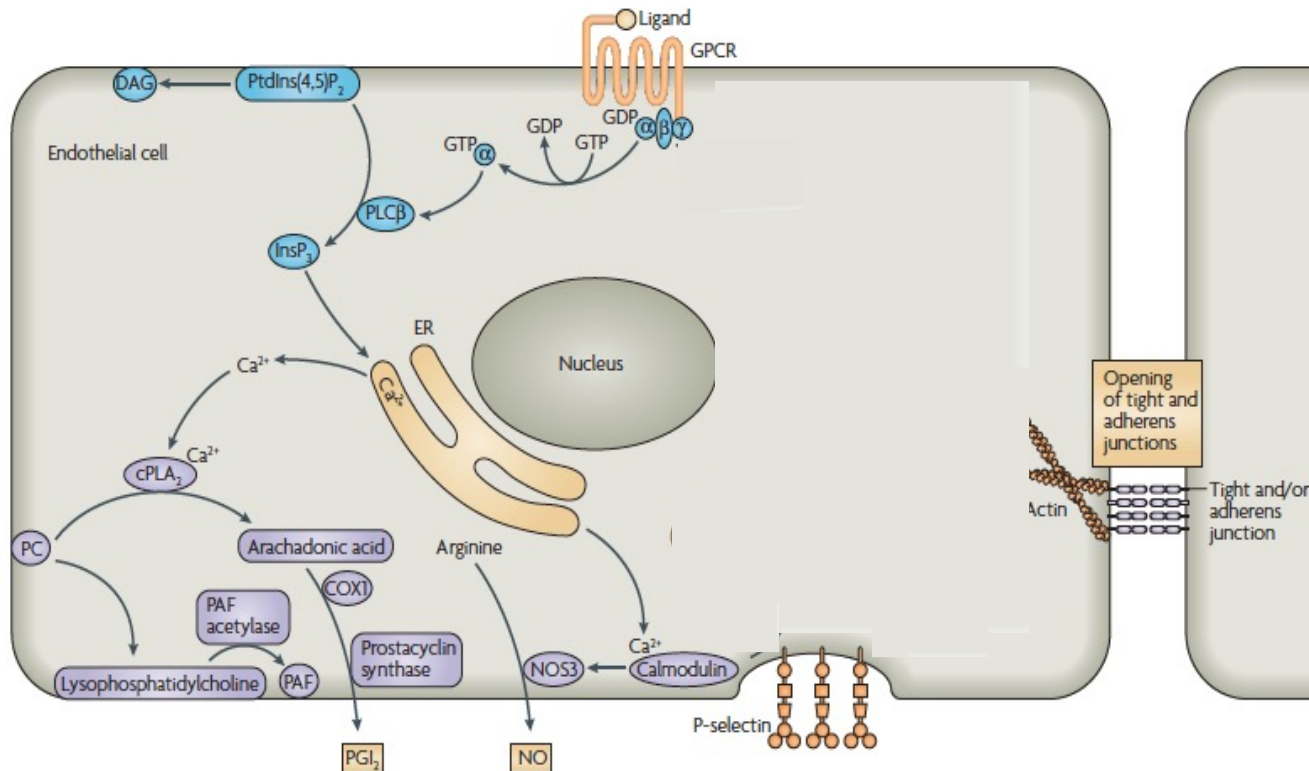
1) **Vasodilatazione** attraverso l'attivazione della eNOS (ossido nitrico sintetasi) e la produzione di NO che insieme alla PGI<sub>2</sub> rilassano la muscolatura liscia dei vasi.

2) Contrazione delle **cellule endoteliali** (aumento della permeabilità vasale)

# Vasodilatazione e aumento della permeabilità mediato dall'istamina



Cellula endoteliale



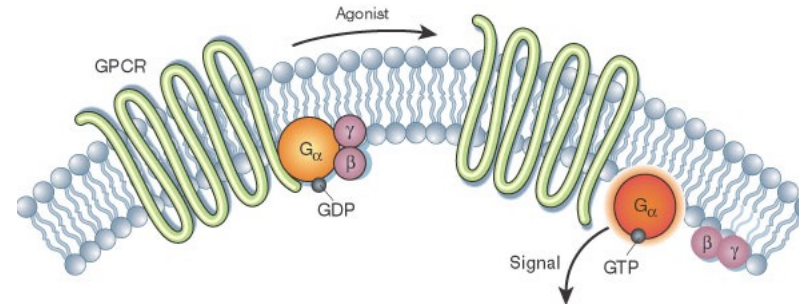
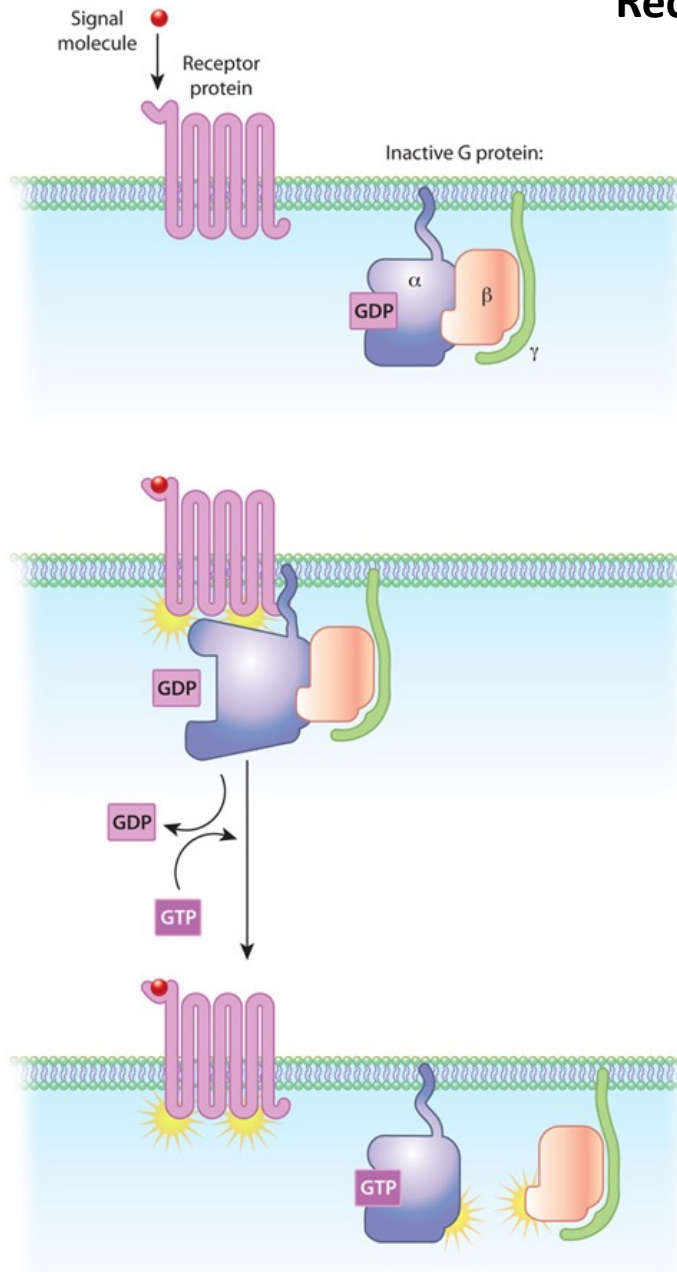
L'istamina lega il recettore H1 sulle cellule endoteliali. Tale recettore è associato alle proteine G (GPCR G-protein coupled receptor).

In risposta al legame del recettore con l'istamina, la subunità  $G\alpha$  lega il GTP e attiva la  $PLC\beta$  (fosfolipasi C beta). La  $PLC\beta$  scinde il fosfatidil inositolo bifosfato della membrana plasmatica rilasciando inositolo trifosfato ( $InsP_3$ ,  $IP_3$ ) che media il rilascio del  $Ca^{2+}$  dal RE.

L'aumento di calcio

- attiva la fosfolipasi A2 che media la liberazione di acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana
- lega la calmodulina formando il complesso  $Ca^{2+}$ -calmodulina che attiva l'ossido nitrico sintetasi

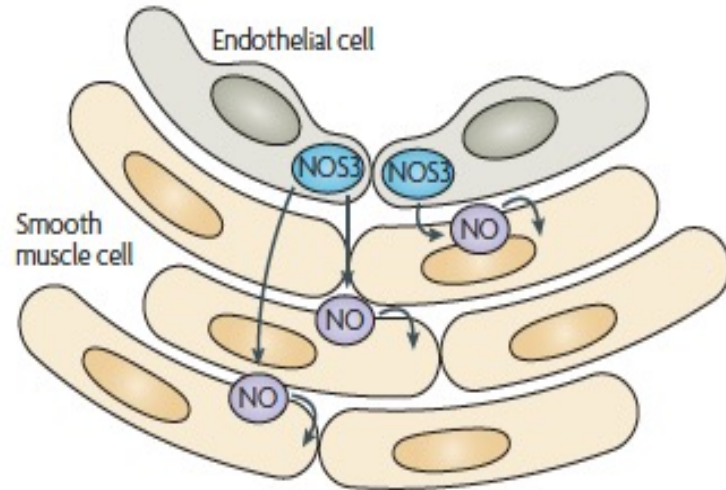
## Recettori accoppiati alle proteine G (GPCR = G protein coupled receptors )



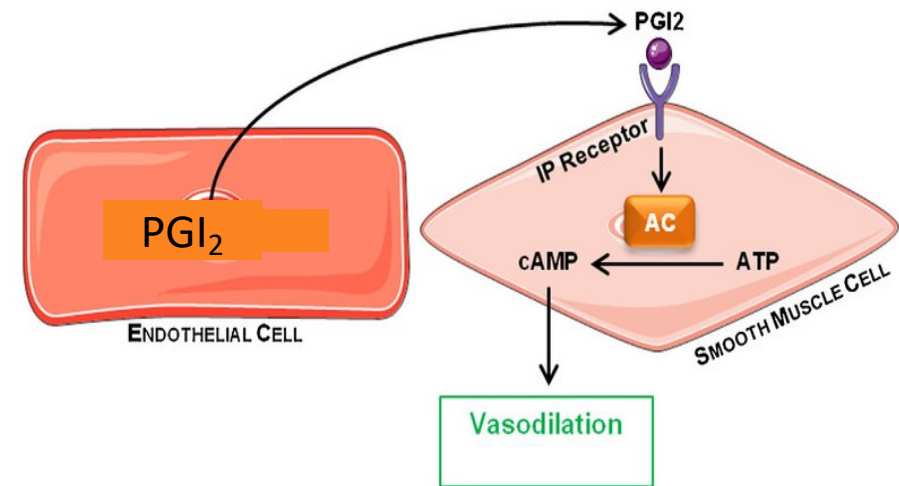
I recettori accoppiati alle proteine G sono un ampio gruppo di recettori negli eucarioti. Quando un segnale esterno lega un GPCR questo causa un cambiamento conformazionale nel recettore che attiva la subunità alfa che lega il GTP e si dissocia dal recettore e dalle subunità beta e gamma. Sia la sub-unità alfa che beta e gamma rimangono associate alla membrana e possono interagire con altre molecole attivandole. In seguito alla idrolisi del GTP le sub-unità si riassociano a formare il trimero alfa, beta e gamma inattivo.

# L'ossido nitrico e la prostaciclina prodotte dalle cellule endoteliali stimolate dall'istamina promuovono la vasodilatazione

b Arteriole



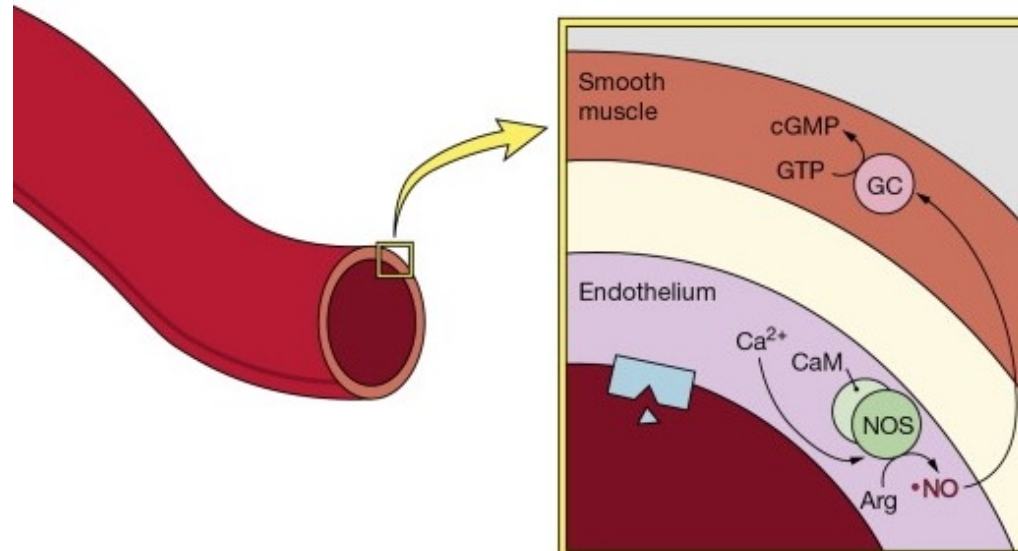
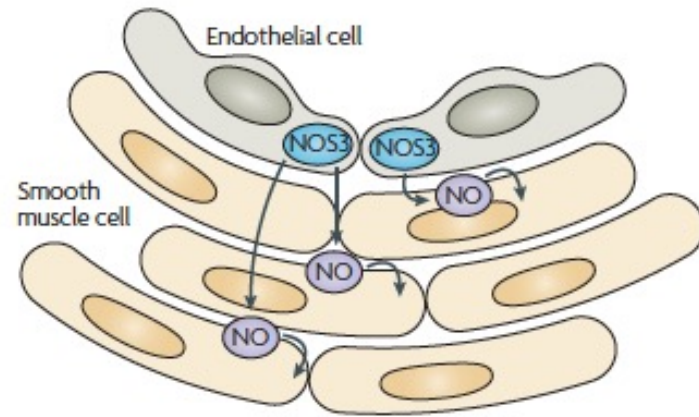
L'ossido nitrico è un radicale libero gassoso



La prostaciclina o prostaglandina I<sub>2</sub> è una prostaglandina, prodotta dal metabolismo dell'acido arachidonico.

# L'ossido nitrico

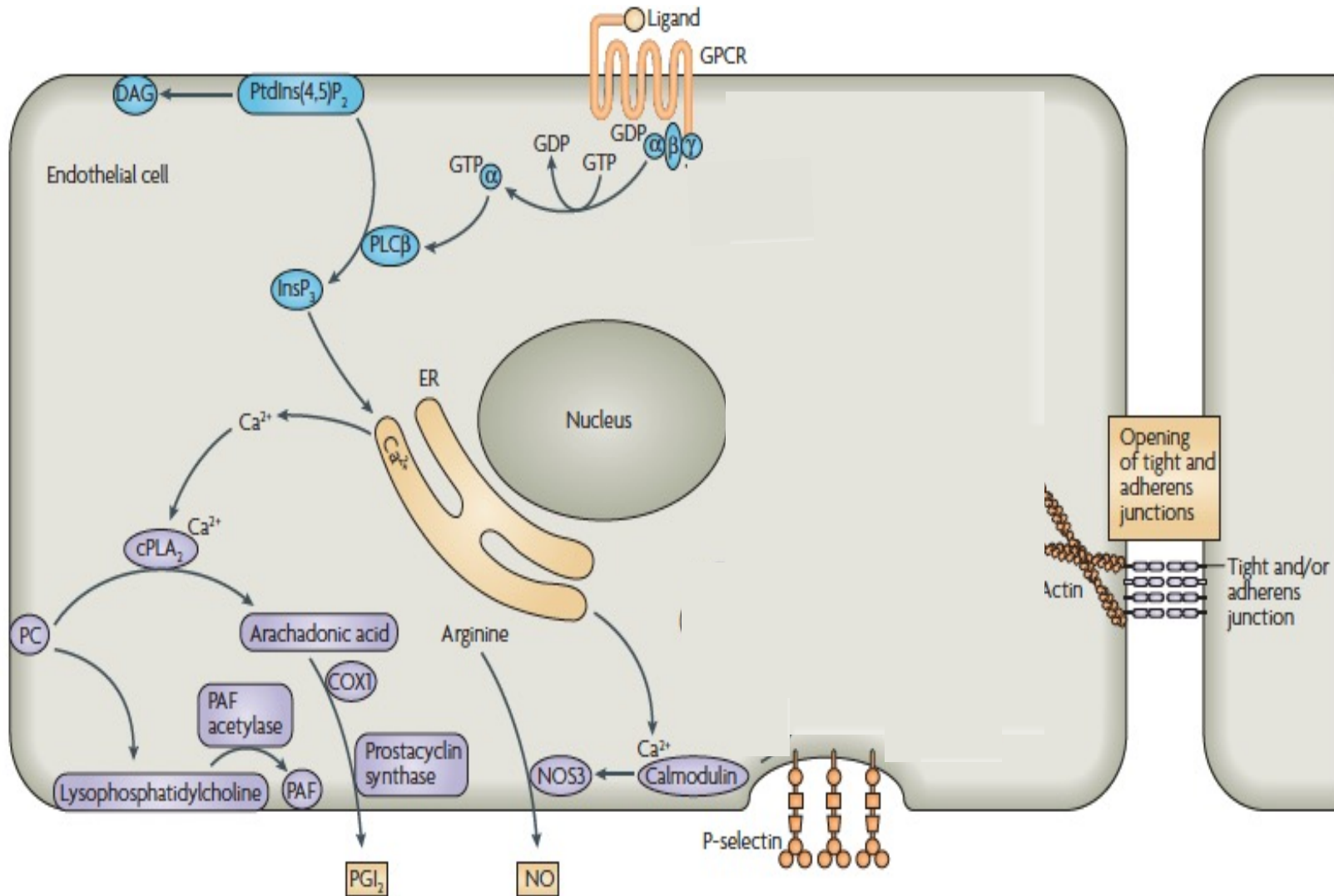
**b Arteriole**



L'ossido nitrico è sintetizzato a partire da L-arginina, ossigeno molecolare e NADPH dall'enzima ossido nitrico sintetasi. L'ossido nitrico è un radicale libero gassoso con azione vasodilatante. Agisce sulle cellule muscolari dei vasi. L'NO diffonde dalle cellule endoteliali nelle cellule muscolari lisce delle arteriole inducendone il rilassamento

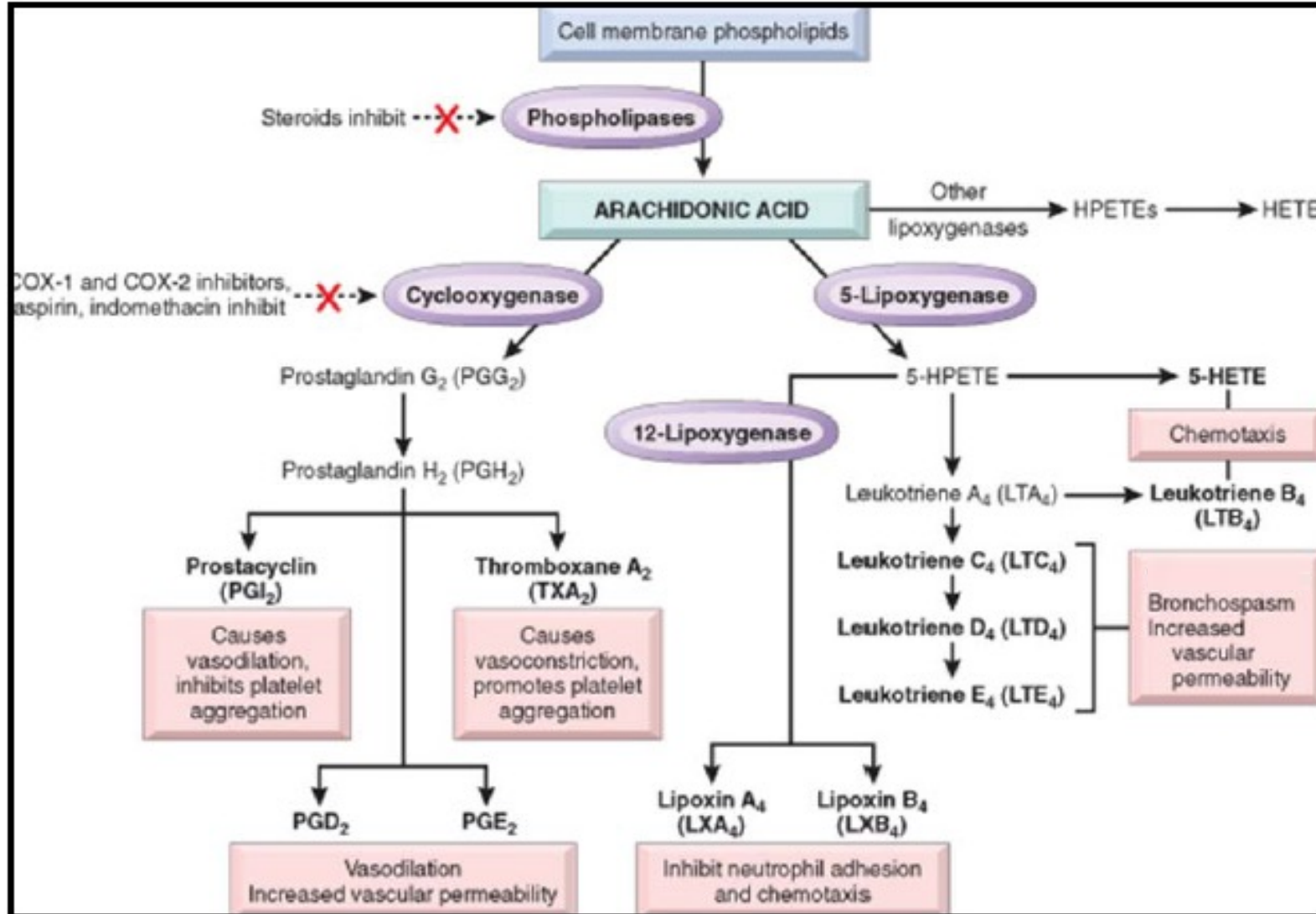
# La prostaglandina I<sub>2</sub> (prostaciclina) causa vasodilatazione

## Cellula endoteliale



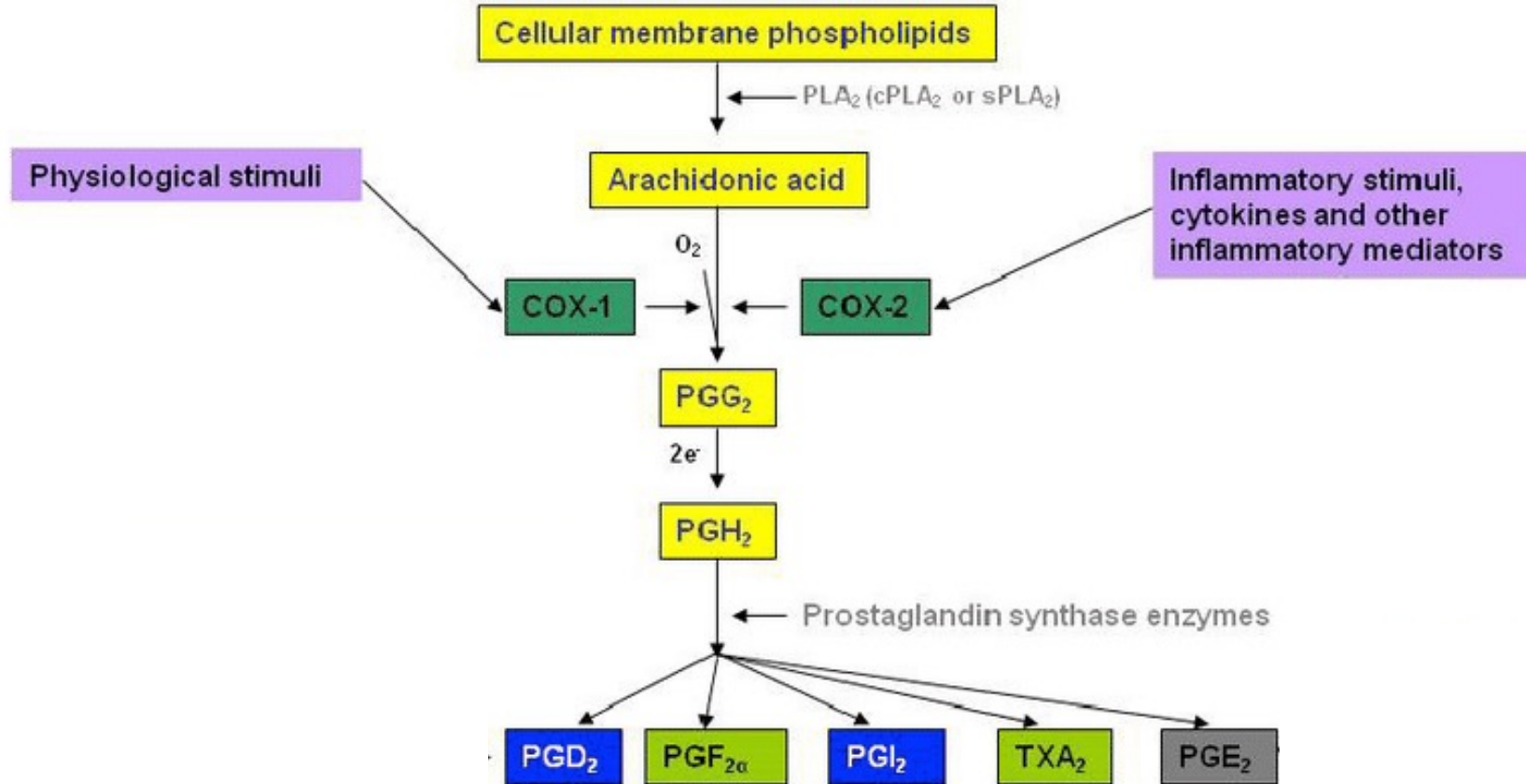
La prostaglandina I<sub>2</sub> o prostaciclina è un metabolita dell'acido arachidonico ed è sintetizzata dalla prostaciclina sintetasi. La prostaciclina sintasi espressa dalle cellule endoteliali media la sintesi di PGI<sub>2</sub>. PGI<sub>2</sub> si lega al recettore espresso dalle cellule muscolari lisce delle arteriole rilassandole e mediando la vasodilatazione.

## I metaboliti dell'acido arachidonico



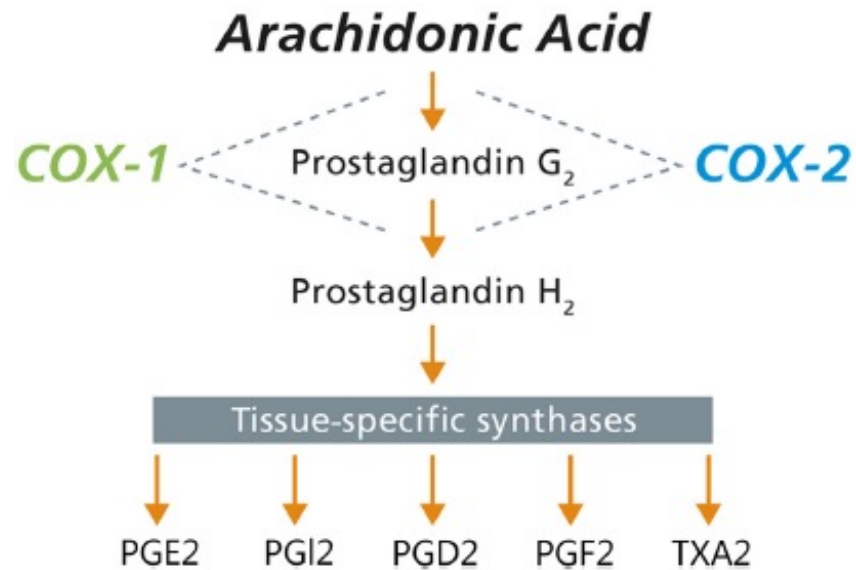
I metaboliti dell'acido arachidonico, anche definiti eicosanoidi sono mediatori lipidici che includono le prostaglandine e i leucotrieni. Le prostaglandine e i leucotrieni promuovono la reazione infiammatoria acuta. Questi mediatori sono prodotti a partire dall'acido arachidonico (AA) presente nei fosfolipidi di membrana. L'acido arachidonico è liberato dalla fosfolipasi A<sub>2</sub>; le prostaglandine e i leucotrieni sono sintetizzati da due classi di enzimi: le ciclossigenasi e le lipossigenasi.

# Biosintesi delle Prostaglandine



Le prostaglandine (PG) e il trombossano sono prodotti a partire dall'acido arachidonico che viene inizialmente convertito dalle ciclossigenasi (COX-1, COX-2) in PGG<sub>2</sub> e successivamente in PGH<sub>2</sub>. Le diverse PG sono successivamente sintetizzate dall'azione di specifici enzimi (sintasi delle prostaglandine), mentre il trombossano è prodotto dalla trombossano sintetasi. Tali enzimi hanno una espressione tissutale ristretta.

## Biosintesi delle Prostaglandine



**Figure 1. COX pathway of arachidonic acid metabolism.** COX-1 or COX-2 converts arachidonic acid to PGG<sub>2</sub> and furthermore to PGH<sub>2</sub> via COX and peroxidase activity. PGH<sub>2</sub> is next metabolized to 5 major bioactive prostanooids—PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, and TXA<sub>2</sub>—through their respective tissue-specific synthases. COX, cyclooxygenase; PG, prostaglandin; TX, thromboxane.

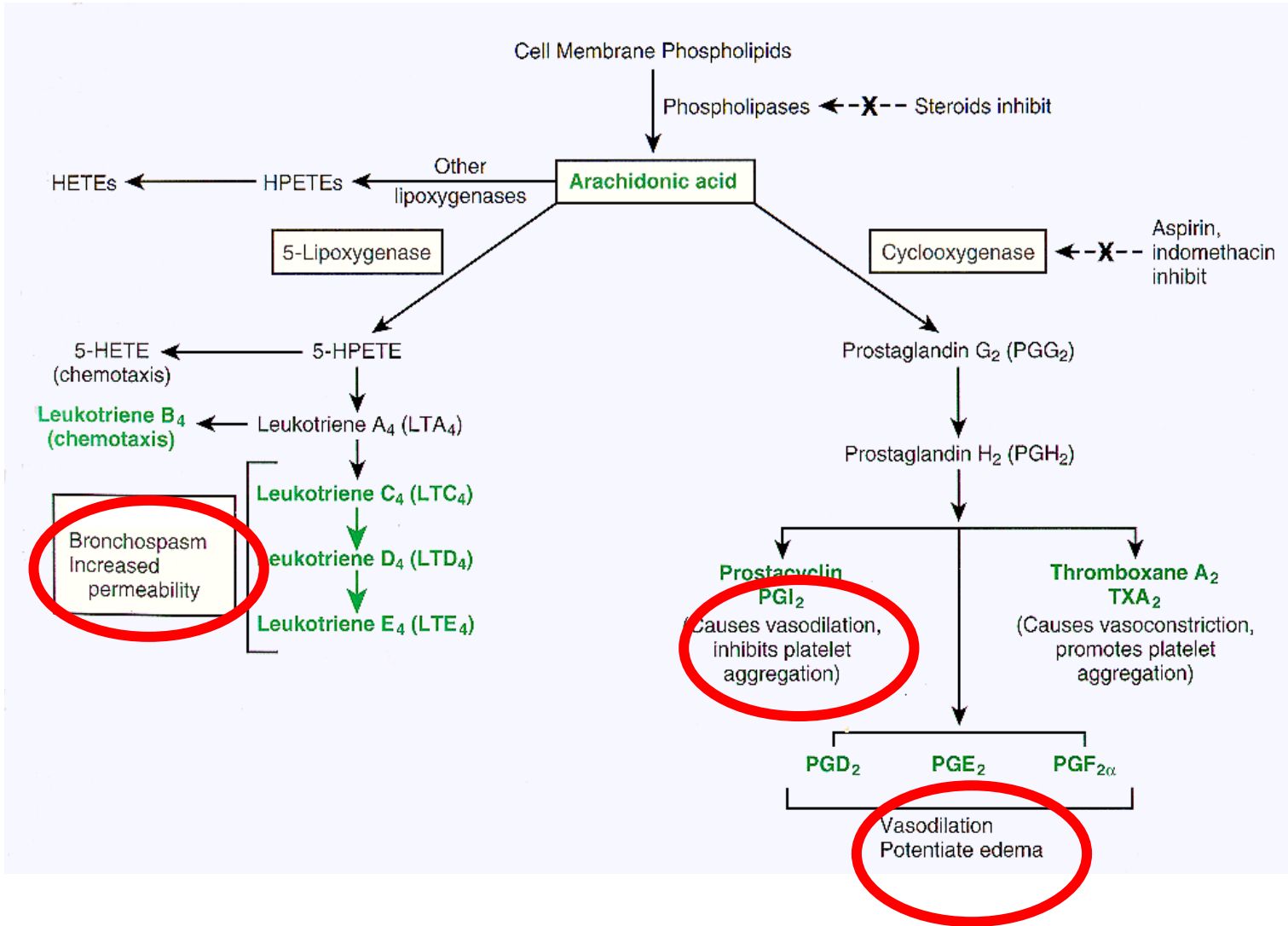
Le ciclossigenasi sono COX-1 e COX2. COX-1 è costitutivamente espressa dalla maggior parte delle cellule. COX-2 è indotta nelle cellule che partecipano al processo infiammatorio (macrofagi, mastociti, endotelio) in risposta a stimoli quali citochine. La reazione iniziale delle ciclossigenasi trasforma l'acido arachidonico in PGH<sub>2</sub>. Le diverse PG sono successivamente sintetizzate dall'azione di specifici enzimi che hanno una espressione tissutale ristretta. Per esempio le cellule endoteliali esprimono la prostaciclina sintasi responsabile della produzione di PGI<sub>2</sub> o prostaciclina che è un vasodilatatore.

La PGD<sub>2</sub> è la prostaglandina maggiormente prodotta dai mastociti.

La trombassano sintetasi è espressa dalle piastrine.

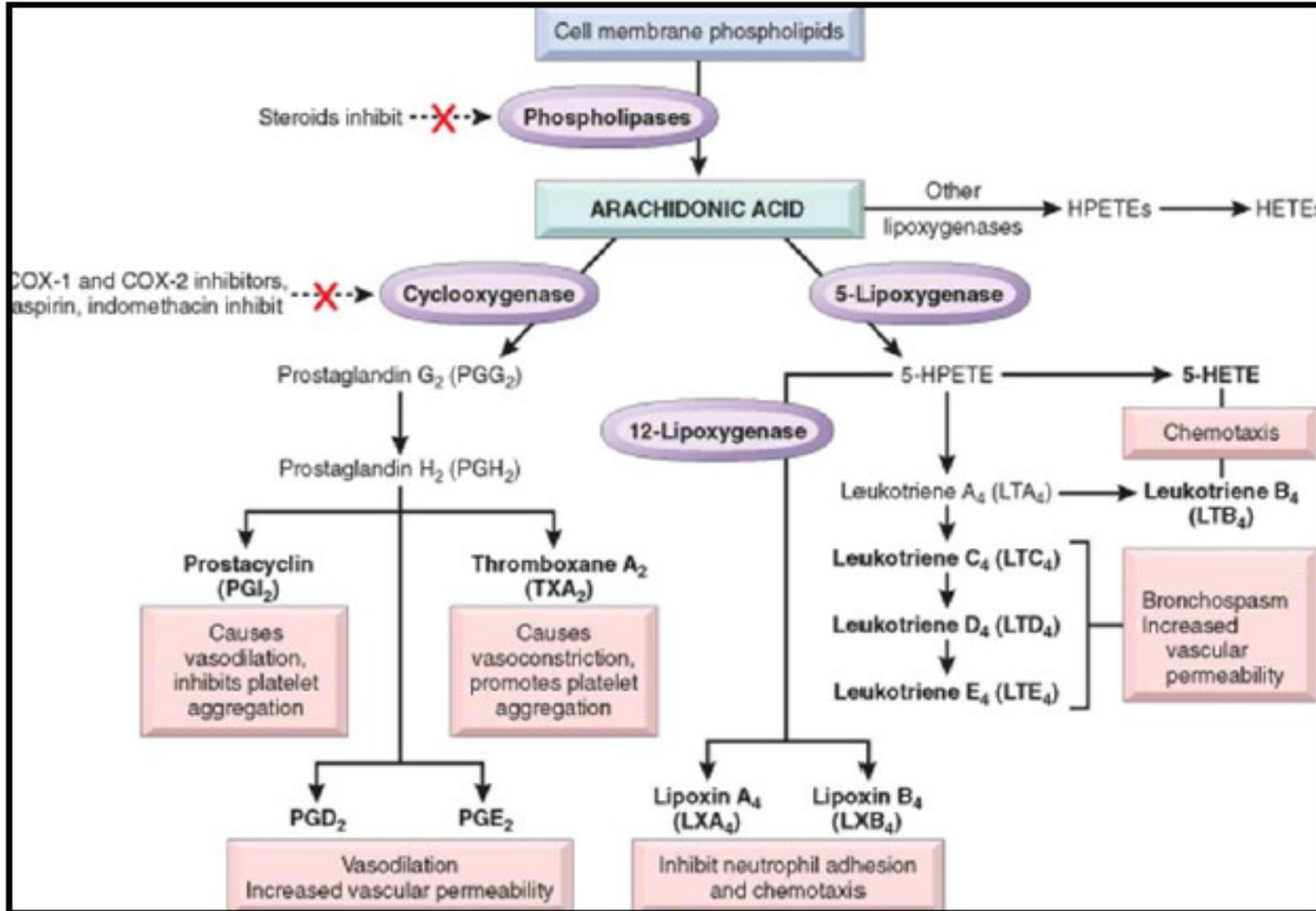
In condizioni fisiologiche le prostaglandine regolano diversi processi fra cui: l'integrità della mucosa gastrointestinale, del sistema circolatorio, la contrazione dell'utero, la pressione oculare.

# Metaboliti dell'acido arachidonico: le prostaglandine e trombossano



Durante l'infiammazione le prostaglandine hanno una azione vasodilatante. La Prostaciclina inibisce l'aggregazione piastrinica mentre il Trombossano favorisce l'aggregazione piastrinica e causa vasoconstrizione. Le prostaglandine promuovono l'eccitabilità dei neuroni recettori del dolore aumentandone la sensibilità. Le prostaglandine agiscono legandosi a recettori cellulari.

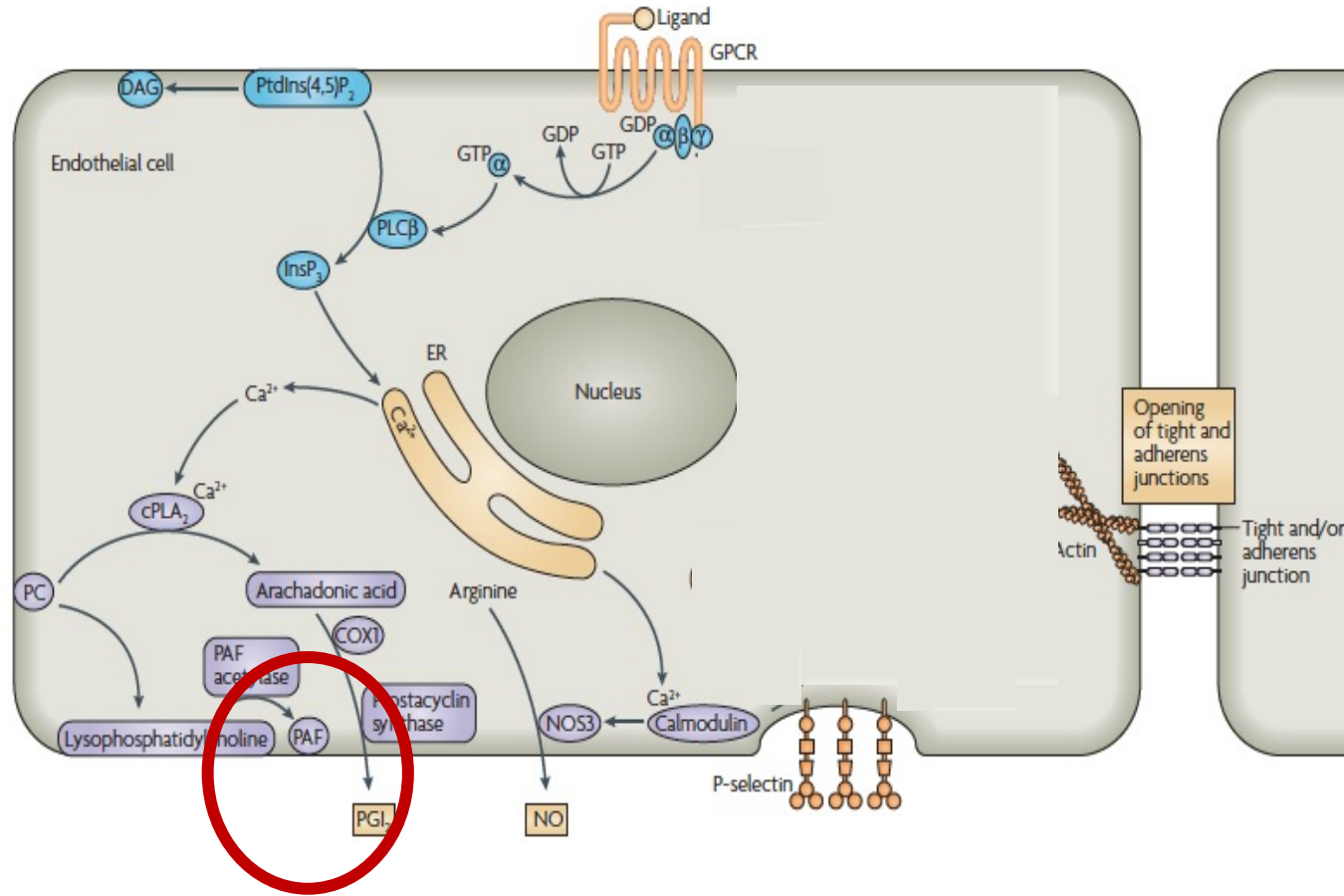
# I metaboliti dell'acido arachidonico: leucotrieni



I leucotrieni sono prodotti dai leucociti e dai mastociti ad opera dell'enzima lipossigenasi. La 5-lipossigenasi converte l'acido arachidonico in acido 5-idrossieicosatetraenoico (5-HPETE) che è il precursore dei leucotrieni. Il leucotriene B<sub>4</sub> è un fattore chemiotattico per i leucociti. LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> causano un aumento della permeabilità dei vasi. I leucotrieni legano recettori associati a proteine G.

Anche le lipossine sono prodotte a partire dall'acido arachidonico. Queste molecole sopprimono l'infiammazione inibendo l'adesione dei neutrofili all'endotelio e la loro migrazione.

# Altri mediatori lipidici dell'inflammatione: platelet activating factor (PAF)

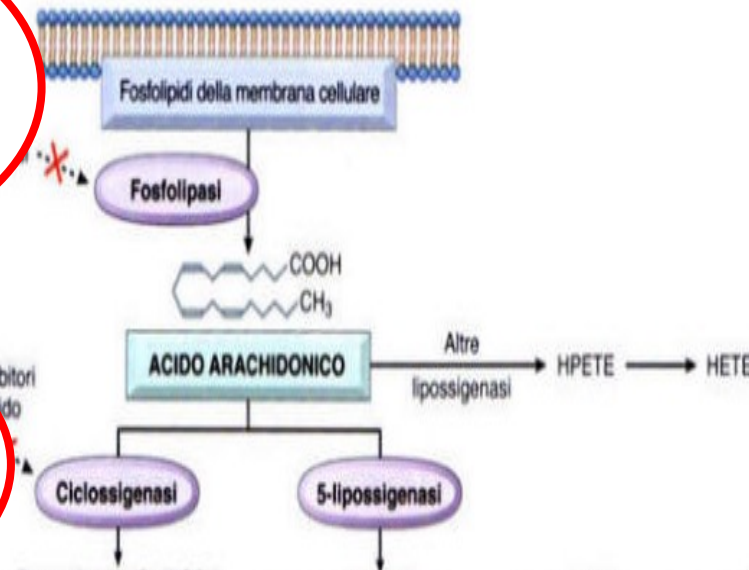


Il PAF è un mediatore dell'inflammatione, prodotto dalle piastrine, monociti, macrofagi, neutrofili e cellule endoteliali. Il PAF promuove la vasodilatazione e la vasopermeabilità. Durante l'inflammatione viene prodotto in seguito alla liberazione dell'acido arachidonico dalla fosfatidilcolina da parte della PLA $_2$  con generazione della lisofosfatidilcolina (LPC). Successivamente il trasferimento di un gruppo acetile alla LPC darà origine al PAF (platelet activating factor).

## Farmaci anti-infiammatori non-steroidi

Inibizione da farmaci anti-infiammatori steroidei (cortisonici o corticosteroidi)

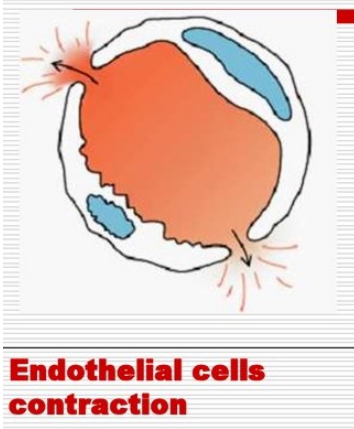
Inibizione mediata da inibitori di COX-1 e COX-2 FANS (farmaci anti-infiammatori non-steroidi) come L'acido acetilsalicilico (aspirina) e Ibuprofene



I farmaci anti-infiammatori possono essere steroidei e non steroidei. I farmaci steroidei (cortisonici o corticosteroidi) agiscono inibendo la  $PLA_2$  e bloccando la trascrizione di citochine pro-infiammatorie.

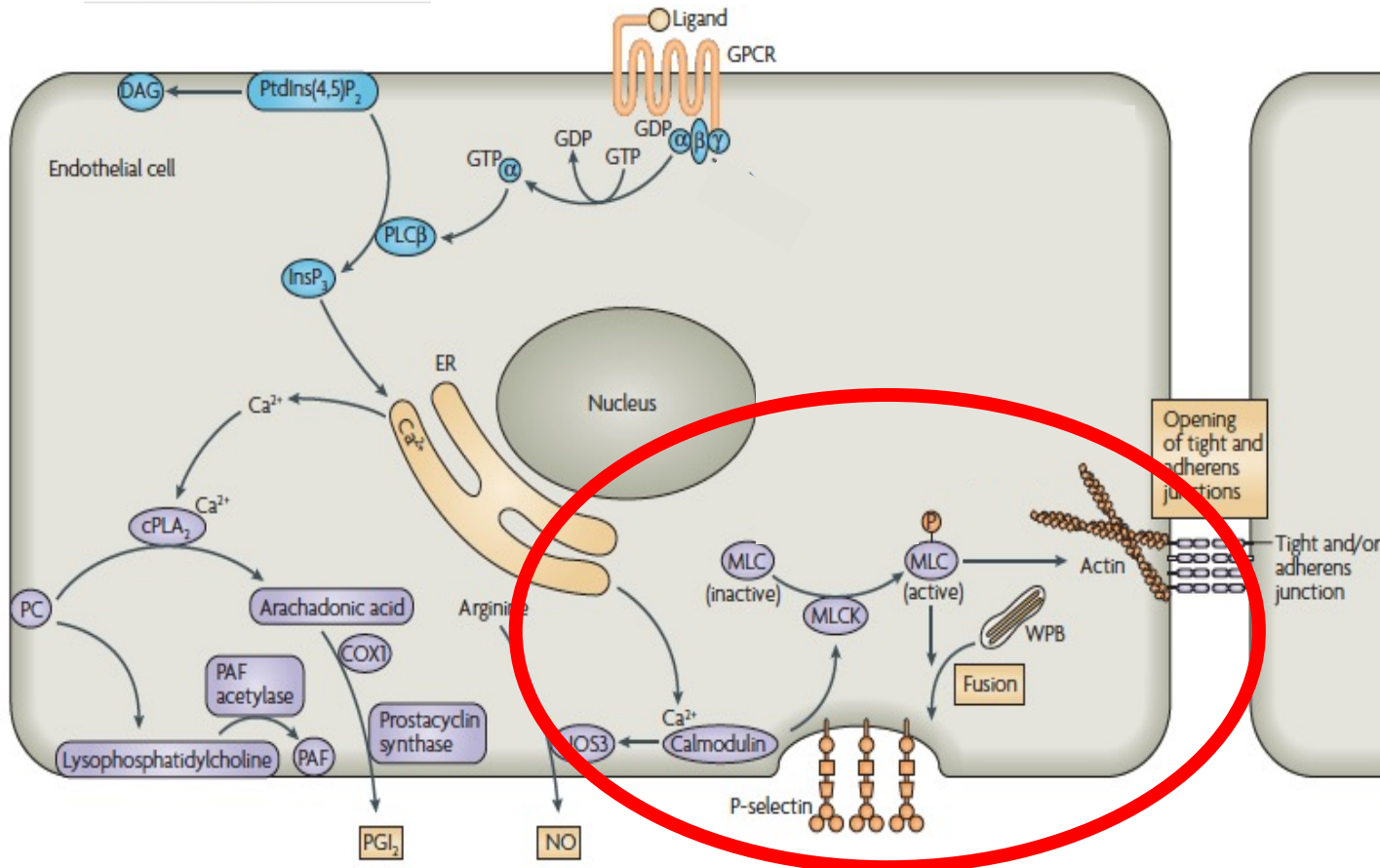
I farmaci anti-infiammatori non steroidei (NSAID, FANS) che includono l'aspirina (acido acetilsalicilico) e l'ibuprofene (brufen) Oki (ketoprofene) agiscono inibendo gli enzimi COX e quindi la sintesi delle prostaglandine. Oltre ad avere un effetto anti-infiammatorio, hanno un effetto anti-dolorifico e abbassano la febbre. L'aspirina ha anche proprietà anticoagulanti. La tachipirina (paracetamolo) non è un FANS è un antipiretico e antidolorifico. Il paracetamolo agisce a livello del sistema nervoso sui neuroni del centro della termoregolazione.

# L'istamina aumenta la permeabilità vascolare inducendo la contrazione delle cellule endoteliali



La contrazione delle cellule endoteliali è il meccanismo più comune di aumento della permeabilità vascolare provocata dall'istamina, leucotrieni e altri mediatori.

Questa contrazione avviene rapidamente dopo l'esposizione al mediatore.



Il complesso Ca $^{2+}$  -calmodulina attiva l'enzima myosin-light-chain kinase (MLCK) che fosforila la miosina. La miosina fosforilata inizia la contrazione dei filamenti di actina che sono associati alle tight junctions causando l'apertura di spazi fra le cellule.

# Principali meccanismi che causano l'aumento della permeabilità vascolare nella risposta infiammatoria

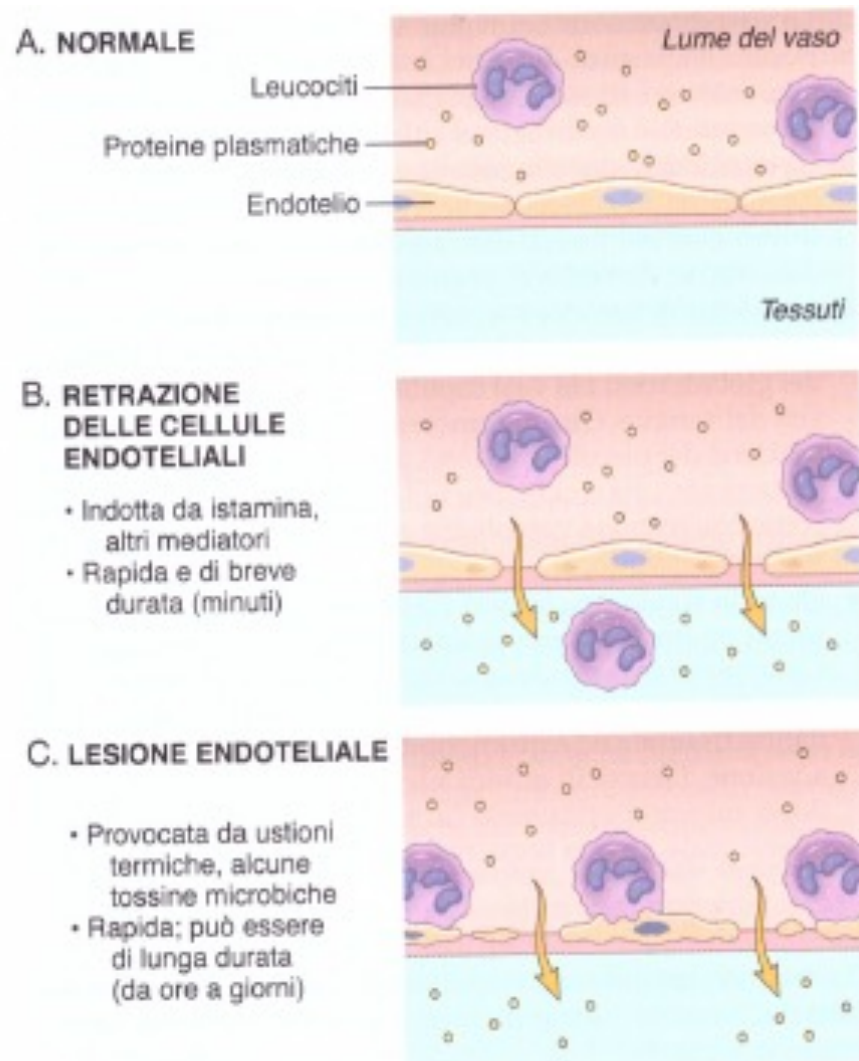
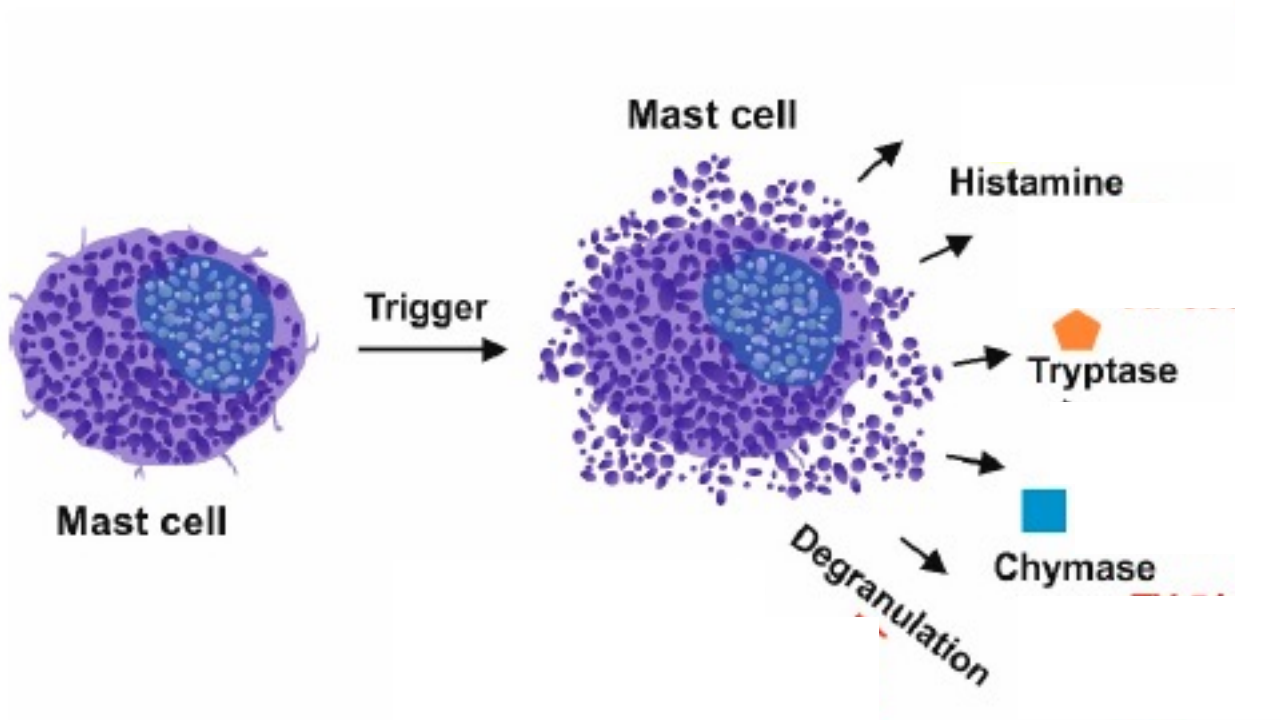


Figura 3.3 I principali meccanismi, le caratteristiche e le cause che determinano l'aumento della permeabilità vascolare nella risposta infiammatoria.

L'aumento della permeabilità vascolare nella risposta infiammatoria può essere dovuto a:

- La **contrazione delle cellule endoteliali** è provocata anche da altri mediatori come la bradichinina e i leucotrieni.
- Il **danno diretto dell'endotelio** si manifesta con necrosi delle cellule endoteliali. Questo può essere causato da danni fisici gravi come ustioni e tossine batteriche.

## Stimoli che inducono la degranulazione dei mastociti



La degranulazione dei mastociti con conseguente rilascio di istamina è indotta da diversi stimoli:

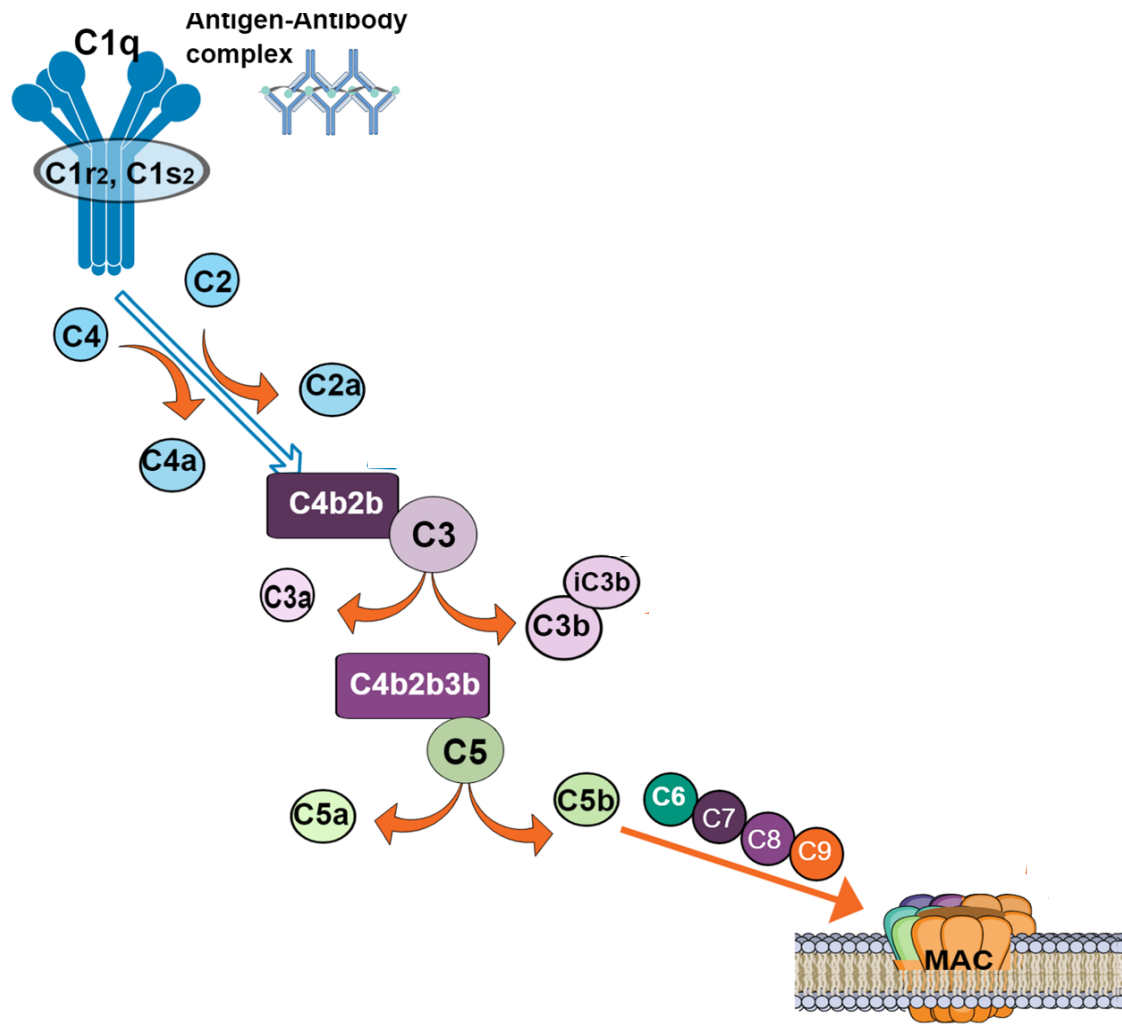
- calore , trauma meccanico
- legame con il fattore C3a e C5a del complemento
- interazione con batteri

## Altri mediatori vasoattivi nel processo infiammatorio

<b>Mediatori vasoattivi dell'infiammazione</b>	
Vasodilatazione	Istamina /Bradichinina Ossido nitrico Prostaglandine
Aumento della permeabilità vascolare	Istamina C3a e C5a (tramite il rilascio di istamina) Bradichinina Leucotrieni C <sub>4</sub> ,D <sub>4</sub> ,E <sub>4</sub> PAF Sostanza P

Le modificazioni vascolari ed in particolare l'aumento della permeabilità vascolare sono mediate anche da proteine plasmatiche che appartengono ai sistemi delle chinine e del complemento.

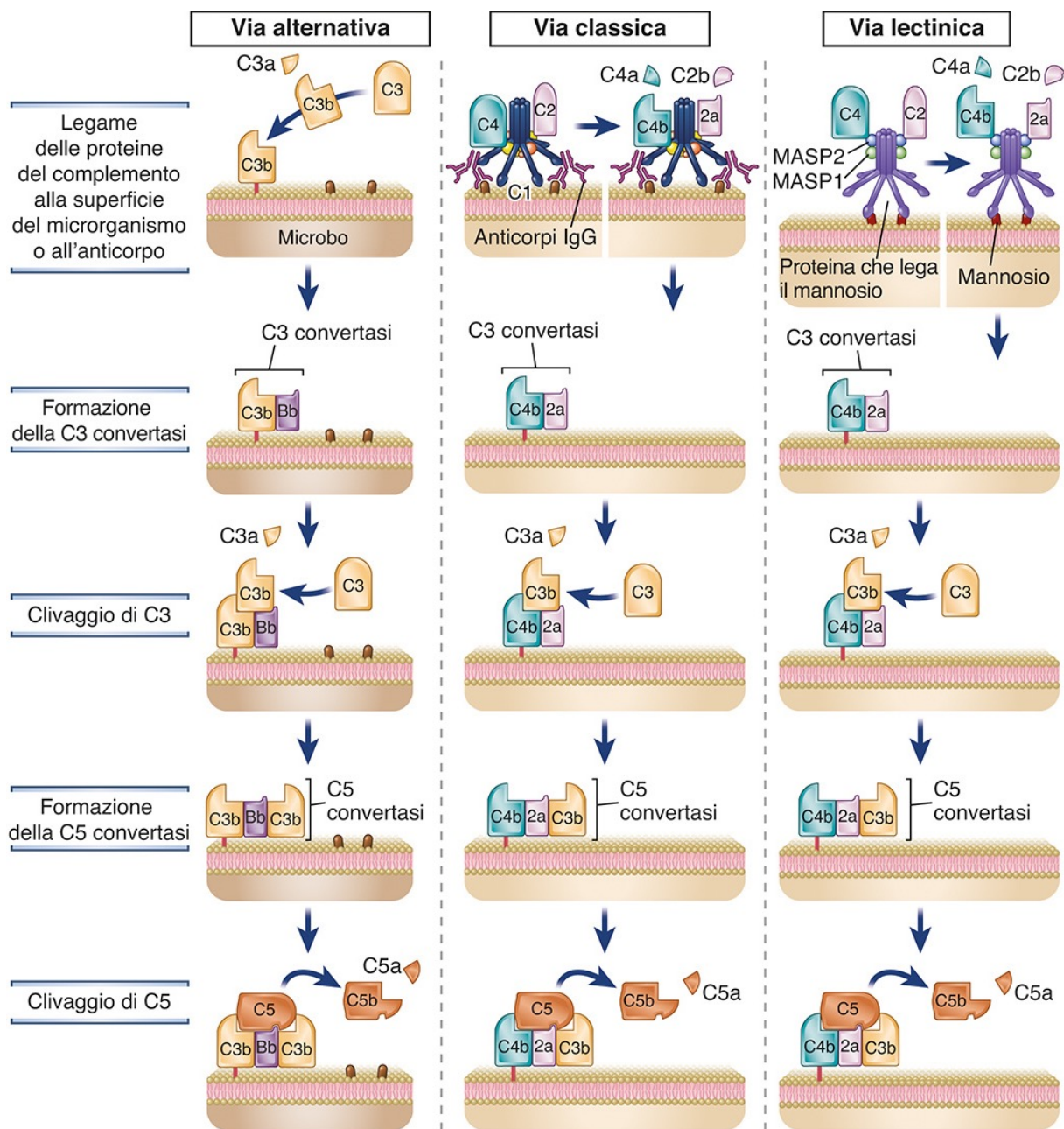
## Il Complemento



Il sistema del complemento è costituito da proteine inattive nel plasma e denominate C1-C9. Molte di queste proteine sono attivate in modo da divenire enzimi proteolitici che scindono altre componenti del complemento così da realizzare una cascata enzimatica che culmina con la formazione del complesso di attacco della membrana (MAC) che è costituito da molecole C9.

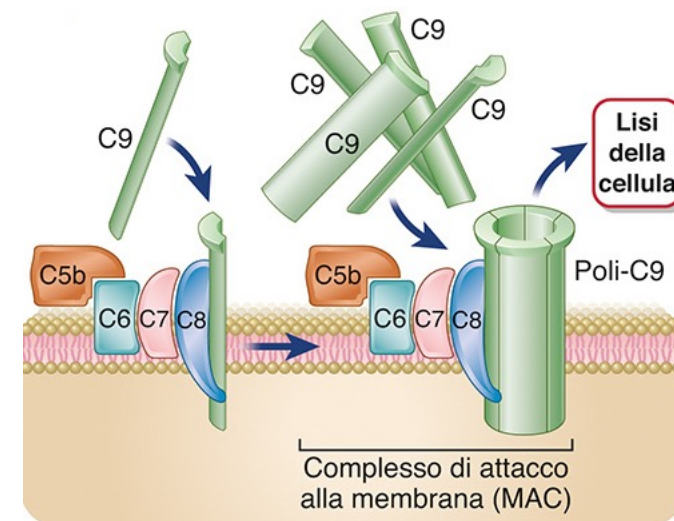
Le funzioni biologiche del complemento sono mediate dal MAC e dall'azione dei frammenti che derivano dal taglio proteolitico dei componenti del complemento.

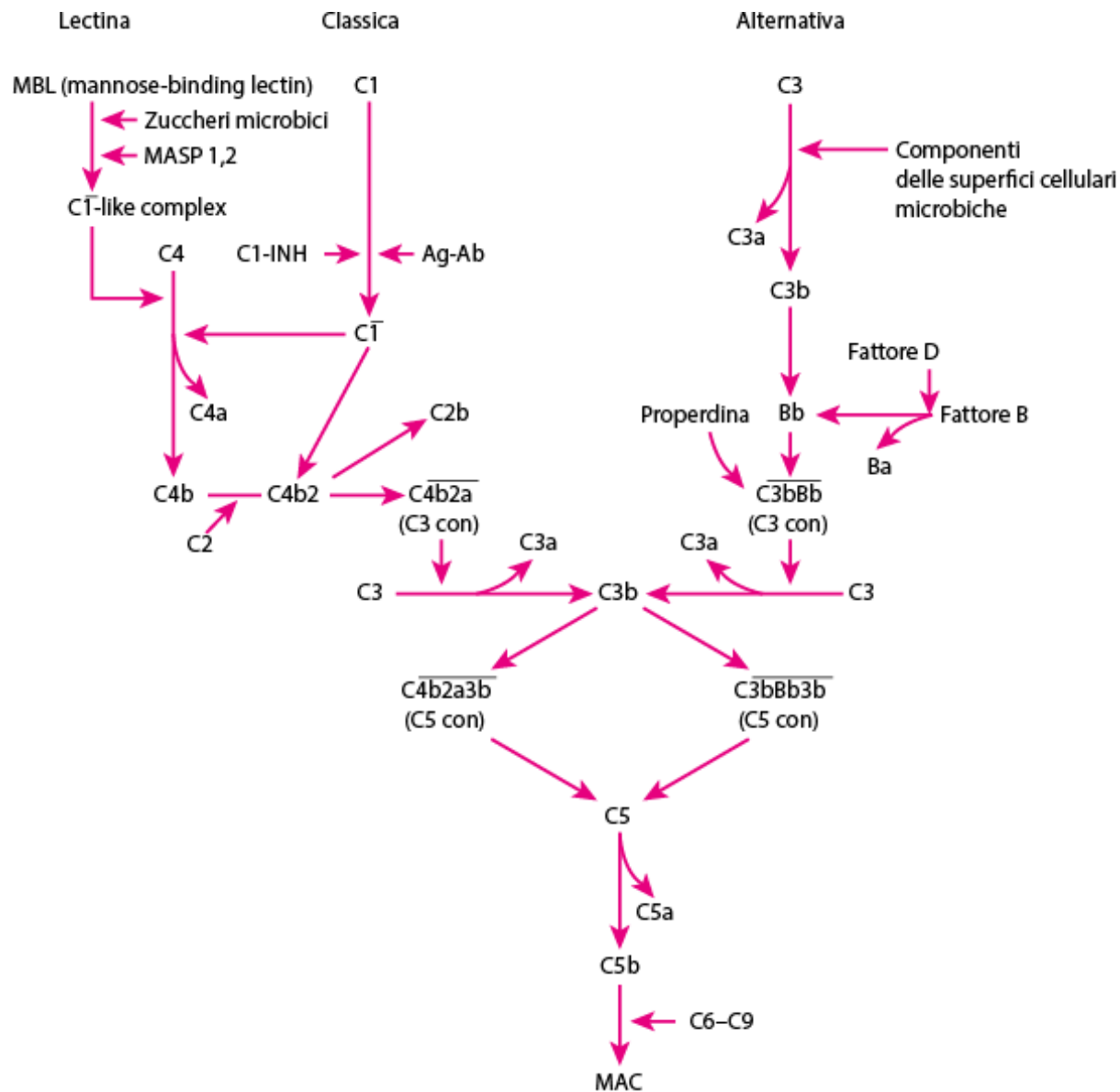
# Sistema del complemento



Il sistema del complemento può essere attivato dai complessi antigene- anticorpo (via classica); da componenti delle superfici dei microbi (via alternativa); via lectinica (zuccheri microbici).

Attivazione delle componenti terminali del complemento

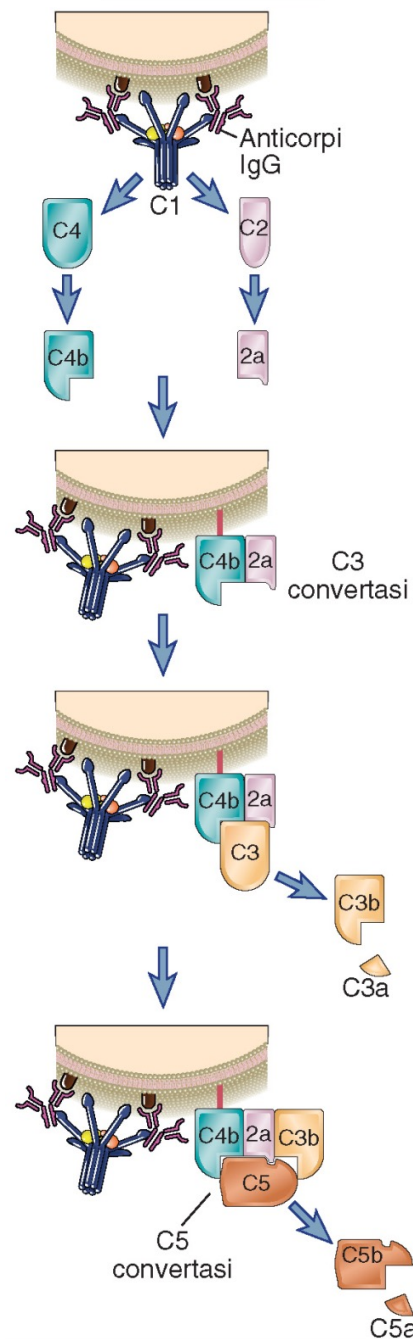




Le tre vie di attivazione del complemento convergono in un tratto finale comune che porta alla formazione del complesso di attacco della membrana (MAC).

Il MAC è un poro che deriva dalla polimerizzazione della componente C9 del complemento. Il MAC provoca la lisi delle cellule estranee.

## Via classica



## Via classica di attivazione del complemento

La via classica di attivazione del complemento viene avviata dal legame della componente C1 alle IgG o alle IgM legate all'antigene. C1 è composto da C1q, r, s. C1q composta da sei catene lega gli anticorpi mentre C1s e r hanno attività enzimatica.

Il cambiamento conformazionale dovuto al legame C1q-Ig permette l'attivazione del C1r che scinde il C1s attivandolo.

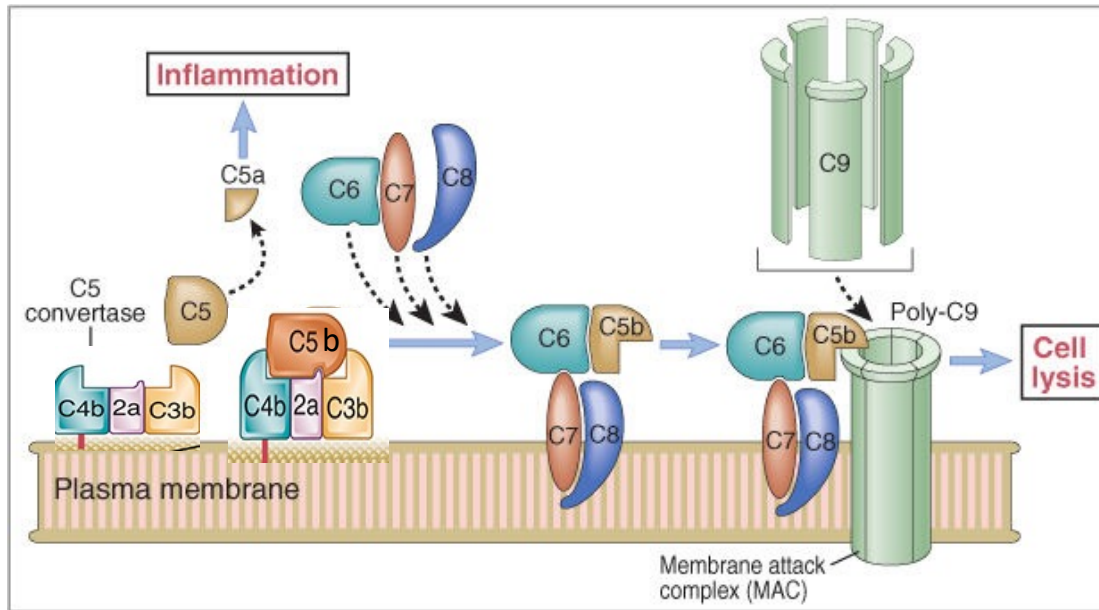
Il C1s scinde il C4 in C4a e C4b che si lega covalentemente all'antigene o all'anticorpo.

Il C2 che ha una tendenza a legare il C4b viene scisso dal C1s in C2a e C2b.

Il complesso C4bC2a è la C3 convertasi.

La C3 convertasi scinde il C3 dando origine ai due prodotti C3a e C3b. Quest'ultimo si lega covalentemente al complesso C4b2a generando la C5 convertasi.

## Tappe tardive dell'attivazione del complemento



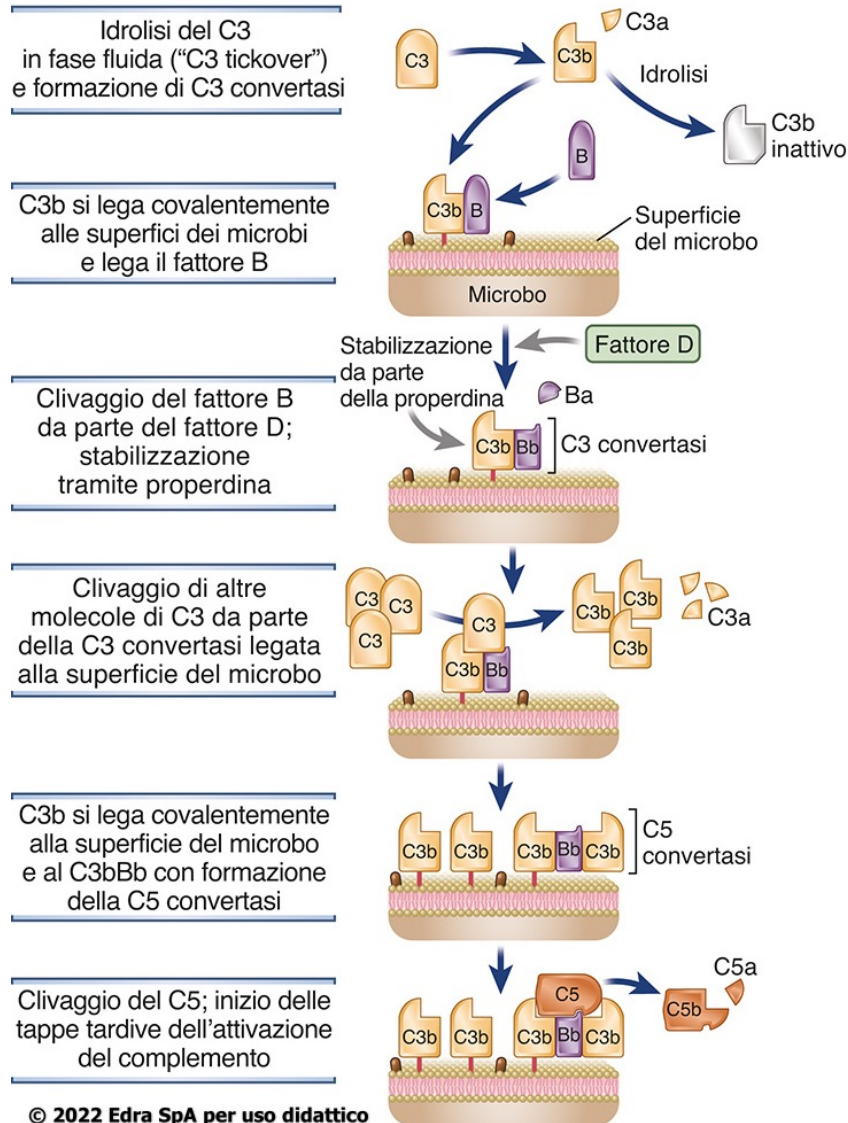
© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

La C5 convertasi da inizio alla formazione del complesso di attacco della membrana denominato MAC che causa lisi della cellula

Il C5b mantiene una conformazione in grado di legare il C6, successivamente si legheranno C7, C8.

Infine la polimerizzazione del C9 determina la formazione di pori sulla membrana che permettono l'entrata nella cellula di acqua e ioni extracellulari mediando la lisi della cellula.

# Via alternativa di attivazione del complemento



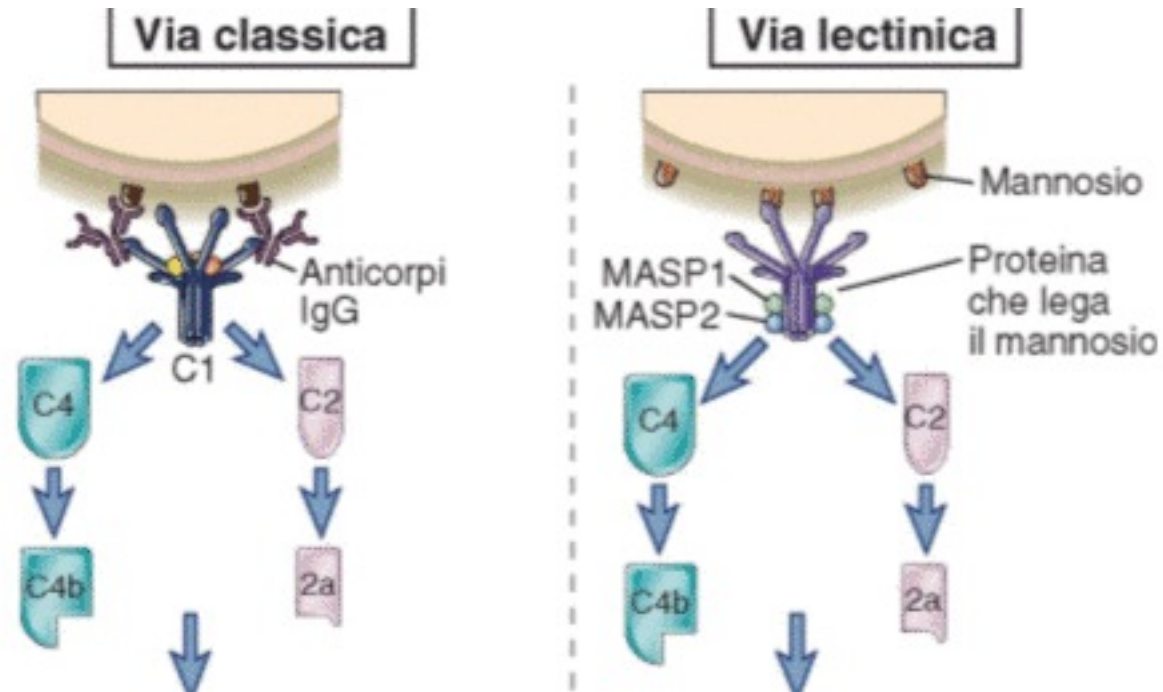
La cascata del complemento può essere attivata attraverso **la via alternativa**.

Il C3 spontaneamente può generare C3b. Questa molecola è altamente reattiva e può legarsi a superfici cellulari. Il C3b sulla superficie cellulare lega la proteina B.

La proteina B legata viene scissa ad opera della fattore D (serin proteasi) rilasciando un frammento Ba mentre il frammento Bb resta legato al C3b formando C3bBb che è la C3 convertasi che quindi scinde il C3 amplificando la produzione C3b.

Questo meccanismo viene innescato in seguito al legame del C3b sulla superficie dei batteri.

## Attivazione del complemento attraverso la via lectinica



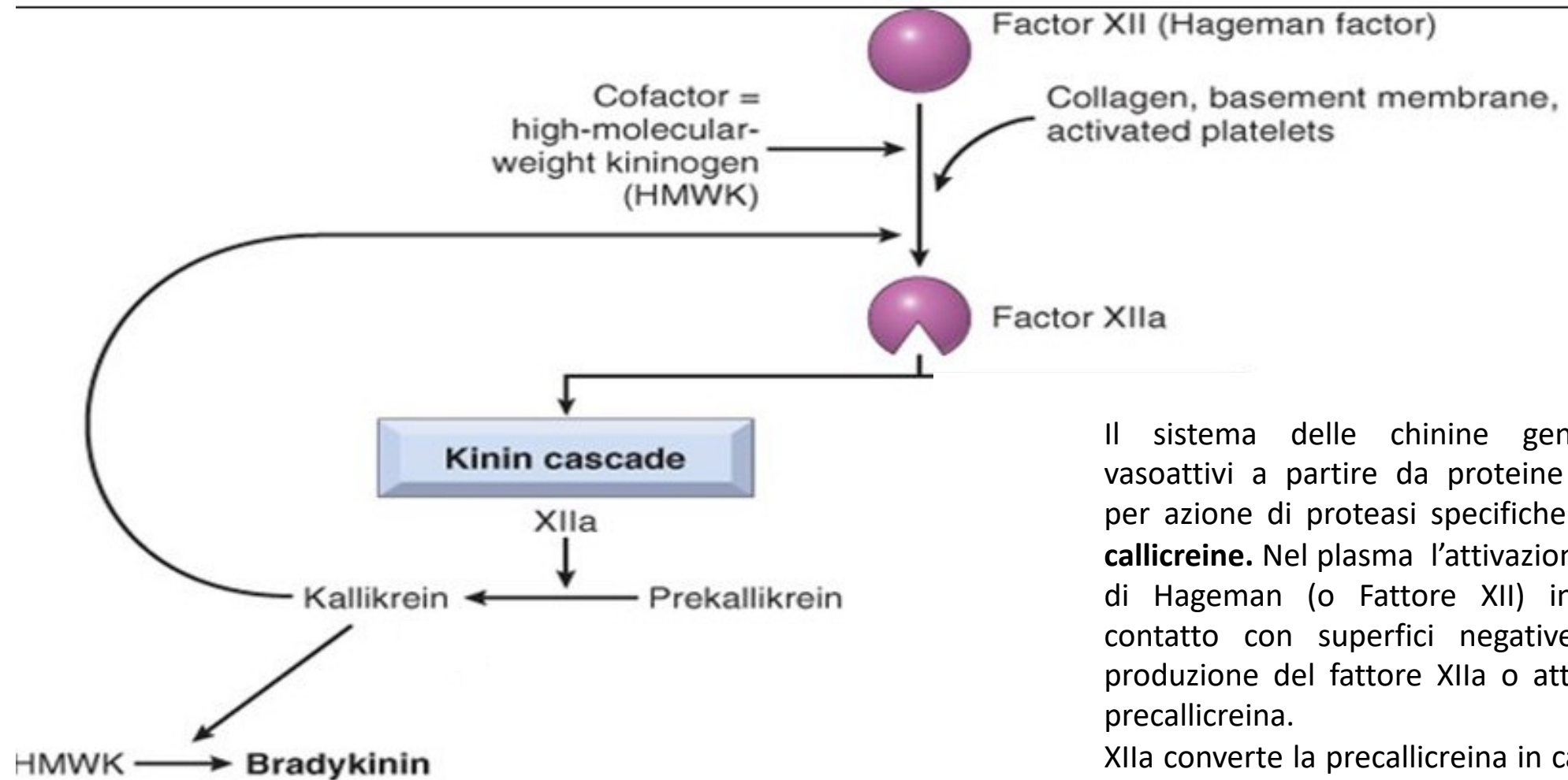
La via lectinica di attivazione del complemento si attiva a partire dall'interazione dei polisaccaridi microbici con le lectine circolanti quali la lectina legante il mannosio (Mannose/mannan binding lectin MBL). La MBL che ha legato gli zuccheri presenti sul microorganismo interagisce con le serine proteasi associate, le MASP; i cui membri sono: MASP-1, MASP-2 e MASP-3. Le proteine MASP hanno una struttura omologa a quella delle proteasi C1r e C1s della frazione C1 e svolgono funzioni molto simili. MASP-2 che forma un complesso con MASP-1 taglia le frazioni C4 e C2. Gli eventi conseguenti a questa reazione sono identici a quelli che avvengono nella via classica.

## Altri mediatori vasoattivi nel processo infiammatorio

<b>Mediatori vasoattivi nell'infiammazione</b>	
Vasodilatazione	Istamina/Bradichinina Ossido nitrico Prostaglandine
Aumento della permeabilità vascolare	Istamina C3a e C5a (per liberazione di istamina da parte dei mastociti) Leucotrieni C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> , E <sub>4</sub> Bradichinina PAF Sostanza P

Le modificazioni vascolari ed in particolare l'aumento della permeabilità vascolare sono mediate da proteine plasmatiche che appartengono ai sistemi delle chinine e del complemento.

## Altri mediatori vasoattivi nel processo infiammatorio: la bradichinina

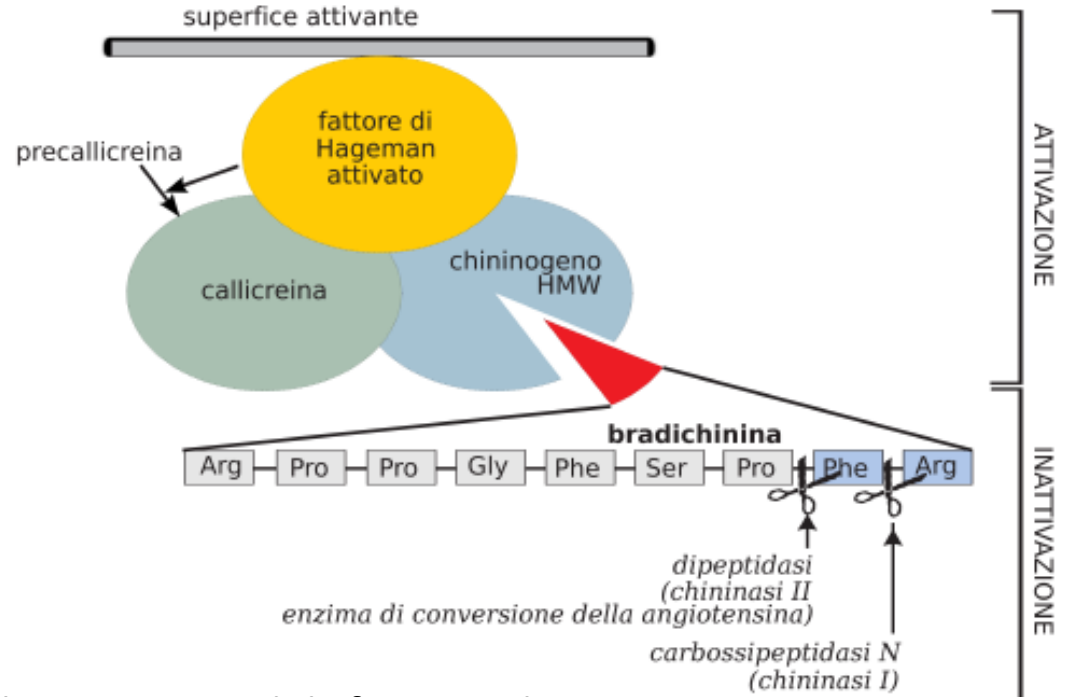
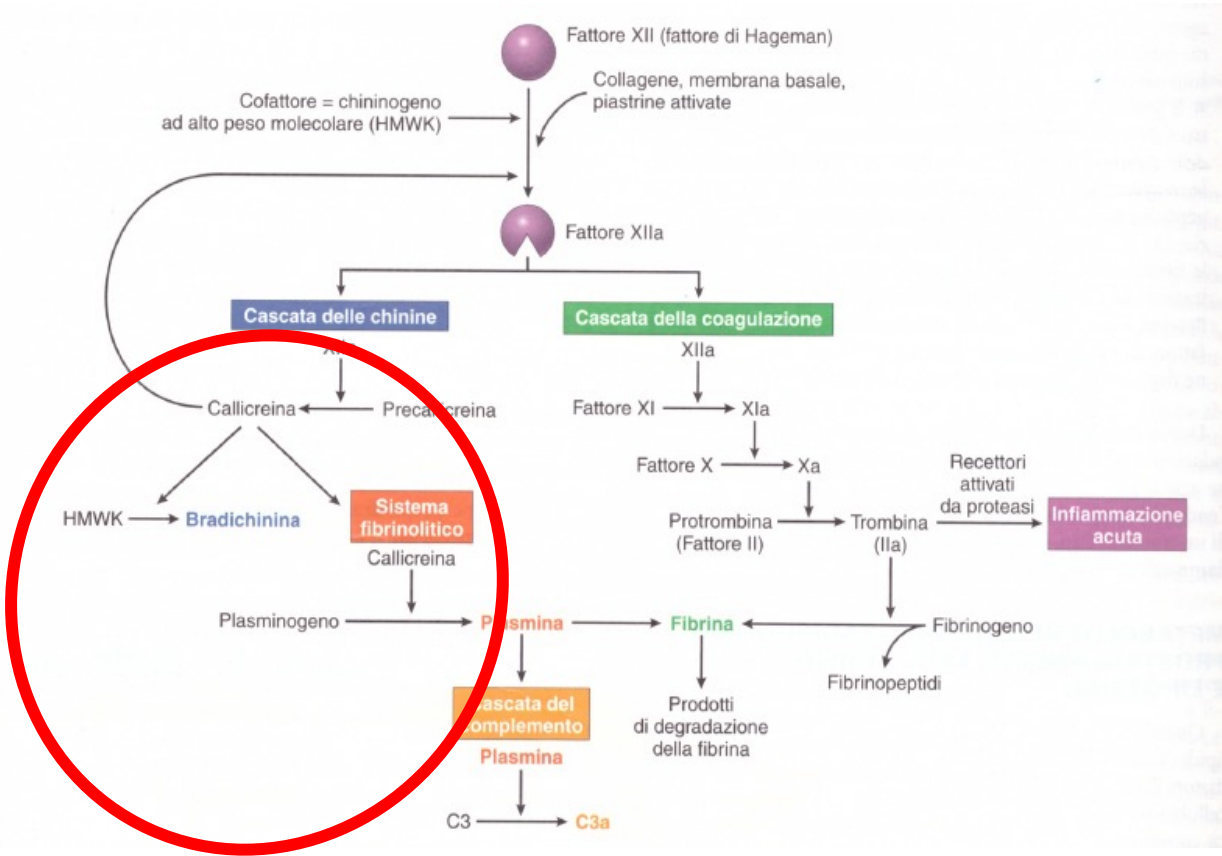


HMWK= chininogeno ad alto peso molecolare

Il sistema delle chinine genera peptidi vasoattivi a partire da proteine plasmatiche per azione di proteasi specifiche denominate **callicreine**. Nel plasma l'attivazione del fattore di Hageman (o Fattore XII) in seguito al contatto con superfici negative porta alla produzione del fattore XIIa o attivatore della precallicreina.

XIIa converte la precallicreina in callicreina che a sua volta scinde il chininogeno ad alto peso molecolare in **bradichinina**.

# Produzione della bradichinina



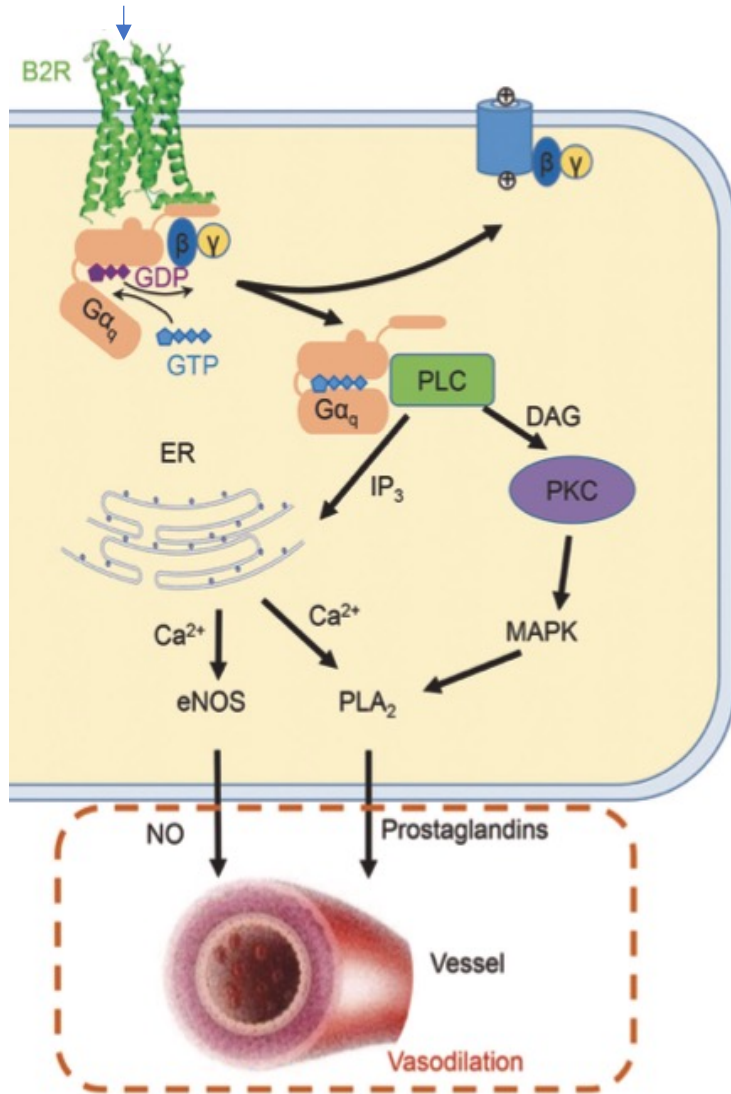
Gli attivatori del fattore di Hageman includono: collagene, membrana basale, o piastrine attivate

Il fattore di Hageman attivato da origine a 4 sistemi:

- Sistema delle chinine
- Sistema della coagulazione
- Sistema della fibrinolisi
- Sistema del complemento

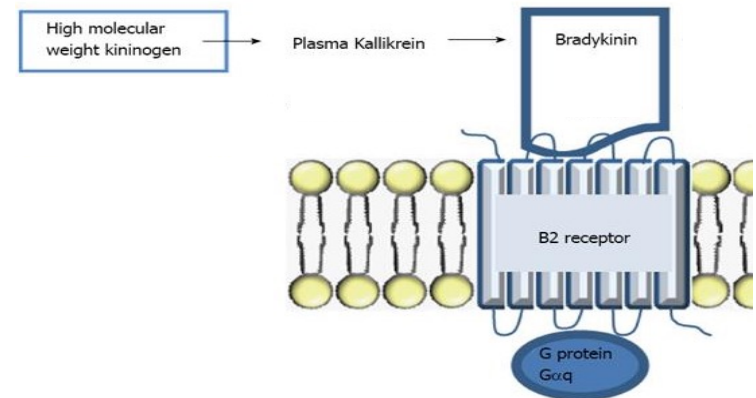
# Recettori e meccanismo di azione della Bradichinina

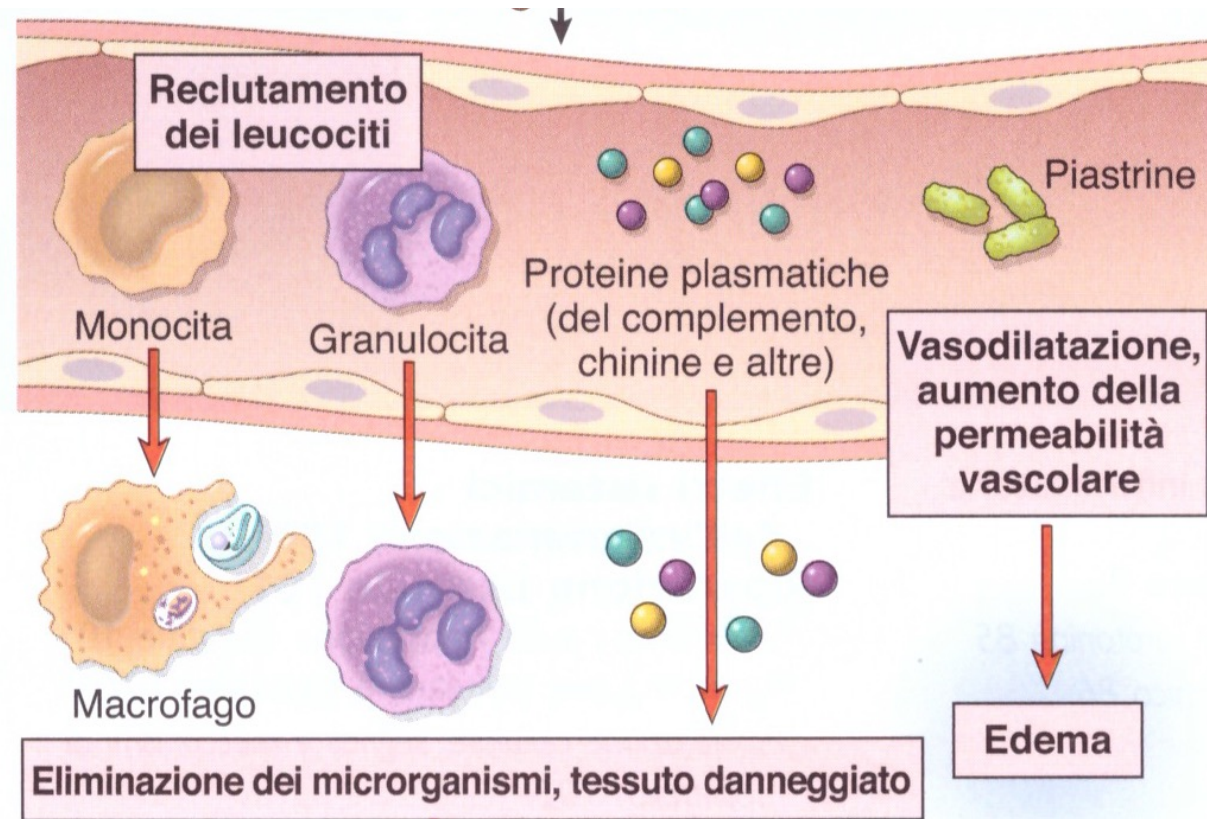
Bradichinina



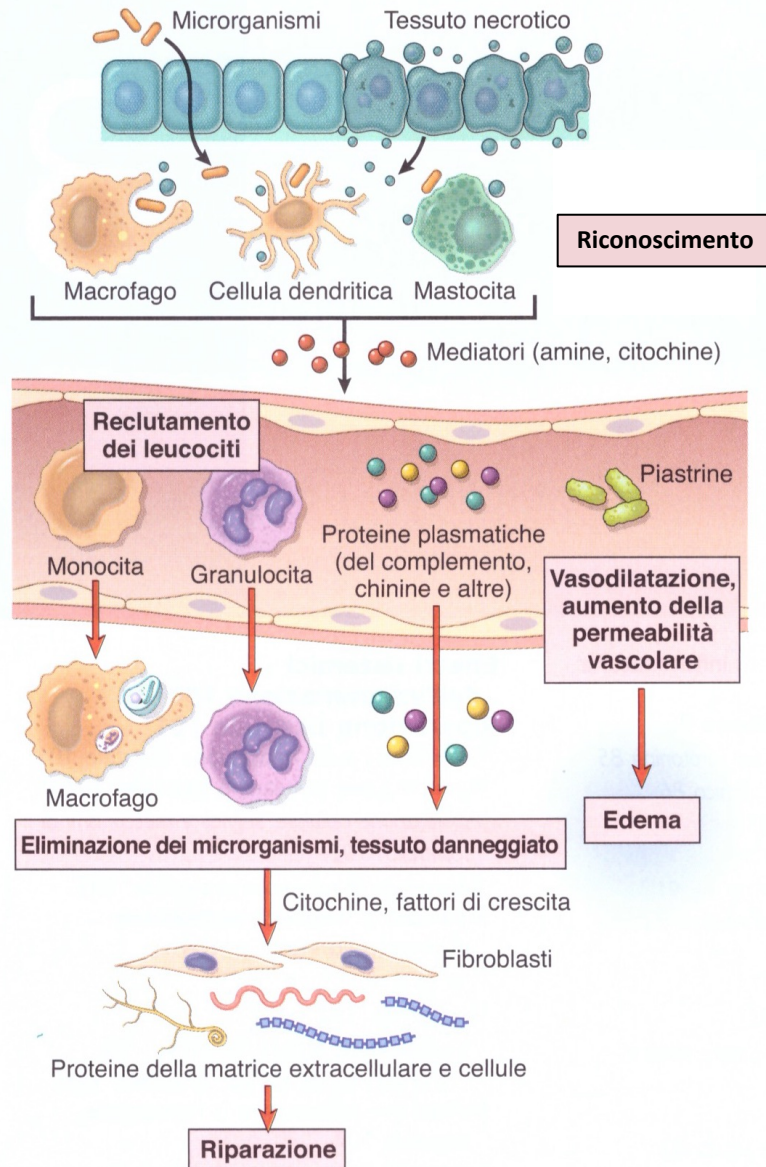
La bradichinina lega recettori denominati BR1 e BR2, espressi sulle cellule endoteliali appartenenti ai «G protein-coupled receptors» (GPCRs) anche definiti seven-(pass)-transmembrane domain *receptors* (recettori che attraversano la membrana 7 volte).

Il legame della bradichinina alle cellule endoteliali ha effetti simili a quelli della istamina che includono la contrazione delle cellule endoteliali ➡ aumento permeabilità  
Produzione di Ossido Nitrico (NO) ➡ vasodilatazione





# Sequenza di eventi in una reazione infiammatoria



**Figura 3.1** Sequenza di eventi in una reazione infiammatoria. Le cellule sentinella presenti nei tessuti (macrofagi, cellule dendritiche, e altre) liberano i mediatori che attivano le reazioni vascolari e cellulari dell'infiammazione in seguito al riconoscimento di microrganismi e cellule danneggiate.

## Sequenza di eventi della reazione infiammatoria:

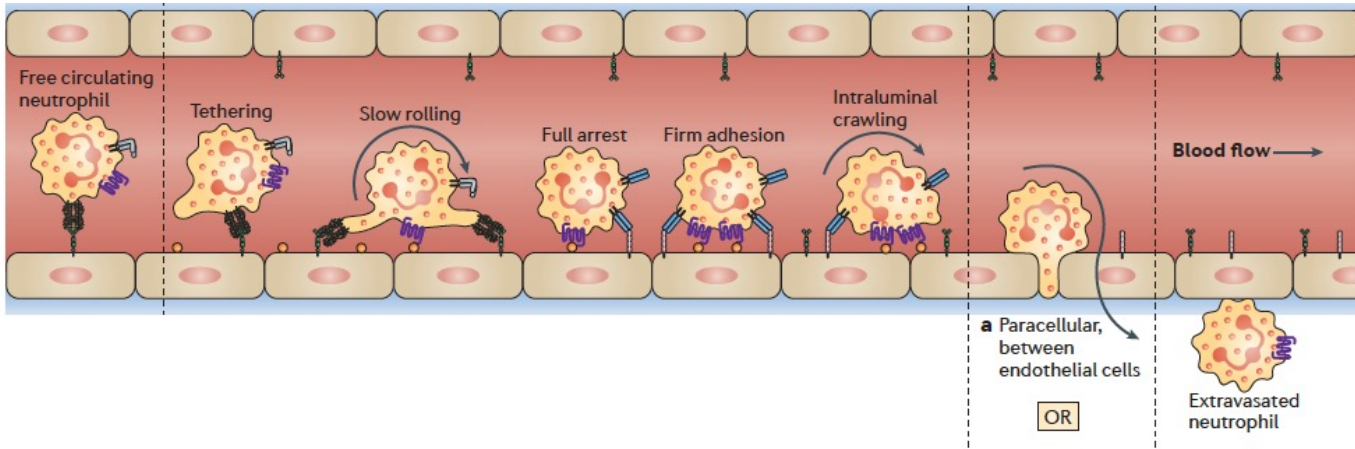
**Riconoscimento:** le cellule residenti nei tessuti quali mastociti, macrofagi e cellule dendritiche in seguito al riconoscimento dell'agente flogogeno (prodotti microbici, detriti cellulari) da parte di recettori producono mediatori (molecole vasoattive e citochine) che favoriscono le fasi successive del processo infiammatorio (reclutamento dei leucociti e fuoriuscita di proteine del plasma)

**Reclutamento** i leucociti e le proteine del plasma lasciano i vasi sanguigni per raggiungere il sito dove è presente lo stimolo flogogeno. La fuoriuscita di cellule e proteine plasmatiche richiede delle modificazioni dei vasi sanguigni

**Rimozione** dello stimolo infiammatorio operata dai fagociti che ingeriscono e degradano i patogeni e i detriti cellulari

**Riparazione** del tessuto leso attraverso la rigenerazione delle cellule e la formazione di tessuto connettivo (cicatrizzazione)

## Fuoriuscita dei leucociti dai vasi nel sito leso



Una funzione principale dell'infiammazione è quella di portare i leucociti nella sede dove è presente lo stimolo flogogeno (microorganismo, tessuto necrotico etc.) in modo che questi (neutrofili, monociti) possano inglobarlo e distruggerlo.

I cambiamenti nel flusso sanguigno e nella permeabilità sono seguiti da un afflusso di leucociti nel tessuto.

I leucociti che sono maggiormente coinvolti nella risposta infiammatoria acuta sono i neutrofili e i monociti.