



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOLOGICHE, GEOLOGICHE E AMBIENTALI
Dottorato di ricerca in Scienze Geologiche, Biologiche e Ambientali
XXX ciclo

ANNA MARIA LONGO

*ANALISI DELL' ESPRESSIONE DELLE CHITINASI E DEI GENI AD
ESSE CORRELATI NEI SOGGETTI ESPOSTI AD AGENTI INQUINANTI
E AL FUMO DI SIGARETTA*

TESI DI DOTTORATO

Tutor: Prof. Salvatore Saccone
Co-tutors: Prof.ssa Lucia Malaguarnera,
Dr. Michelino Di Rosa

Anni 2014-2017

SOMMARIO

INTRODUZIONE	3
LE CHITINASI	3
<i>Struttura della chitina</i>	<i>3</i>
<i>Classificazione delle chitinasi</i>	<i>5</i>
<i>Il ruolo delle chitinasi nelle differenti specie</i>	<i>6</i>
<i>Evoluzione genica delle chitinasi nei Mammiferi</i>	<i>7</i>
<i>Le chitinasi nei mammiferi</i>	<i>8</i>
<i>Chitinasi attive nei mammiferi: localizzazione genica e coinvolgimento nei processi patologici</i>	<i>10</i>
<i>Chi-lectine nei mammiferi: localizzazione genica e coinvolgimento nei processi patologici</i>	<i>14</i>
INQUINAMENTO ATMOSFERICO	17
<i>Particolato</i>	<i>17</i>
<i>Metalli pesanti</i>	<i>20</i>
<i>Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)</i>	<i>22</i>
<i>Fumo di sigaretta: aerosol concentrato</i>	<i>24</i>
PREMESSA E SCOPO DEL LAVORO	27
MATERIALI E METODI	28
RECLUTAMENTO CAMPIONI	28
ANALISI IN VITRO	30
PBMCs	30
CELLULE IN CULTURA	31
SAGGIO DI ATTIVITÀ ENZIMATICA DELLA CHITOTRIOSIDASE	32
ANALISI DELLA DUPLICAZIONE DI 24 BP DEL GENE DELLA CHIT1	33
ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA MEDIANTE REAL-TIME PCR	34
ANALISI BIOINFORMATICA	35
ANALISI STATISTICA	36
RISULTATI	37
DISTRIBUZIONE DEL POLIMORFISMO DELLA CHITOTRIOSIDASE NEI SOGGETTI RECLUTATI	37
ANALISI DI CORRELAZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA DELLA CHITOTRIOSIDASE VS L'EMOCROMO CON FORMULA LEUCOCITARIA	39
ANALISI DI CORRELAZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA DELLA CHITOTRIOSIDASE VS I LIVELLI DI IDROSSIPIRENE E BENZENE	40
FEV1: FUMATORI WILD TIPE VS FUMATORI ETEROZIGOTI	41
ANALISI DEI LIVELLI ENZIMATICI DELLA CHITOTRIOSIDASE NEI SOGGETTI ESPOSTI VS I SOGGETTI CONTROLLO NON ESPOSTI	42
ANALISI DEI LIVELLI ENZIMATICI DELLA CHITOTRIOSIDASE NEI SOGGETTI ESPOSTI (AA, Aa) E NON ESPOSTI FUMATORI (AA, Aa)	43
ANALISI DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLE CHITINASI E DELLE CHITINO-LECTINE NEI PBMCs DEI SOGGETTI ESPOSTI RISPETTO AI NON ESPOSTI MEDIANTE REAL-TIME PCR	45
ANALISI DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLE CHITINASI E CHI-LECTINE NEI PBMCs TRATTATI CON 1,2,4-BENZENETRIOL MEDIANTE REAL-TIME PCR	46
ANALISI DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLE CITOCHINE INFIAMMATORIE NEI PBMCs TRATTATI CON 1,2,4-BENZENETRIOL MEDIANTE REAL-TIME PCR	47
ANALISI DI CORRELAZIONE CCL2 VS CHIT1	48
ANALISI DI CORRELAZIONE FRA I LIVELLI DI ESPRESSIONE DELL'MRNA DELLE PRINCIPALI CHEMOCHINE VS I LIVELLI DI CHIT1	49
ANALISI DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLE CHEMOCHINE NEI PBMCs TRATTATI CON 1,2,4-BENZENETRIOL MEDIANTE REAL-TIME PCR	51
LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLE CHITINASI NEI MACROFAGI ALVEOLARI DI SOGGETTI FUMATORI	52
LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLE CHEMOCHINE NEI MACROFAGI ALVEOLARI DI SOGGETTI FUMATORI	53
DISCUSSIONE	54
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	60

INTRODUZIONE

Le Chitinasi

Struttura della chitina

La chitina, scoperta dal chimico e farmacista francese Henri Braconnot nel 1811, (1), è un biopolimero lineare a lunga catena costituito da unità di N-acetilglucosamina (GlcNAc) legate tra loro da legame β -1,4 in modo del tutto simile alle unità di glucosio che costituiscono la cellulosa. Le unità di N-acetilglucosamina possono disporsi in filamenti anti-paralleli (forma α), in filamenti paralleli (forma β) o in una combinazione di entrambe le forme (forma γ).

Essa è uno dei principali componenti dell'esoscheletro di molti esseri viventi, quali insetti e artropodi; costituisce i rivestimenti cuticolari di molti invertebrati nonché la parete cellulare di funghi e batteri (2)

La de-acetilazione della chitina a carico dei gruppi amminici dell' N-acetilglucosamina, porta alla formazione del chitosano, una sostanza scoperta casualmente nel 1859 da C. Rouget, uno scienziato francese che stava cercando di produrre un sapone naturale (3).

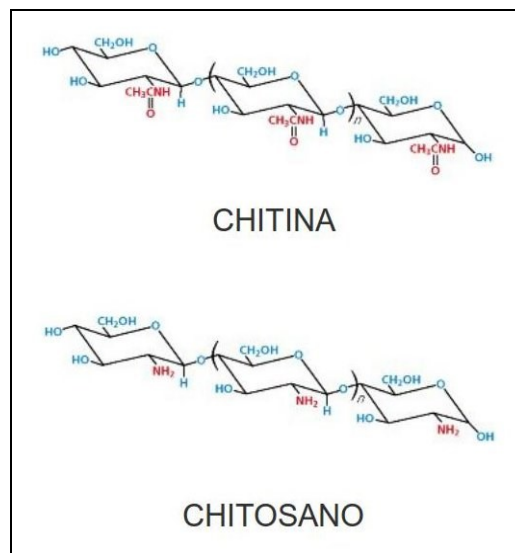


Immagine 1: Chitina e Chitosano

Entrambi i biopolimeri possiedono caratteristiche interessanti come la bio-degradabilità, la bio-compatibilità, la bio-adesività e l'atossicità.

Diversi studi hanno dimostrato che il chitosano, e i suoi derivati, possiedono diverse attività biologiche, tra cui azione anti-infiammatoria, immunostimolante, anti-tumorale, anti-obesità, anti-ipertensiva, antimicrobica e anti-ossidante (4).

Il chitosano, grazie a queste e altre peculiarità, ha trovato applicazioni in diversi campi come ad esempio:

- nella purificazione delle acque reflue, grazie alla capacità di assorbire i composti di tipo oleoso come il petrolio;
- negli imballaggi di prodotti di tipo alimentare o cosmetico;
- nella produzione di bende e fili di sutura, grazie alle sue proprietà anti-allergiche;
- a livello sanitario come accelerante dei processi di guarigione delle ferite, per migliorare l'efficienza dei farmaci veicolandoli e riducendone le quantità di somministrazione;
- nella formulazione di vari prodotti farmaceutici a uso nasale, oftalmico e orale che prevedono il rilascio graduale del farmaco.

Classificazione delle chitinasi

La famiglia delle chitinasi comprende un gruppo di enzimi capaci di degradare la chitina e, in base al loro meccanismo d'azione, possono essere divise in due gruppi principali: le endochitinasi e le esochitinasi. Le endochitinasi producono multimeri di unità di GlcNAc a basso peso molecolare invece le esochitinasi possono essere ulteriormente suddivise in quelle che catalizzano il rilascio di diacetilchitobiosio dai polimeri di chitina, e quelle che degradano ulteriormente i prodotti delle endochitinasi per produrre monomeri di chitina.

In termini di omologia di sequenza e struttura terziaria, le chitinasi appartengono a sette classi divise tra la famiglia 18 e 19 delle Glicosil Idrolasi. Le classi I, II, IV, VI e VII sono presenti nelle piante e appartengono alla famiglia 19; le classi III e V includono quelle delle piante, batteri, funghi e mammiferi e fanno parte della famiglia 18 (5, 6).

Il ruolo delle chitinasi nelle differenti specie

Negli insetti, le chitinasi, sono espresse durante le fasi dello sviluppo per aiutare il rimodellamento dell'esoscheletro in modo da mantenere e supportare la dimensione e la forma del corpo (7).

Le piante, invece, sintetizzano tali enzimi per differenti finalità, che riguardano i processi di germinazione dei semi e la risposta allo stress, oltre che la difesa contro agenti patogeni contenenti chitina, come i funghi e insetti (tanto da essere utilizzati in alternativa ai pesticidi chimici). Le piante più evolute sintetizzano diversi tipi di chitinasi, molte delle quali presentano un'attività addizionale lisozima-simile e sono capaci di degradare il legame β -1,4 tra i residui di N-acetilglucosamina e l'acido N-acetilmuramico del peptidoglicano, suggerendo un ruolo nella protezione dai batteri Gram-positivi (6, 7).

Nei funghi giocano un ruolo importante nella nutrizione, in particolare per digerire la chitina contenuta negli organismi che utilizzano come fonte di nutrimento, nella germinazione e differenziazione delle spore, nella ramificazione delle ife, e nella morfogenesi (8). In *Saccharomyces cerevisiae*, infatti, è stato dimostrato che la divisione del lievito sia dipendente dalla produzione di un disco di chitina tra la cellula madre e la cellula figlia, prodotto dall'enzima chitina sintasi II, seguita dall'attività di una endochitinasi per la separazione cellulare (9).

Le chitinasi batteriche, analogamente a quelle funginee, svolgono un ruolo fondamentale nella degradazione della chitina utilizzata come fonte di energia e nutrimento, ma anche nella patogenesi, come fattori di virulenza, durante l'infezione di ospiti invertebrati contenenti chitina, come costituente del loro esoscheletro (artropodi) o della membrana intestinale peritrofica (anellidi e alcuni artropodi) (7, 10).

Evoluzione genica delle chitinasi nei Mammiferi

La funzione fisiologica di queste molecole, così come le relazioni evolutive sono ancora oggi enigmatiche.

Analisi filogenetiche molecolari suggeriscono che la famiglia delle chitinasi ha subito una vasta espansione, iniziata con un evento precoce di duplicazione genica alla base dell'albero evolutivo dei vertebrati, che ha generato gli antenati delle chitinasi attive: la Chitotriosidase (*CHIT1*) e la Acid Mammalian Chitinase (*CHIA*).

Ulteriori eventi di duplicazione, seguiti da mutazioni che hanno determinato la perdita di attività delle chitinasi, hanno permesso l'evoluzione delle chi-lectine o chitinasi like protein (CLPs), una serie omologa di proteine secrete che sembrano essere enzimaticamente inattive in quanto mancano completamente o parzialmente del dominio catalitico.

Gli esseri umani codificano quattro chi-lectine, tre sono omologhe e sono chiamate Chitinase 3-like-1 (*CHI3L1*), Chitinase 3-like-2 (*CHI3L2*), Oviductal glycoprotein 1 (*OVGP1*), e la quarta è la Chitinase Domain-containing 1 (*CHID1* o *SI-CLP*) che è solo lontanamente correlata alle altre.

Nonostante la posizione cromosomica condivisa e l'alta omologia, i singoli geni si sono evoluti in modo indipendente. Infatti, l'analisi filogenetica delle chitinasi dei mammiferi e delle chi-lectine ha suggerito che “*CHI3L1* e *CHI3L2* si sono originate come risultato della duplicazione genica del gene ancestrale *CHIT1*, mentre *OVGP1* e *CHID1* hanno preso origine dal gene *CHIA*” (11, 12).

Le chitinasi nei mammiferi

Le chitinasi dei mammiferi appartengono alla famiglia 18 delle glicosil-idrolasi (GH) e sono caratterizzate da un dominio glico-18 che si è conservato nell'evoluzione ed è presente in tutti i membri di questa famiglia.

Le chitinasi della famiglia 18 mostrano, similitudini strutturali inclusi gli otto filamenti comuni α/β 8 (TIM barrel). Questo motivo proteico caratteristico del dominio catalitico, identificato per la prima volta nell'enzima glicosidico triosofosfato isomerasi, consiste in otto filamenti β antiparalleli (β 1-8) disposti in righe inclinate di 30° rispetto all'asse centrale e circondato da 8 α -eliche. Al C-terminale delle chitinasi della famiglia 18 è presente un dominio aggiuntivo di inserzione α/β che consiste di 5 foglietti β anti-paralleli intercalati con corti filamenti α/β (13, 14, 15).

Il sito attivo delle chitinasi appartenenti alla famiglia 18 contiene la sequenza DxxDxDxE in cui l'ultimo residuo di acido aspartico e quello di acido glutammico centrale sembrano essere essenziali per la catalisi (16).

Nell'uomo questi enzimi, vengono distinti in relazione alla capacità di idrolizzare o meno la chitina. La CHIT1 e la CHIA sono le uniche due proteine che presentano una dimostrata attività chitinolitica, infatti catalizzano l'idrolisi del legame β (1-4) glicosidico (17); al contrario le chilectine, CHI3L1, CHI3L2, CHID1 e OVGP1, nonostante mantengano la struttura tridimensionale e il dominio di legame per la chitina (CBM, carbohydrate binding domain), sono incapaci di scinderla a causa di una mutazione nella sequenza DxxDxDxE del sito attivo dell'enzima, determinata dalla sostituzione dell'acido glutammico, essenziale per donare un protone durante l'idrolisi enzimatica, con una leucina, isoleucina o glutammina (15, 18).

L'assenza della chitina e della sua sintesi nei mammiferi suggerisce che questi enzimi possiedono un ruolo alternativo: si suppone, infatti, che abbiano una funzione difensiva contro infezioni fungine e batteriche e/o che siano associati ad altre molecole strutturalmente simili alla chitina, come l'eparan solfato e l'acido ialuronico (19).

I mammiferi, inoltre, sono potenziali ospiti per protozoi, funghi, artropodi e nematodi contenenti chitina, essa infatti viene riconosciuta dal sistema immunitario innato e ha effetti immunomodulatori sull'immunità adattativa.

La chitina può essere introdotta all'interno dell'organismo attraverso l'inalazione o l'ingestione e può determinare l'attivazione di diverse cellule appartenenti all'immunità innata (macrofagi, eosinofili) e all'immunità adattativa (linfociti Th2 che esprimono IL-4/ IL-13) e, mediante la produzione di citochine, determina il reclutamento dei leucociti e l'attivazione dei macrofagi (20).

Chitinasi attive nei mammiferi: localizzazione genica e coinvolgimento nei processi patologici

Le chitinasi dei mammiferi sono molecole altamente espresse dalle cellule dell'immunità innata durante i processi infiammatori cronici.

La Chitotriosidase è stata la prima delle chitinasi ad essere stata scoperta e caratterizzata nei pazienti affetti da malattia di Gaucher, una patologia lisosomiale a trasmissione autosomica recessiva. Essa è codificata dal gene *CHIT-1*, composto da 12 esoni che si estendono per circa 20 kb nel DNA genomico a livello del cromosoma 1 umano in posizione 1q31-q32 (21).



Immagine 2: Chitotriosidase (CHIT1). Realizzata mediante Chimera software. File depositato IGUV

Essa è maggiormente espressa negli stadi tardivi di differenziazione cellulare dei monociti-macrofagi e, per tale motivo, è considerata un marker di differenziazione macrofagica (22, 23).

Oltre ad essere un marcatore biochimico di macrofagi tissutali cronicamente attivati, la CHIT1 è espressa in altre cellule coinvolte nella risposta immunitaria come le cellule dendritiche derivate da monociti e i granulociti neutrofili (24).

Esistono due isoforme che possono essere distinte in termini di massa molecolare e punto isoelettrico: la forma predominante è l'isoforma da 50 kDa, con pI di circa 6,5-7,2, maggiormente

secreta dalle cellule ed in grado di legare le particelle di chitina prima che avvenga l'idrolisi a livello del dominio catalitico.

L'isoforma da 50 kDa viene in parte trasformata nella forma da 39 kDa, con un pI pari a 8.1 che, in seguito a splicing alternativo, risulta essere priva dell'estremità C-terminale presente nell'isoforma da 50 kDa, fondamentale nel mediare il legame con la chitina. La subunità da 39 kDa, inoltre, non viene secreta dalle cellule ma si accumula all'interno dei lisosomi; questo spiega perché nel flusso sanguigno si ritrova prevalentemente l'isoforma da 50 kDa secreta, mentre nei tessuti la forma da 39 kDa (25).

Questa proteina presenta diversi polimorfismi, il più studiato è determinato da una duplicazione di 24 pb nell'esone 10 che genera un mRNA anomalo codificante una proteina enzimaticamente inattiva.

In particolare la duplicazione di 24 pb attiva un sito di splicing criptico al 3' dell'esone 10, ciò genera un mRNA caratterizzato da una delezione in-frame di 87 nucleotidi, codificante una proteina inattiva sprovvista al suo interno di un tratto di 29 amminoacidi (manca dei residui amminoacidici che vanno da Val-344 a Gln-372) (21).

Il deficit ereditario riguardante l'attività della CHIT1 si riscontra in numerosi gruppi etnici ed il rapporto tra gli omozigoti mutanti, i portatori eterozigoti per la mutazione del gene e gli individui wild type varia tra le diverse popolazioni.

Diversi studi dimostrano che nei paesi Africani di Benin e Burkina Faso, endemici per *Plasmodium falciparum* ed elmintosi gastrointestinali, c'è una totale assenza di omozigoti mutanti e quasi nessun portatore eterozigote, suggerendo quindi che la persistenza di malattie parassitarie può aver favorito il mantenimento del genotipo *CHIT-1* wild-type che conferisce protezione innata contro queste infezioni. Al contrario, invece, nelle popolazioni che vivono nel bacino del Mediterraneo e nei Paesi Bassi (dove la malaria ed altre malattie parassitarie sono state eradiccate) i livelli di attività plasmatica della CHIT1 sembrano essere inferiori rispetto alle popolazioni Sub Sahariane con una più alta percentuale sia di portatori eterozigoti (con una ridotta funzionalità enzimatica) che di

omozigoti mutanti. Le frequenze alleliche per il gene *CHIT1*, emerse dalla genotipizzazione di soggetti Siciliani e Sardi, rappresentano il 58% per gli alleli omozigoti wild type, il 39% per gli alleli eterozigoti e solo il 5% di omozigoti mutati (26).

La CHIT1 è un enzima essenziale nella regolazione della suscettibilità alle infezioni causate da organismi che raggiungono l'ospite tramite ingestione o inalazione e che contengono chitina come componente strutturale. In una popolazione sana la sua attività è bassa ed ha origine nelle cellule polimorfonucleate circolanti al contrario, invece, durante lo sviluppo di disturbi infiammatori acuti/cronici l'attività enzimatica di CHIT1 aumenta significativamente (21, 27).

Questo enzima è considerato oggi un biomarcatore nei pazienti affetti da malattia di Gaucher in cui, elevati livelli sierici, possono riflettere un esagerato stato di attivazione macrofagica (28). Essa è, inoltre, utile per monitorare l'efficacia di un trattamento terapeutico considerato che la sua attività enzimatica è in media 600 volte maggiore nel plasma dei pazienti rispetto ai sani. (25).

Diversi studi dimostrano il ruolo fondamentale svolto dal sistema immunitario e dalla CHIT1 nello sviluppo e nella progressione delle malattie infiammatorie degenerative (Alzheimer), delle demenze cerebrovascolari (29) o nell'Aterosclerosi (30). Elevati livelli dell'enzima, infatti, sono stati rilevati nel siero dei soggetti affetti da aterosclerosi in cui l'attività enzimatica, significativamente aumentata, è stata correlata con la gravità della lesione aterosclerotica (31, 32).

Molte evidenze sperimentali identificano la CHIT1 come un regolatore delle funzioni infiammatorie, sottolineando l'attivo ruolo svolto negli stati di malattia caratterizzati da una risposta infiammatoria esagerata, come ad esempio nella steatosi epatica non alcolica (33).

La acid mammalian chitinase (CHIA) è un'altra chitinasi enzimaticamente attiva presente nei mammiferi. Essa è definita "acida" in quanto la sua attività è maggiore ad un pH di circa 2,0, mentre la CHIT1 è più attiva ad un pH di 4,0-5,0.

Il gene, composto da 12 esoni, è localizzato sul cromosoma 1 in posizione 1q13.2 e si estende per circa 29 kb (34).

La CHIA, come la CHIT1, viene sintetizzata come una proteina di 50 kDa contenente un dominio catalitico N-terminale di 39 kDa e un dominio C-terminale che lega la chitina.

Sequenziando la regione del promotore ed i 12 esoni, Bierbaum e colleghi, hanno identificato sei SNPs in tale regione e tre nella regione codificante ipotizzando che queste varianti genetiche possano contribuire ad aumentare la suscettibilità all'asma pediatrica (35).

Attualmente la funzione della CHIA non è del tutto chiara, però, diversi studi dimostrano che nei roditori e nell'uomo, questo enzima è abbondante nel tratto gastrointestinale e nei polmoni, prodotto ad opera dei macrofagi alveolari, in cui svolge un ruolo importante nella difesa e/o nella digestione di organismi che contengono chitina (17).

I livelli di espressione della *CHIA* aumentano in numerose condizioni patologiche come l'asma, l'infiammazione allergica, l'allergia oculare, la sindrome dell'occhio secco e il cancro gastrico (24, 36, 37).

Essa è inoltre una delle più importanti molecole coinvolte nell'infiammazione Th2- mediata infatti è stato ipotizzato che, nel tratto respiratorio, in risposta a citochine Th2 come IL-13, le cellule epiteliali e macrofagi delle vie aeree, producendo CHIA, inducono il rilascio massivo di diverse chemochine con conseguente reclutamento di cellule T, eosinofili e macrofagi. Questa ipotesi era basata sull'osservazione che neutralizzando la CHIA con inibitori del siero anti-CHIA si notava una riduzione dell'infiltrazione infiammatoria in modelli sperimentali di topo affetti da asma.

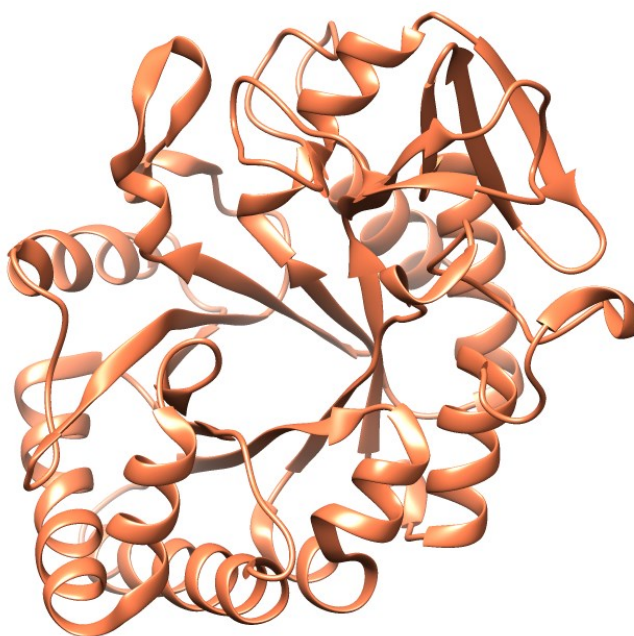
La CHIA può essere, dunque, un importante mediatore nelle risposte cellulari indotte da IL-13 durante i disordini immunitari di tipo Th2, come l'asma e l'allergia (38, 39).

Chi-lectine nei mammiferi: localizzazione genica e coinvolgimento nei processi patologici

Le chi-lectine sono degli enzimi che hanno mantenuto il sito di legame al carboidrato ma, in seguito a mutazioni, hanno perso la funzione catalitica.

La chitinase 3-like-1 (CHI3L1), nello specifico, manca di attività catalitica a causa della sostituzione del residuo essenziale di acido glutammico con un residuo di leucina all'interno del motivo di sequenza conservato DxxDxDxE.

Il gene per la *CHI3L1* è localizzato sul cromosoma 1 in posizione 1q31-q32, consiste di 10 esoni e si estende per circa 8Kb nel DNA genomico.



***Immagine 3:** Chitinase 3 like 1(CHI3L1). Realizzata mediante Chimera software. File depositato 1HJV*

Questa molecola, che consta di una singola catena polipeptidica di 383 aminoacidi, viene anche chiamata YLK-40, in relazione a tre amminoacidi N-terminali, tirosina (Y), lisina (K) e leucina (L), e al suo peso molecolare di 40 kDa (40).

La CHI3L1 è prodotta da un'ampia varietà di cellule inclusi neutrofili, cellule dendritiche, condrociti, fibroblasti, cellule muscolari lisce dei vasi, cellule endoteliali, cellule stellate epatiche e

cellule epiteliali delle vie aeree, duttali e del colon. Non è espressa nei monociti ma, al contrario, è fortemente indotta negli stadi tardivi del differenziamento dei macrofagi umani.

Essa è inoltre espressa e secreta da diversi tipi di tumori solidi, in particolare nel glioblastoma, nel cancro del colon, nel cancro al seno e nel melanoma maligno. Nonostante l'esatta funzione della CHI3L1 sia ancora in gran parte sconosciuta, diversi studi dimostrano che è coinvolta nella proliferazione cellulare, nel rimodellamento tissutale, nell'adesione e migrazione cellulare e nell'esacerbazione dei processi infiammatori (41, 42).

Essa, inoltre, inibisce i processi apoptotici delle cellule tumorali, promuove l'angiogenesi e favorisce la diffusione metastatica stimolando la produzione di fattori pro-infiammatori e pro-invasivi (MMP9, CCL2 e CXCL2).

In vivo, i livelli di CHI3L1 sono aumentati nel siero e nel fluido sinoviale di pazienti con artrite reumatoide, nel fegato di pazienti con cirrosi alcolica, nel siero di pazienti con tumore recidivante della mammella e cancro del colon, nelle malattie neurologiche come l'Alzheimer e la sclerosi multipla (43, 44, 45).

L'aumento dei livelli circolanti di CHI3L1 sono stati riportati anche nel siero di pazienti con diverse condizioni infiammatorie comprese il morbo di Crohn e la colite ulcerativa, al contrario invece è raramente rilevabile nel siero dei soggetti sani, per tale motivo è stata proposta come potenziale marker nelle malattie infiammatorie intestinali citate (46, 47).

La CHI3L1 è strettamente associata alla chitinase 3-like-2 (CHI3L2) con cui ha una significativa omologia di sequenza (circa il 51%) confermata da una somiglianza strutturale in dimensioni, nucleotidi e sequenza amminoacidica (stessi residui amminoacidici NH₂-terminali).

Il gene per la *CHI3L2* si trovava sul cromosoma 1 umano 1 nel locus 1p13.3.

La CHI3L2 (o YLK-39) è stata identificata come una proteina secretoria non glicosilata in una coltura primaria di condrociti articolari umani ed è oggi nota come potenziale marcatore per l'attivazione dei condrociti e per la progressione dell'osteoartrite, una malattia degenerativa che determina la degradazione della cartilagine articolare e dell'osso sub condrale (48).

La più recente chitino-lectina ad essere stata identificata è la chitinase domain-containing 1 (CHID1 o SI-CPL), scoperta in quanto ligando per il recettore multifunzionale stabilin-1; il gene umano *CHID1* è localizzato nel cromosoma 11 in posizione 11p15.5, consta di 19 esoni e codifica una proteina con un peso molecolare di 39 kDa.

Stabilin-1 è un recettore transmembrana di tipo 1 espresso dai macrofagi tissutali specializzati della placenta, pelle, intestino, pancreas, muscolo cardiaco e scheletrico, cellule endoteliali sinusoidali del fegato, milza, midollo osseo e linfonodi.

Finora la secrezione di CHID1 è stata invece rilevata nei monociti, nei linfociti T e B e nelle cellule di origine epiteliale.

In vitro, sia l'espressione di stabilin 1 che di CHID1 può essere indotta nei macrofagi dopo stimolazione con IL-4 e desametasone; inoltre la CHID1 è l'unica chitino lectina ad essere up-regolata dai glucocorticoidi.

In particolare è stato dimostrato che i macrofagi trattati con IL-4 secernono CHID1, mentre la co-stimolazione con desametasone ne blocca la secrezione determinandone un accumulo intracellulare.

In vivo, CHID1 si ritrova nella frazione cellulare di campioni ottenuti con lavaggio broncoalveolare e nei leucociti ottenuti dal sangue periferico di pazienti con disturbi infiammatori cronici del tratto respiratorio. Ad oggi comunque gli studi sulla CHID1 sono ancora scarsi e per rivelare l'associazione di questa molecola con patologie umane sono sicuramente necessarie ulteriori indagini (49).

INQUINAMENTO ATMOSFERICO

Particolato

L'inquinamento atmosferico è determinato dalla presenza di sostanze fisiche, chimiche e biologiche capaci di modificare ed alterare la struttura naturale dell'atmosfera.

Gli inquinanti vengono solitamente distinti in base alla loro origine in due gruppi principali, quelli di origine antropica, cioè prodotti dall'uomo, e quelli naturali.

Ad eccezione delle pochissime cause di inquinamento naturale, ad esempio gli incendi boschivi, la decomposizione di composti organici (allergeni), le spore, lo spray marino, le emissioni di anidride carbonica e zolfo causate dalle eruzioni vulcaniche, l'erosione e disgregazione delle rocce, sono le attività umane ad incidere principalmente sull'ambiente. I processi industriali, i gas di scarico delle autovetture, gli inceneritori, le centrali termoelettriche, le raffinerie petrolifere, le industrie chimiche e plastiche, l'utilizzo di fertilizzanti chimici, la produzione di scorie nucleari, oltre al traffico stradale e al riscaldamento, sono fonti di inquinamento dell'ambiente ormai diffuse a livello mondiale soprattutto nelle aree metropolitane.

Negli ultimi vent'anni il particolato (particulate matter o PM) è diventato l'inquinante oggetto di maggior attenzione, in quanto rappresenta un importante problema di sanità pubblica in tutto il mondo.

Con il termine particolato (particulate matter, PM) o polveri totali sospese (PTS) si fa riferimento all'insieme di particelle disperse di natura organica (es. le particelle carboniose derivate dai processi di combustione incompleta, IPA) o inorganica (metalli, asbesto, silice, vetro) solide o liquide, con diametro compreso tra qualche nanometro (nm) e decine/centinaia di micrometri (μm) che, a causa delle loro piccole dimensioni, restano sospese in atmosfera per tempi più o meno lunghi.

Nel particolato possono essere presenti sostanze di elevata pericolosità intrinseca come i solfati (biossido di zolfo, SO_2), i nitrati (ossidi di azoto, NO_x), l'ozono, ammonio, materiali organici, specie cristalline, sali marini, alcuni metalli (quali l'arsenico, il cadmio, il mercurio, il nichel ed il piombo), gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) il cui rappresentante principale è il benzo(a) pirene.

Le concentrazioni di particolato atmosferico variano da poche decine di $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in zone con bassa concentrazione demografica (zone collinari, montagna) fino a centinaia di $\mu\text{g}/\text{m}^3$ nelle grandi città e nelle aree industriali.

Le particelle disperse vengono distinte in base alla dimensione in PTS (Particelle Totali Sospese, con diametro fino a $100\ \mu\text{m}$), PM₁₀ (diametro uguale o inferiore a $10\ \mu\text{m}$) e PM_{2,5} (diametro uguale o inferiore a $2,5\ \mu\text{m}$). Inoltre, in funzione del diametro aerodinamico (dae) vengono suddivise in diverse frazioni, coarse (grossolano) con dae compreso tra $2,5$ e $10\ \mu\text{m}$, fine (sottile) con dae inferiore a $2,5\ \mu\text{m}$ e ultrafine con dae inferiore a $0,1\ \mu\text{m}$.

Chiaramente l'azione nociva delle polveri varia con la dimensione la quale determina la capacità della particella di penetrare e depositarsi nell'apparato respiratorio. In tal senso, si distingue una frazione inalabile, che comprende tutte le particelle che riescono a entrare dalle narici e dalla bocca; la frazione toracica, costituita dalle particelle che riescono a passare attraverso la laringe e ad entrare nei polmoni durante l'inalazione (raggiungendo la regione tracheo-bronchiale) e la frazione respirabile rappresentata da particelle sufficientemente piccole da riuscire a raggiungere la regione alveolare.

Le particelle con diametro inferiore a $10\ \mu\text{m}$ (PM₁₀) e ancor di più quelle con diametro inferiore a $2,5\ \mu\text{m}$ (PM_{2,5}) hanno un impatto sanitario più significativo poiché riescono a superare le barriere protettive del primo tratto respiratorio e raggiungere le zone più profonde (alveoli) depositandovi; dunque più le particelle penetrano in profondità maggiore sarà l'effetto tossico che possono produrre. Inoltre, le particelle ultrafini possono addirittura superare la barriera alveolare, entrando così nel circolo sanguigno (50, 51).

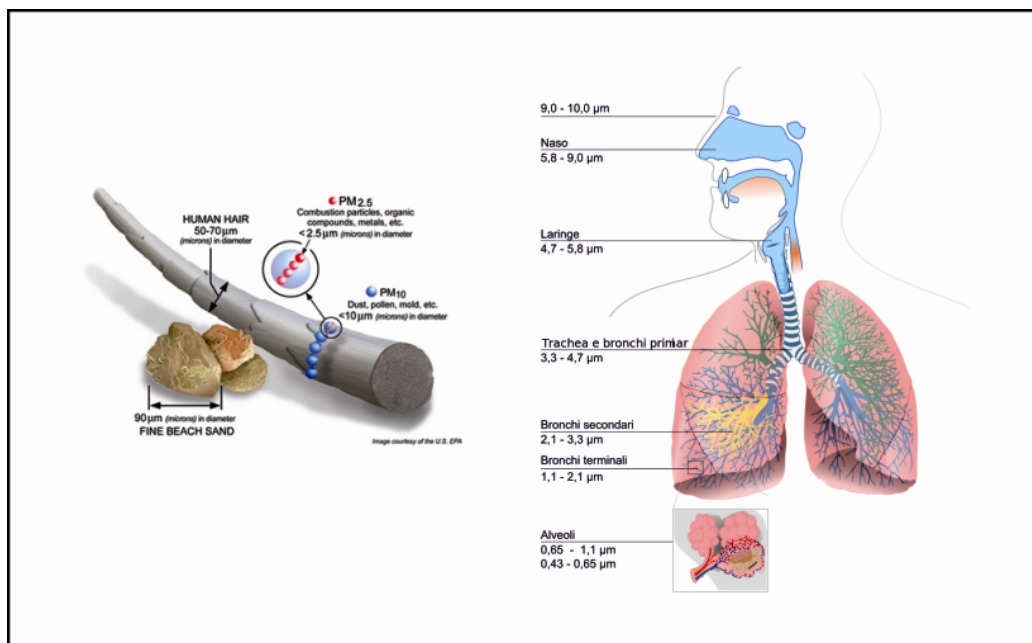


Immagine 4: *Disposizione del particolato all'interno delle vie respiratorie*

Metalli pesanti

I metalli pesanti sono presenti in atmosfera sotto forma di particolato aerotrasportato, normalmente presenti nelle rocce, nel suolo, nelle piante e negli animali e, nei paesi industrializzati ed in via di sviluppo, sono il risultato di diversi tipi di attività industriali (centrali termoelettriche, traffico motorizzato, accumulo di rifiuti urbani e il loro incenerimento, utilizzo di fertilizzanti).

Sono indicati come elementi che hanno una densità superiore a $5,0 \text{ g/cm}^3$, esistono come ioni dotati di carica positiva ed hanno una elevata tendenza a formare complessi.

Sono normalmente considerati metalli pesanti i seguenti elementi: argento (Ag), bario (Ba), cadmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), manganese (Mn), mercurio (Hg), molibdeno (Mo), nichel (Ni), piombo (Pb), rame (Cu), stagno (Sn), titanio (Ti), tallio (Tl), vanadio (V), zinco (Zn) ed alcuni metalloidi con proprietà simili a quelle dei metalli pesanti, quali arsenico (As), bismuto (Bi), selenio (Se) e antimonio (Sb).

Quando però si parla di inquinamento da metalli pesanti, normalmente ci si riferisce a tre di questi elementi ossia il mercurio, il cadmio e il piombo.

Alcuni metalli pesanti, come Fe, Cu, Zn, Cr, Mn, Ni e Co, hanno un importante ruolo fisiologico in piccole concentrazioni e sono definiti essenziali per animali e piante, poiché rientrano nella struttura di alcune molecole fondamentali, come per esempio gli enzimi, ma, ad elevate concentrazioni, possono dar luogo a fenomeni di tossicità per gli organismi viventi.

Elementi come Hg, Cd e Pb, non presentando alcuna funzione biologica finora conosciuta, vengono definiti non essenziali e possono essere tollerati dall'organismo entro determinate concentrazioni.

Diversi studi dimostrano che elevate esposizioni al Pb possono determinare effetti avversi di tipo neurologico, ematologico, gastrointestinale ed immunologico mentre il Cd è principalmente associato a malattie renali, ossee e cardiovascolari (52).

Questi elementi sono pericolosi per la loro tendenza a bioaccumularsi e a dare luogo a fenomeni di biomagnificazione, ossia di aumentare la propria concentrazione negli organismi, progressivamente nel passaggio attraverso i diversi anelli della catena alimentare.

La loro tossicità è elevata per tutte le specie viventi perché possono causare perdita dell'attività biologica, ad esempio depositandosi nelle cellule mediante interazioni con le biomolecole (proteine, enzimi ed acidi nucleici) e modificandone la conformazione attiva, bloccando siti funzionali oppure spostando ioni metallici essenziali, ostacolando in tal modo lo svolgimento di determinate funzioni vitali della cellula, non essendo gli organismi spesso in grado di eliminarli dal loro interno.

Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

Un'altra classe di inquinanti ambientali sono gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), un gruppo eterogeneo e ricco di idrocarburi ad elevato peso molecolare la cui caratteristica strutturale è la presenza di due o più anelli benzenici, saldati in modo da avere in comune 2 o più atomi di carbonio uniti tra loro.

Dal punto di vista strutturale, sono molecole molto stabili che condensano facilmente e si trovano spesso adsorbite al particolato.

La pericolosità di alcuni IPA deriva principalmente dalla loro semivolatilità che li rende particolarmente mobili attraverso le varie matrici ambientali e generano allerta perché alcuni di essi sono stati identificati come cancerogeni, mutageni e teratogeni.

Nell'aria delle zone urbane normalmente si riscontrano concentrazioni di IPA dell'ordine dei nanogrammi, concentrazioni che possono aumentare di un ordine di grandezza in ambienti particolarmente inquinati.

A livello industriale sono generati dalla combustione incompleta di materiale organico come il carbone, l'olio da riscaldamento, i rifiuti, il carburante, il legno ed il tabacco.

Anche se esistono più di cento diversi IPA, quelli più imputati nel causare dei danni alla salute di uomini e animali sono: l'acenaftene, l'acenaftilene, l'antracene, il benzo(a)antracene, il crisene, il pirene, il benzo(a)pirene, l'indeno(1,2,3-c,d)pirene, il fenantrene, il fluorantene, il benzo(b)fluoroantene, il benzo(k)fluoroantene, il benzo(g,h,i)perilene e il fluorene.

L'esposizione agli IPA può avvenire non solo per inalazione ma anche per ingestione di cibo (affumicati/grigliati, vegetali a foglia larga, frutta e cereali), bevande contaminate o per via cutanea.

Queste molecole hanno una tossicità multi organo, infatti essendo liposolubili riescono ad attraversare le membrane cellulari, penetrare e depositarsi nei tessuti (organi target reni, fegato e tessuto adiposo). Il potenziale effetto cancerogeno è determinato da una serie di biotrasformazioni, catalizzate da diversi citocromi, ad esempio il benzo[a]pirene va incontro ad epossidazione con

formazione di un diolo-epossido, altamente cancerogeno, che si lega al DNA in modo covalente formando addotti del DNA (53).

Fumo di sigaretta: aerosol concentrato

La prima fonte di esposizione ad agenti chimici tossici e la prima causa delle malattie chimicamente mediate negli esseri umani è causata dal fumo di sigaretta.

Sono circa 4000 le sostanze presenti nel fumo di tabacco durante la combustione, alcune farmacologicamente attive, cancerogene, mutagene, antigeniche e citotossiche.

Il fumo di sigaretta è una miscela di gas (87%), vapore (5%) e particelle solide (8%) e può quindi essere definito un aerosol concentrato, nel quale si trova disperso materiale corpuscolato di piccolissime dimensioni in grado di penetrare profondamente nell'albero respiratorio, e particelle più grandi che si fermano nelle prime vie respiratorie, tutte con effetto patogeno sul nostro organismo ed in grado di provocare danni a breve, medio e lungo termine.

Chiaramente, la potenzialità tossica di questo aerosol nelle vie respiratorie, è determinata dalle numerose sostanze che lo compongono e normalmente presenti nel particolato atmosferico, come gli idrocarburi policiclici aromatici (principalmente il benzo(a)pirene) ed i metalli pesanti (cadmio, cromo, selenio, nichel, arsenico e piombo), ma anche il catrame, la nicotina, il monossido d'azoto e le nitrosammine tabacco specifiche (NTS), ottenute dalla decomposizione della nicotina e altri alcaloidi).



Immagine 5: Rappresentazione di alcune delle sostanze tossiche contenute nella sigaretta

Le prime cellule immunitarie che rispondono allo stress ossidativo, causato dalla prolungata esposizione al fumo, sono i macrofagi alveolari.

Una risposta pro-infiammatoria viene sollevata attraverso l'attivazione del Nuclear Factor κ chain transcription in B cells (NF- κ B) seguita dalla produzione di citochine pro-infiammatorie quali Tumor Necrosis Factor- α (TNF α), l'interleuchina-6 (IL-6), l'interleuchina- 8 (IL-8) e leucotriene B4 (LTB4).

Queste molecole promuovono il richiamo e l'infiltrazione dei neutrofili nel polmone ed, in seguito, il rilascio incontrollato di radicali ossidanti e enzimi proteolitici, portando ad infiammazione cronica e potenzialmente all'insorgenza di malattie polmonari croniche ostruttive e al cancro polmonare (54).

In Italia e nel mondo le malattie respiratorie costituiscono un problema molto rilevante per la società infatti, secondo l'Ufficio Statistico dell'Unione Europea (Eurostat) rappresentano, dopo i tumori e le malattie del sistema circolatorio, la terza causa di morte e si prevede che, a causa dell'invecchiamento della popolazione, la prevalenza di tali patologie sia destinata ad aumentare.

Le statistiche ISTAT includono i tumori maligni tra le principali cause di morte e, tra questi, quelli che colpiscono trachea, bronchi e polmoni sono la quarta causa di morte in assoluto e la seconda negli uomini (55).

Le patologie respiratorie sono considerate delle patologie multifattoriali esse, infatti, sono determinate sia da fattori di rischio ambientali (esposizione professionale, inquinamento atmosferico, condizioni sociali, fumo di sigaretta, infezioni) che individuali (genetici e legati alla familiarità).

La maggior parte degli studi sul particolato effettuati finora evidenziano una supposta consequenzialità causale tra l'aumento di inquinamento e l'incremento di patologie respiratorie.

Le conseguenze a carico della salute si verificano soprattutto nei casi in cui si ha un brusco innalzamento delle concentrazioni dei comuni contaminanti dell'aria (inquinamento acuto). In questi casi, l'aumentata esposizione a vari irritanti atmosferici provoca disagio, irritazione, tossicità

specifica, affezioni respiratorie acute che comportano una riduzione della funzionalità polmonare, l'aumento delle malattie respiratorie, attacchi acuti di bronchite, l'aggravamento dei quadri di asma e perfino mortalità negli anziani affetti da patologie respiratorie e cardiovascolari croniche o soggetti che per motivi professionali (vigili del fuoco, polizia stradale, minatori, ecc) sono in continuo contatto con sostanze inquinanti.

Gli effetti a lungo termine provocano, invece, la comparsa di malattie polmonari croniche aspecifiche (bronchite cronica, bronco pneumopatia ostruttiva cronica, l'asma e l'enfisema), la formazione di varie neoplasie maligne (cancro polmonare, leucemie) ed un aumento della mortalità per malattie cardiovascolari e respiratorie (56).

PREMESSA E SCOPO DEL LAVORO

La presente tesi descrive il lavoro effettuato durante il triennio 2014-2017 nell'ambito del dottorato di ricerca in Scienze Geologiche, Biologiche e Ambientali, sotto la guida del Prof. Saccone responsabile del laboratorio di Genetica della sezione di Biologia Animale "M. La Greca" del Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali dell'Università di Catania, in collaborazione con la Prof.ssa Malaguarnera e il dott. M. Di Rosa afferenti al Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche, sezione di Patologia Generale dell'Università di Catania.

Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare i livelli di espressione delle Chitinasi, Chitinasi like-proteins e dei geni ad esse correlati nel sangue periferico di soggetti esposti ad agenti inquinanti rispetto a individui non esposti e, dunque, valutare il loro possibile ruolo nella funzionalità respiratoria. L'analisi dell'attività enzimatica della CHIT1 nel plasma, lo studio dell'immunità innata in vitro e lo studio del polimorfismo del gene della *CHIT1* potrebbero spiegare nuovi meccanismi che regolano la suscettibilità agli inquinanti ambientali, aggiungendo nuove varianti genetiche potenzialmente correlate ed aprendo la strada verso nuove strategie diagnostiche e terapeutiche.

MATERIALI E METODI

Reclutamento Campioni

I campioni sono stati forniti dal Prof. Dr. Venerando Rapisarda, U.O.C. Medico del Lavoro c/o l'A.O.U. "Policlinico-Vittorio Emanuele", di Catania.

I soggetti reclutati erano giornalmente esposti ad agenti inquinanti, per motivi professionali. In particolare, svolgevano servizio come: vigili urbani presso tre diversi Comuni della fascia Etnea; operai in attività presso la discarica che raccoglie i residui di lavorazione del polo petrolchimico della provincia di Siracusa. Ciascun lavoratore, nell'ambito della sorveglianza sanitaria ha sottoscritto il consenso informato (Comitato Etico prot. n. 4/2014).

Il totale dei soggetti reclutati era di 49, di cui 26 fumatori e 23 non fumatori. Sono stati reclutati un totale di 25 controlli sani (11 fumatori e 14 non fumatori), afferenti ai laboratori di ricerca del Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche (BIOMETEC) e dunque non professionalmente esposti ad agenti inquinanti (particolato, idrocarburi).

All'atto del reclutamento, sia i controlli che gli esposti, non presentavano processi infiammatori cronici, non erano sottoposti a trattamenti con antinfiammatori o immunosoppressori a lungo termine e non presentavano malattie infettive.

Le caratteristiche individuali e i dati clinici di laboratorio sono elencati nelle tabelle 1 e 2.

	UOMINI	DONNE	ETÀ (media $\pm$ d.s.)	FUMATORI	NON FUMATORI	TOTALE
CONTROLLI	21	4	48 $\pm$ 6,02	11	14	25
ESPOSTI	44	5	52,9 $\pm$ 7,08	26	23	49

Tabella 1: Caratteristiche generali dei soggetti reclutati per lo studio

TIPOLOGIA ESAMI	PARAMETRI	VALORE (MEDIA±D.S.)
EMOCROMOCITOMETRICI	ERITROCITI (RBC)	5,24 ± 0,57
	GLOBULI BIANCHI (WBC)	7,6 ± 1.86
	PIASTRINE (PLT)	7,6 ± 1.86
	EMOGLOBINA (HB)	15,08 ± 1,28
BIOCHIMICA CLINICA	GLICEMIA	101,04 ± 20,35
	ALANINA AMINOTRASFERASI (ALT/GPT)	23,73 ± 12,29
	ASPARTATO TRANSFERASI (AST/GOT)	21,02 ± 9,03
	GAMMA GLUTAMIL TRASFERASI (GGT)	28,97 ± 10,8
	CREATININA	0,98 ± 0,14
DOSAGGI URINARI	1 IDROSSIPIRENE (1-OHP)	0,65 ± 0,21
	S-PM	15,44± 8,15
SPIROMETRICI	CAPACITÀ VITALE FORZATA (FVC)	3,85 ± 0,87
	VOLUME ESPIRATORIO FORZATO (FEV1)	3,43 ± 0,6
	PICCO DI FLUSSO ESPIRATORIO (PEF)	7,65 ± 1,32

Tabella 2: Dati clinici di laboratorio dei soggetti esposti per motivi occupazionali ad agenti inquinanti

Analisi in vitro

PBMCs

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs), sia dei controlli che degli esposti, sono state isolate mediante stratificazione del sangue periferico su gradiente Ficoll-Hypaque (Invitrogen, Milano, Italia).

Il sangue periferico è stato inizialmente centrifugato a 2500 rpm al fine di isolare il plasma e, successivamente diluito (1/2), con tampone fosfato salino (PBS) (Invitrogen, Milano, Italia), stratificato su Ficoll e centrifugato a 400 g per 30 min a temperatura ambiente.

I PBMCs sono stati recuperati, lavati due volte con PBS e lisati mediante reagente TRIzol (Invitrogen, ITALIA) per l'estrazione del DNA genomico e dell' RNA, secondo le procedure indicate dalla casa madre.

Cellule in coltura

Per gli esperimenti in vitro, abbiamo isolato i PBMCs da donatori sani, mediante stratificazione su gradiente Ficoll-Hypaque (Invitrogen, Milano, Italia), come indicato precedentemente.

I PBMCs isolati, sono stati posti in coltura su Flask sterili da 25 cm² (Invitrogen, Milano, Italia) con Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco, Life Technologies) supplementato al 10% di FBS (siero fetale bovino, GIBCO, Life Technologies), 1% di glutammina (2mM) e 50 mg/ml di penicillina/streptomicina (Invitrogen, Milano, Italia).

Le analisi preliminari sono state condotte al fine di stabilire tempi e concentrazioni per la fase sperimentale in vitro. Successivamente, le cellule sono state trattate con 1,2,4-Benzenetriol (Sigma-Aldrich) per 24 ore, alla concentrazione di 5 µM, e poste in incubatore a 37°C con il 5% di CO₂.

Dopo 24 ore i PBMCs sono stati raccolti e lisati in TRIzol (Invitrogen, ITALIA) per l'estrazione del RNA secondo protocollo.

Abbiamo effettuato l'esame di vitalità cellulare mediante Trypan Blue. Al fine di raggiungere un dato statistico, abbiamo effettuato gli esperimenti in quintuplicato.

Saggio di attività enzimatica della Chitotriosidase

L'attività enzimatica della Chitotriosidase è stata determinata sul plasma dei soggetti sia esposti che non esposti. La rilevazione del segnale è stata effettuata mediante metodo fluorimetrico attraverso l'utilizzo del 4-methylumbelliferyl β D-NNN-triacelchitotriosidase a una concentrazione di 22 μ M (Sigma Chemical Co.) in tampone citrato-fosfato, a pH 5,2.

Per misurare l'attività enzimatica della CHIT1 nei soggetti reclutati abbiamo utilizzato un volume pari a 5 μ l di plasma non diluito, incubato con 100 μ l di substrato per 1 h a 37 ° C. Successivamente la reazione è stata stoppata mediante l'utilizzo di 1,4 ml di glicina-NaOH a 0,1 M, a pH 10.8. La fluorescenza è stata misurata a 450 nm con un fluorimetro Perkin Elmer LS40 (lunghezza d'onda di eccitazione di 365 nm). Come controllo positivo della reazione enzimatica, è stato utilizzato il plasma di soggetti affetti da malattia di Gaucher, gentilmente concessi dalla sezione di Oncoematologia dell'Ospedale Ferrarotto diretto dal Prof. Francesco Di Raimondo. L'attività enzimatica è stata calcolata ed espressa in nanomoli per millilitro/ora.

Analisi della duplicazione di 24 bp del gene della CHIT1

Il DNA genomico è stato isolato dalla componente cellulare proveniente da 3ml di sangue periferico mediante l'utilizzo del reagente TRIzol (Invitrogen, ITALIA).

L'analisi del polimorfismo è stata effettuata mediante Nested Pcr, una tecnica in grado di migliorare sia la sensibilità che la specificità della reazione di amplificazione, grazie all'utilizzo di due coppie di primers (Tabella 3).

Il frammento di DNA, amplificato nella prima PCR mediante l'utilizzo di primers più esterni, è stato ulteriormente amplificato con una coppia di primers che fiancheggiano una sequenza interna al segmento bersaglio della prima reazione.

In totale, sono stati usati come stampo delle reazioni 300 ng di DNA il quale è stato amplificato utilizzando il kit PerfectTaq Plus DNA Polymerase 1000 U (5 PRIME) e il Bio-Rad Thermal cycler.

Il DNA è stato denaturato a 95° C per 5 minuti per un ciclo, 52° C per 30 secondi per la fase di annealing e 72° C per 30 secondi per l'allungamento, il tutto per 35 cicli.

Il prodotto amplificato è stato separato su gel di agarosio al 3% in tampone TAE (Tris-acetato e EDTA) e visualizzato con Syber Safe (Invitrogen, ITALIA).

Gene symbol	Forwar primer 5'->3'	Reverse primer 3'->5'	Amplicon size (bp)
CHIT1POLIfirst	TAC ATC TTC CGG GAC AAC	TCA GTT CCT GCC GTA GCG TC	186
CHIT1POLIsecond	AGC TAT CTG AAG CAG AAG	GGA GAA GCC GGC AAA GTC	75

Tabella 3: Sequenze Primers utilizzati per l'analisi del polimorfismo del gene della CHIT1

Analisi dell'espressione genica mediante real-time PCR

L'RNA totale è stato estratto usando il reagente TRIzol (Invitrogen, ITALIA). Attraverso la tecnica RT-PCR, sono stati retrotrascritti 2 µg di RNA totale mediante l'uso del Kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, Milano, Italia) il quale prevede un volume totale di 20 µl. Un ventesimo dei prodotti di RT-PCR è stato utilizzato per la successiva analisi di PCR. I primers utilizzati sono riportati in Tabella 4. La Real-time PCR è stata effettuata mediante Platinum SYBR Green qPCRSuperMix UDG con Rox (Invitrogen Life Technologies). La reazione è stata eseguita utilizzando un termociclatore LightCycler Nano (Roche). Tutti i valori sono stati normalizzati utilizzando come housekeeping gene la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi umana (*GAPDH*).

I dati sono stati presentati come media % +/- S.D. di almeno tre esperimenti indipendenti. Le differenze sono state analizzate mediante T test Student, con $p < 0.05$ considerato statisticamente significativo.

Gene symbol	Forward primer 5'→3'	Reverse primer 3'→5'
GAPDH	CTGCACCACCAACTGCTTAG	AGGTCCACCACTGACACGTT
CHIT1	ACCCTGTTAGCCATCGGAGGCTGG	TGCACAGCAGCATCCACGTTGAGG
CHIA	CAAGCCCAGGCTGATGGTCACTGC	GTACAGATCTCGTAGTAAGCCC
CHI3L1	TCCCCTATGCCACCAAGGGCAAC	CCATACCATHHCGCCTGCCAGC
CHI3L2	TCTTGACTGCGGGCGTATC	CCCAAGACCCATGGAAGTCA
TNF α	AGCCCATGTTGTAGCAAACC	TGAGGTACAGGCCCTCTGAT
IL-1 β	AGCTACGAATCTCCGACCAC	CGTTATCCCATGTGTGGAAGAA
IL6	GAAAGCAGCAAAGAGGCACT	TTCACCAGGCAAGTCTCCT
CCL2	CCCCAGTCACCTGCTGTTAT	AGATCTCCTTGGCCACAATG
CXCL5	AGCTGCGTTGCGTTTGTGTAC	TGGCGAACACTTGCAGATTAC
CXCL1	GGCAGGGATTCACCTCAAGA'??	GCCATCGGTGCAATCTATCT
CXCL3	ATCCAAAGTGTAATGTAAGGTC	GCAGGAAGTGTAATGATACG
CXCL6	GCTGAGAGTAAACCCCAAAAC	AACTGCTCCGCTGAAGAC
CXCL8	TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG	ACTTCTCCACAACCCTCTGC
CXCL2	TCCTCAATGCTGTACTGGTCC	ATGTTCTTCCTTCCAGGTC

Tabella 4: Sequenze Primers utilizzati per Real-time PCR

Analisi bioinformatica

Alcuni dati di questo studio sono stati acquisiti utilizzando un dataset di microarray ottenuto dalla banca dati pubblica NCBI Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/>). Il numero di accesso al dataset era GSE2125. All'interno del microarray vi erano disponibili i dati dell'intero trascrittoma (25000 geni) di macrofagi alveolari isolati mediante lavaggio bronco alveolare (BAL) da soggetti fumatori cronici.

Analisi statistica

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Sono stati utilizzati test non parametrici. Il test di Mann-Whitney è stato usato per analizzare i dati e la significatività è stata determinata con $p < 0.05$.

RISULTATI

Distribuzione del polimorfismo della Chitotriosidase nei soggetti reclutati

L'analisi del polimorfismo, effettuata mediante Nested PCR, ha confermato le frequenze attese riportate in bibliografia (57).

Sono stati genotipizzati 74 soggetti e la frequenza del polimorfismo ottenuta è stata del 52% per gli omozigoti wild type (AA), 41% per gli eterozigoti (Aa) e il 7% per gli omozigoti mutati (aa).

La corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 3% (Figura 1A, rappresentativa della frequenza su 10 campioni) ha permesso di rilevare un frammento di 75 pb nei soggetti wild type, un frammento da 99 pb nei soggetti omozigoti mutati ed entrambi i frammenti nei soggetti eterozigoti.

L'attività enzimatica della CHIT1, è stata esaminata nel plasma sia dei soggetti esposti ad agenti inquinanti che nei soggetti controllo non esposti, suddivisi in omozigoti wild type (AA), eterozigoti (Aa) e omozigoti mutati (aa).

I dati ottenuti hanno confermato che l'attività enzimatica della CHIT1 nei soggetti omozigoti wild type era significativamente aumentata rispetto agli eterozigoti ($p < 0.0001$) ed agli omozigoti mutati ($p < 0.01$) (Figura 1B).

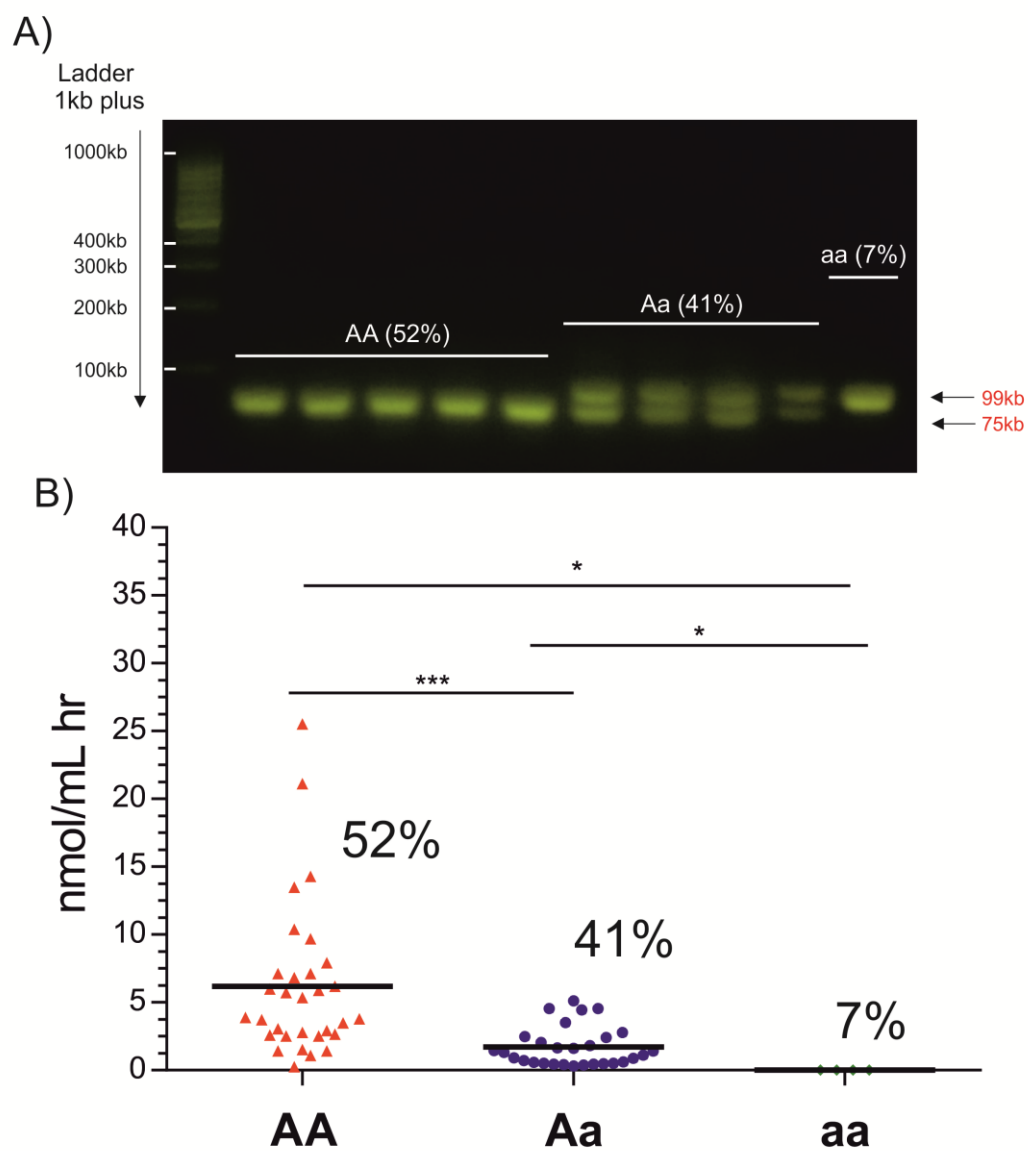


Figura 1: Analisi del polimorfismo e dell'attività della Chitotriosidase.

Analisi di correlazione dell'attività enzimatica della Chitotriosidase vs l'emocromo con formula leucocitaria

Nei soggetti esposti abbiamo effettuato le analisi di correlazione comparando i livelli di attività della CHIT1 con i dati clinici di laboratorio che ci sono stati forniti al reclutamento.

L'unica significatività è emersa comparando i livelli di attività della CHIT1 con il numero di piastrine per volume di sangue (PLT)($p=0,023$)(Figura 2).

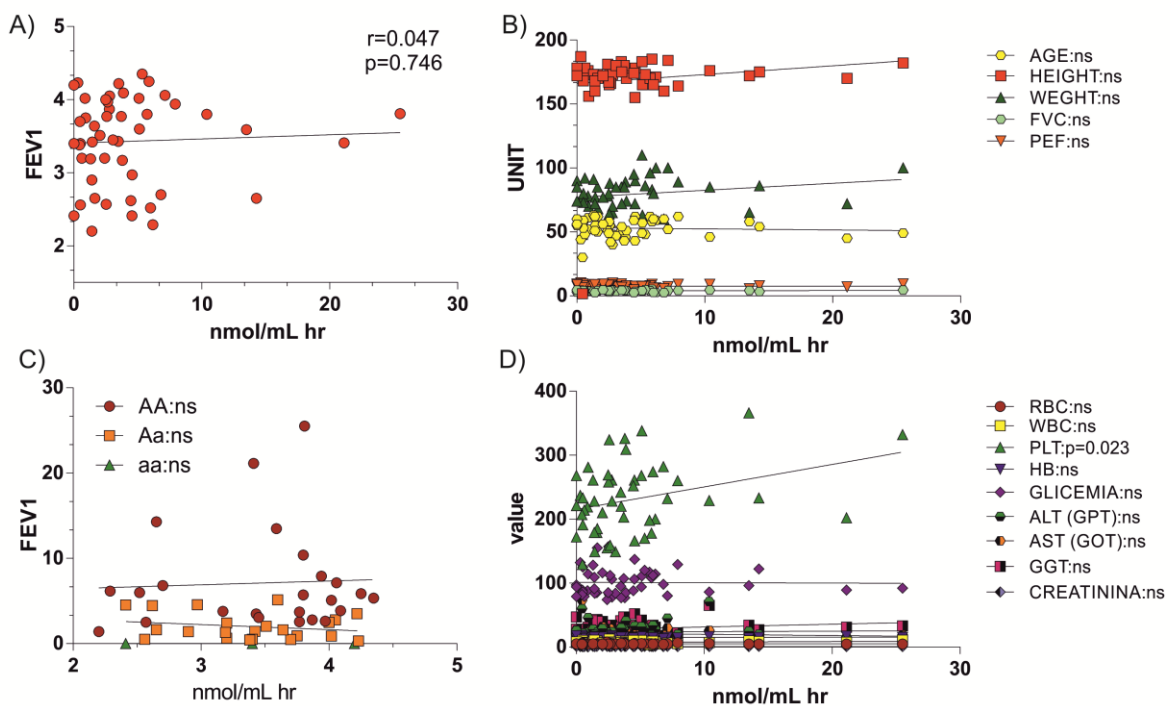


Figura 2: Analisi statistica di correlazione dell'attività enzimatica della Chitotriosidase vs l'emocromo completo con formula leucocitaria

Analisi di correlazione dell'attività enzimatica della Chitotriosidase vs i livelli di idrossipirene e benzene

Inoltre, abbiamo effettuato analisi di correlazione fra i dosaggi urinari di idrossipirene (1-OHP0,03-0,7 μ g/g creat) e benzene (S-PM<25 μ g) vs i livelli di attività enzimatica della CHIT1 (Figura 4A-C) (Figura 4B-D).

Nessun dato è risultato statisticamente significativo dimostrando che, sia l'idrossipirene che il benzene, non intervenivano nella modulazione dei livelli di attività della CHIT1.

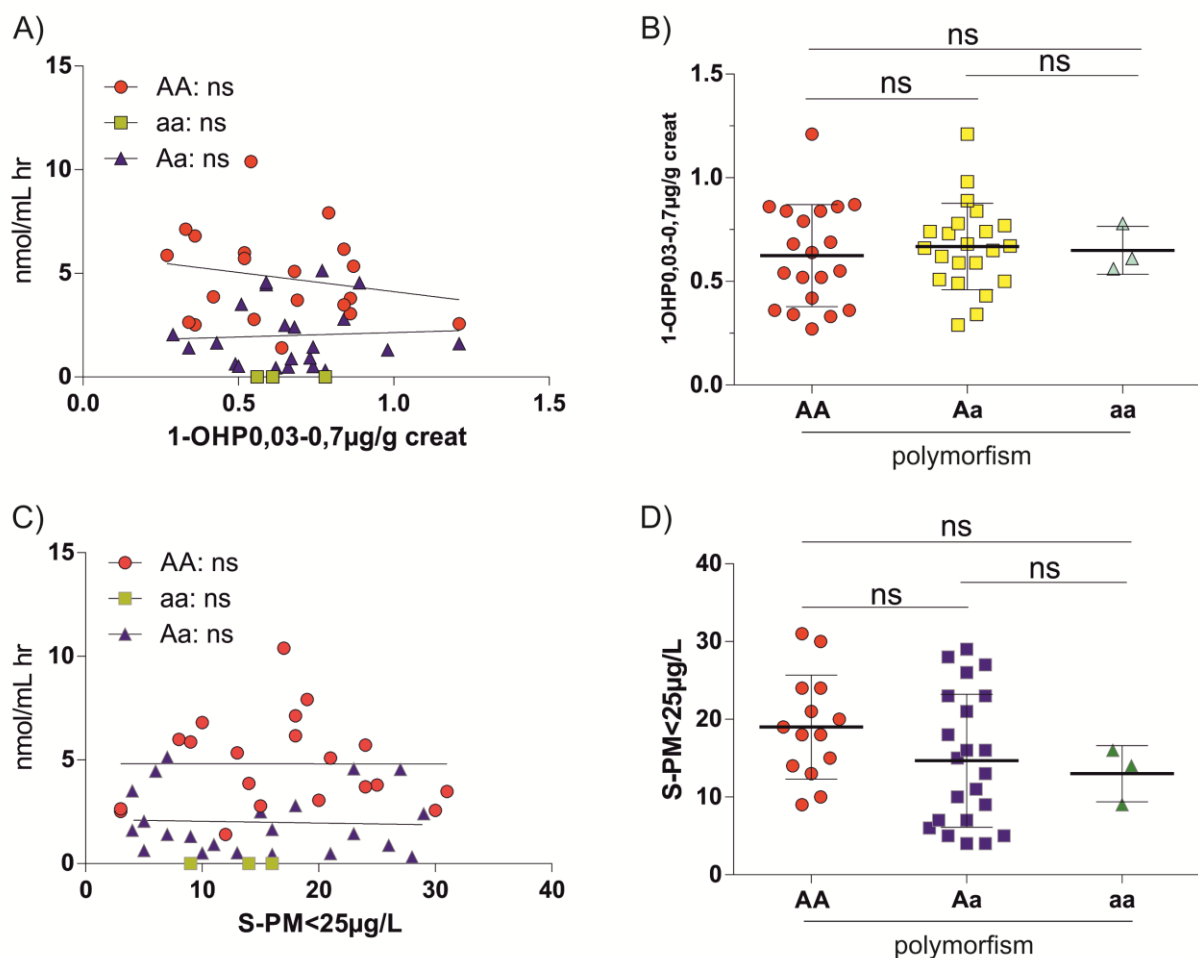


Figura 4: Analisi statistica di correlazione dell'attività enzimatica della CHIT1 vs 1-OHP0,03-0,7 μ g/g creat e S-PM<25 μ g/L (A-C); dosaggio di 1-OHP0,03-0,7 μ g/g creat e S-PM<25 μ g nei soggetti omozigoti wild type (AA), eterozigoti (Aa) e omozigoti mutati (aa) per il gene della CHIT1 (4B-D).

FEV1: fumatori wild tipe vs fumatori eterozigoti

Un dato interessante è emerso analizzando i valori del *Volume Espiratorio Massimo nel I Secondo* (FEV1) misurato nei fumatori e non fumatori con genotipo wild type per il gene della *CHIT1* (AA), eterozigote (Aa) e omozigote mutato (aa) (Figura 3A).

La FEV1 rappresenta il test utilizzato comunemente per valutare la funzionalità polmonare ed il grado di pervietà delle vie aeree.

Dai risultati ottenuti è emerso che gli eterozigoti fumatori presentavano una migliore funzionalità polmonare rispetto ai soggetti omozigoti Wild Type esposti allo stesso agente di rischio (Figura 3B).

Al contrario invece, non esisteva alcuna differenza comparando gli eterozigoti con gli omozigoti wild type non fumatori (Figura 3A).

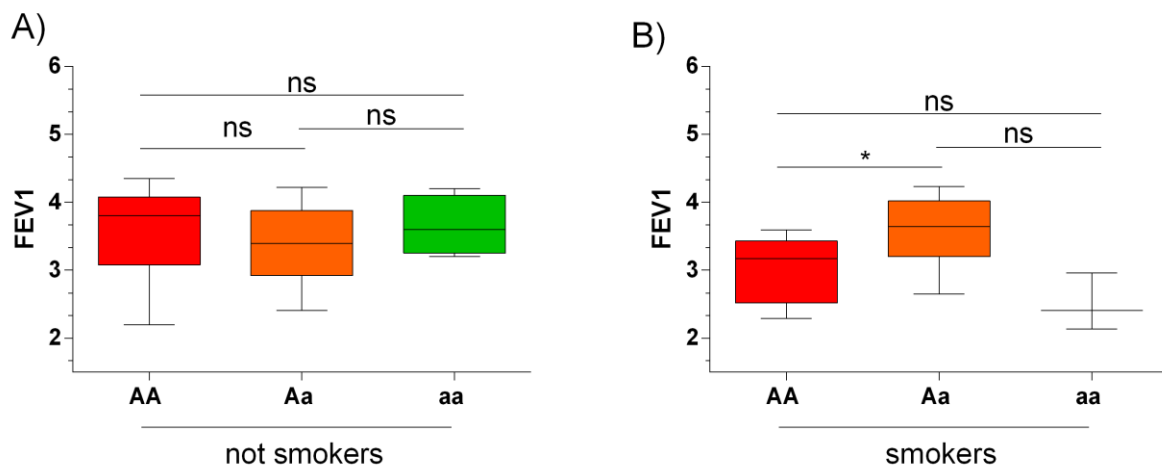


Figura 3: Analisi statistica della FEV1 nei soggetti omozigoti wild type (AA), eterozigoti (Aa) e omozigoti mutati (aa) per il gene della *CHIT1*, non fumatori (A) e fumatori (B).

Analisi dei livelli enzimatici della Chitotriosidase nei soggetti esposti vs i soggetti controllo non esposti

Alla luce dei risultati ottenuti, abbiamo voluto analizzare i livelli enzimatici della CHIT1 nei soggetti esposti rispetto ai controlli non esposti.

I dati ottenuti hanno dimostrato che i livelli di attività della CHIT1 aumentavano significativamente nei soggetti esposti rispetto ai soggetti controlli non esposti (Figura 5A).

I livelli più elevati di attività della CHIT1 sono stati riscontrati negli soggetti esposti. La nostra ipotesi è stata che questo risultato poteva essere riconducibile sia all'esposizione ad agenti inquinanti che al genotipo. Al fine di dare una risposta a questa domanda, abbiamo suddiviso gli esposti e i soggetti controllo non esposti in relazione al polimorfismo della CHIT1 (esposti wild type vs controlli wild type, Figura 5B; esposti eterozigoti (Aa) vs soggetti controllo eterozigoti, Figura 5C). Dall'analisi è emerso che, in entrambi i casi, i livelli di attività della CHIT1 aumentavano significativamente nei soggetti esposti rispetto ai soggetti controlli non esposti dimostrando che l'incremento dei livelli di attività era indipendente dal genotipo.

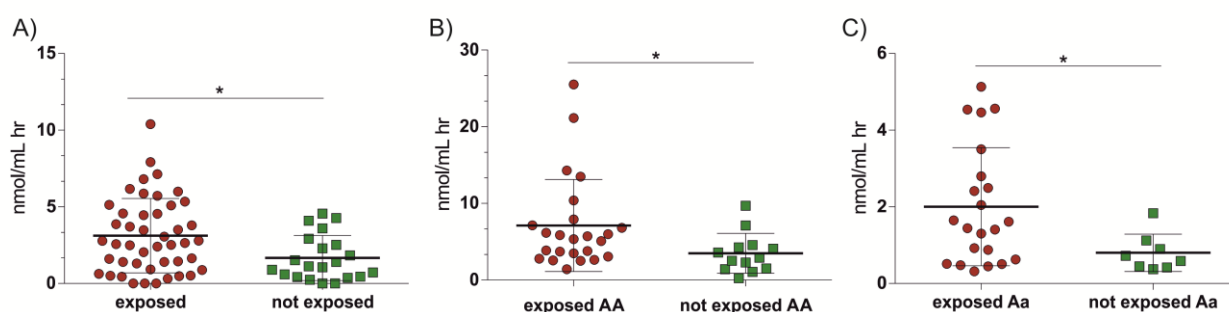


Figura 5: A) Analisi statistica dei livelli di attività enzimatica della CHIT1 nei soggetti esposti rispetto ai controlli non esposti.
B, C) Analisi statistica dei livelli di attività enzimatica della CHIT1 nei soggetti esposti rispetto ai controlli non esposti in funzione del polimorfismo(AA-Aa).

Analisi dei livelli enzimatici della Chitotriosidase nei soggetti esposti (AA, Aa) e non esposti fumatori (AA, Aa)

Se l'aumento dei livelli enzimatici della CHIT1 era dunque associato ai livelli di esposizione, ci siamo chiesti se il fumo di sigaretta poteva essere un fattore discriminante nei due gruppi. Dal grafico presente in Figura 6A si può notare che l'attività enzimatica della CHIT1 aumentava significativamente nei soggetti esposti rispetto ai non esposti fumatori, dimostrando che il fumo di sigaretta influenzava l'attività enzimatica della CHIT1.

Alla luce dei risultati ottenuti, abbiamo voluto analizzare i due gruppi distinguendoli sulla base del polimorfismo della CHIT1.

Il dato interessante è stato che negli esposti wild type fumatori (E-AA) l'attività enzimatica della CHIT1 risultava significativamente aumentata non solo rispetto ai soggetti esposti fumatori con genotipo eterozigote (E-Aa), ma inaspettatamente anche nei soggetti controllo non esposti fumatori, con medesimo genotipo wild type (NE-AA) (Figura 6B).

Il trend è stato mantenuto anche nei soggetti fumatori eterozigoti, esposti e non esposti, ma non è risultato significativo statisticamente.

I risultati ottenuti ci hanno portato a speculare che l'attività della CHIT1 è sicuramente influenzata dall'esposizione giornaliera ad agenti inquinanti, come anche dal fumo di sigaretta. Il genotipo eterozigote potrebbe avere un ruolo prognostico positivo nei soggetti fumatori che giornalmente sono esposti a sostanze inquinanti.

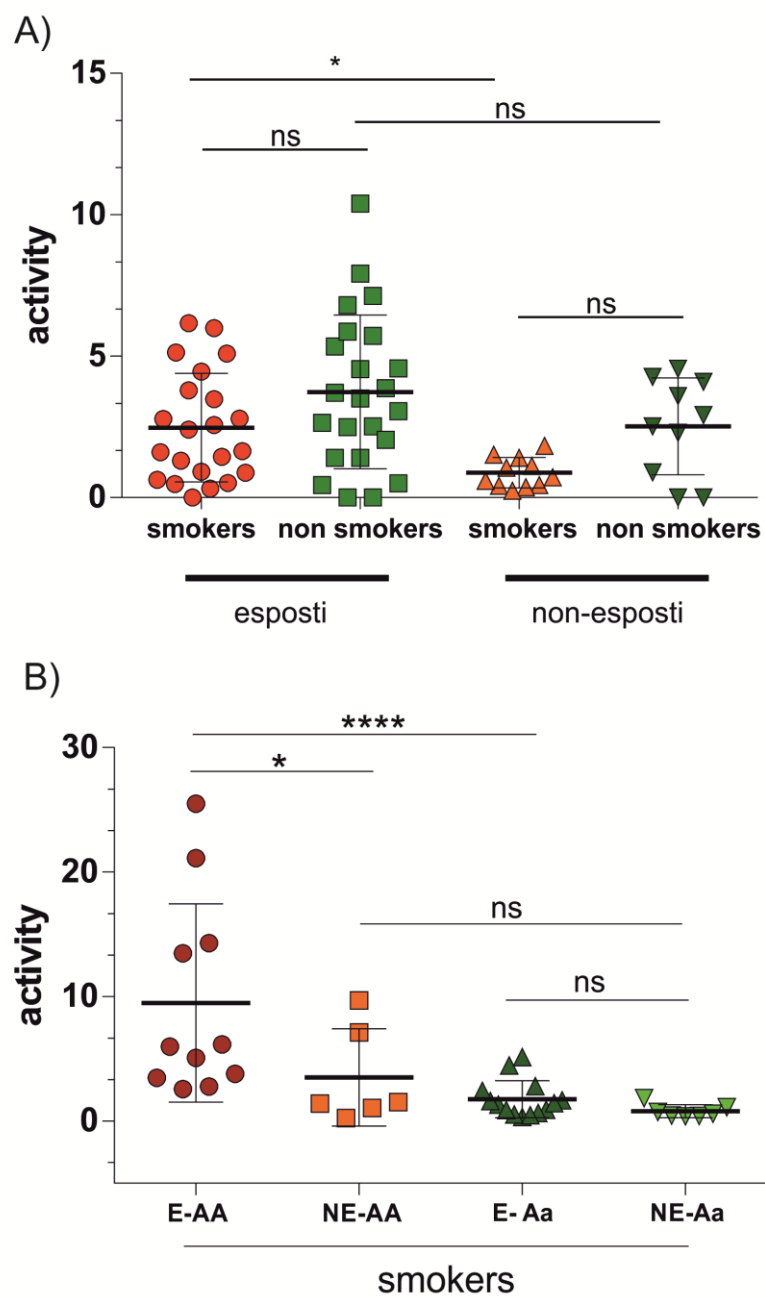


Figura 6: A) Analisi statistica dei livelli di attività enzimatica della CHIT1 nei soggetti esposti (fumatori e non fumatori) e nei controlli (fumatori e non fumatori).
 B) Analisi statistica dei livelli di attività enzimatica della CHIT1 nei soggetti esposti fumatori e nei controlli non esposti fumatori in relazione al polimorfismo genico della CHIT1 (AA e Aa)

Analisi dei livelli di espressione delle Chitinasi e delle Chitino-lectine nei PBMCs dei soggetti esposti rispetto ai non esposti mediante real-time PCR

L' RNA ottenuto dai PBMCs dei soggetti esposti e dei controlli non esposti è stato estratto e retro trascritto come descritto precedentemente.

Analizzando i livelli di espressione delle chitinasi e delle chi-lectine non è emerso nessun dato significativo: le chitinasi non risultavano essere modulate a livello periferico nei PBMCs di soggetti professionalmente esposti ad agenti inquinanti rispetto ai controlli non esposti (Figura 7).

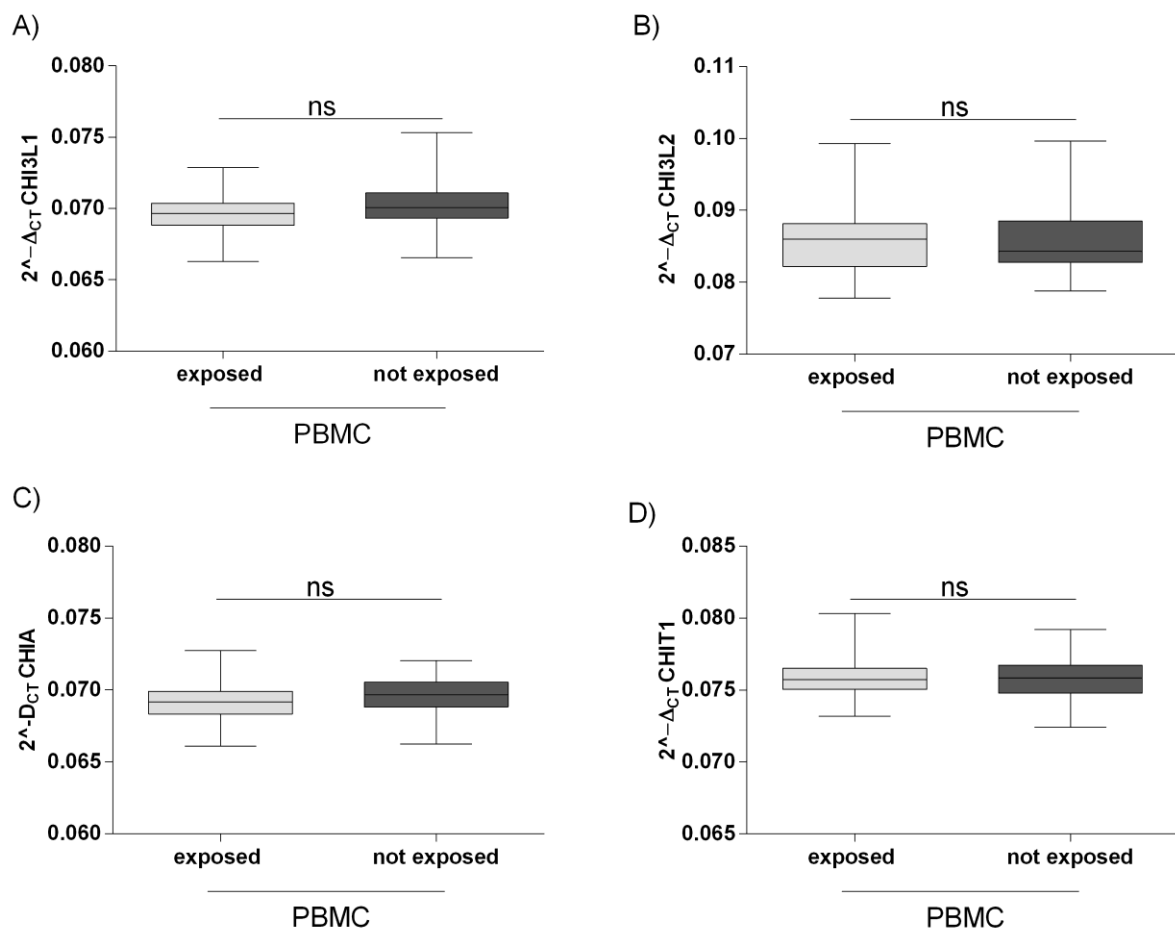


Figura 7: Espressione delle chitinasi nei PBMCs dei soggetti esposti rispetto ai controlli non esposti

Analisi dei livelli di espressione delle Chitinasi e Chi-lectine nei PBMCs trattati con 1,2,4-Benzenetriol mediante real-time PCR

Nei PBMCs di soggetti professionalmente esposti ad agenti inquinanti rispetto ai soggetti controlli non esposti non è emersa alcuna variazione nell'espressione dei livelli di mRNA delle chitinasi, quindi abbiamo proseguito le analisi esponendo direttamente i PBMCs ad un agente inquinante, quale l'1,2,4-Benzenetriol per 24 ore alla concentrazione di 5 μ M.

Considerando che le chitinasi rappresentano un gruppo di geni estremamente variabili dal punto di vista genetico abbiamo analizzato solamente i livelli di espressione dell'mRNA dai PBMCs di soggetti omozigoti wild type per il gene della *CHIT1*.

Dai grafici in Figura 8 è emerso che l'unica significatività riguardava la *CHIT1* i cui livelli di espressione erano ridotti nei PBMCs trattati con 1,2,4-Benzenetriol rispetto ai PBMCs non trattati; al contrario le altre chitinasi analizzate non erano modulate in maniera significativa.

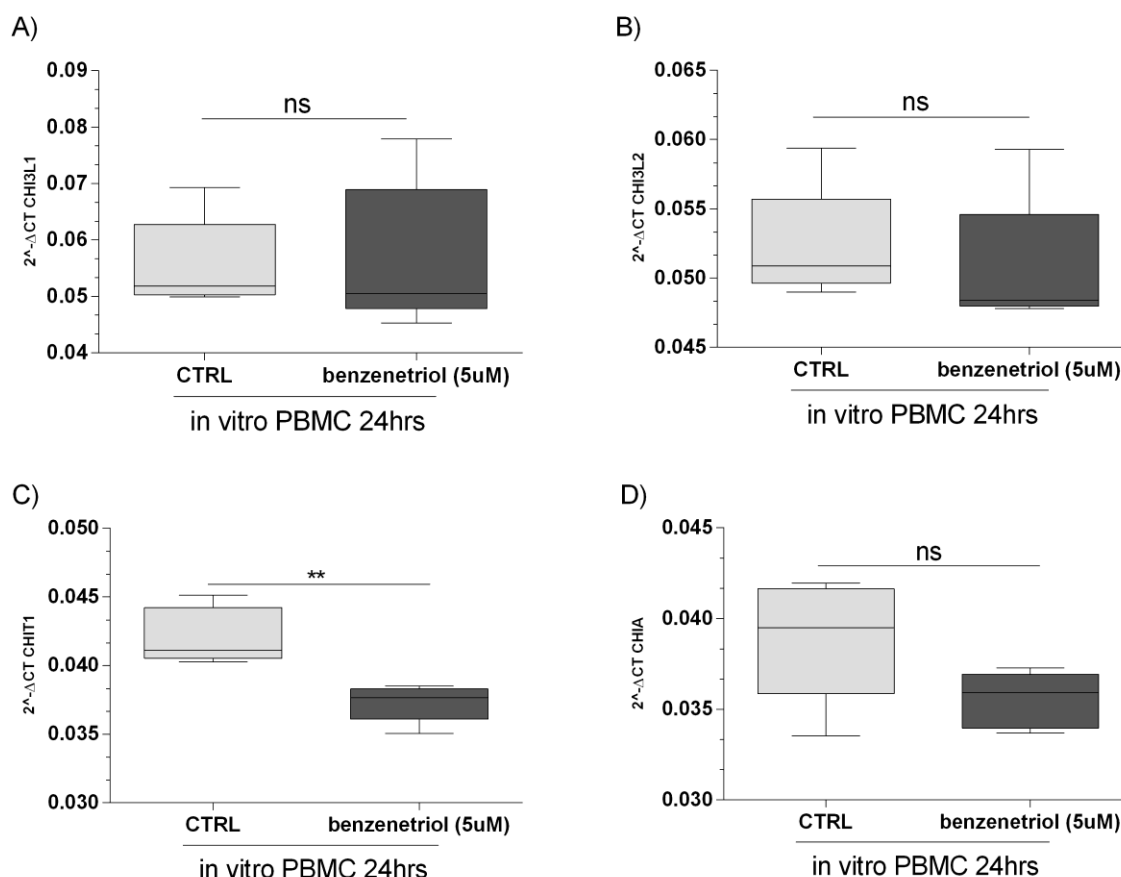


Figura 8: Livelli di espressione delle chitinasi nei PBMCs trattati con 1,2,4-Benzenetriol rispetto ai controlli non trattati

Analisi dei livelli di espressione delle citochine infiammatorie nei PBMCs trattati con 1,2,4-Benzenetriol mediante real-time PCR

Abbiamo analizzato, inoltre, i livelli di espressione delle citochine pro-infiammatorie (TNF α , IL1 β , IL6,) e della chemochina CCL2 nei PBMCs trattati con 1,2,4-Benzenetriol per 24 ore alla concentrazione di 5 μ M. I risultati che abbiamo ottenuto sono stati una sovra-espressione dei livelli del messaggero del TNF α e una riduzione dei livelli di espressione di CCL2 (Figura 9).

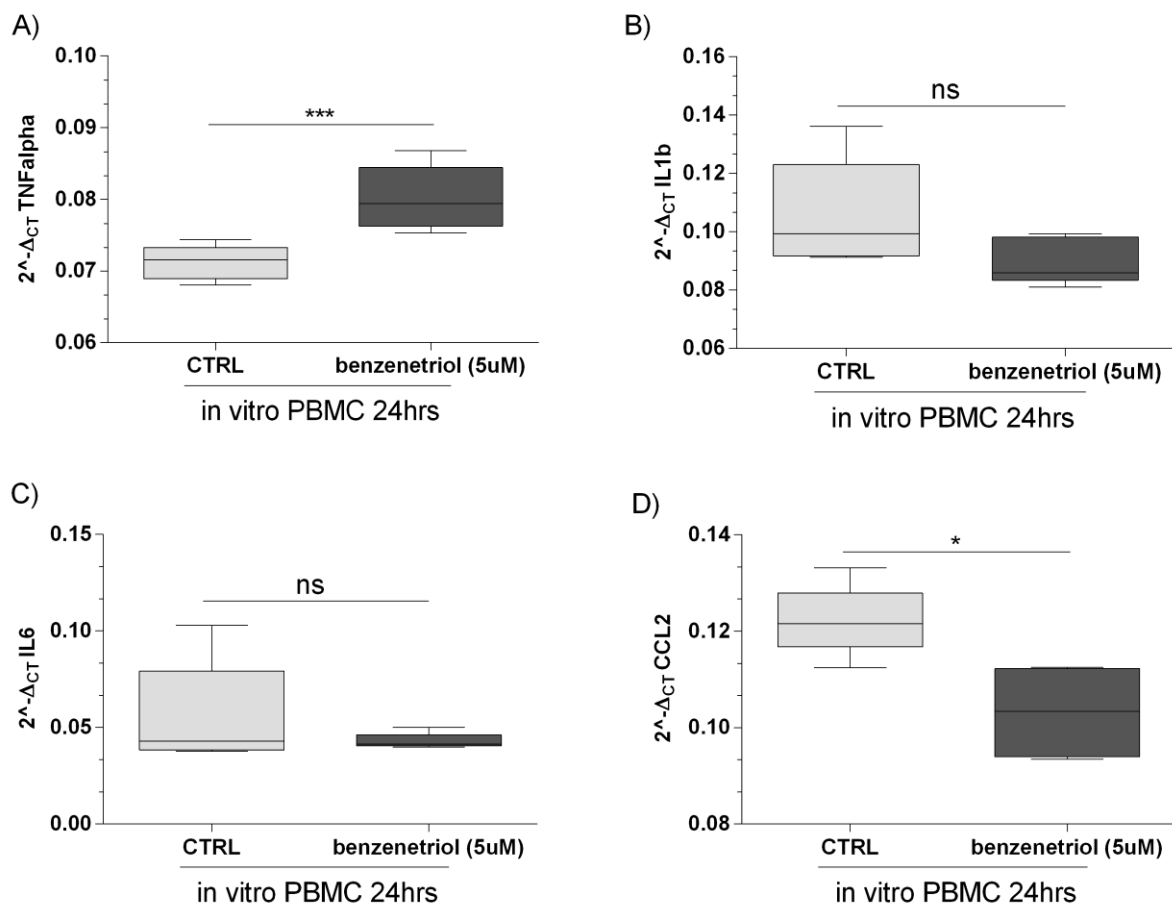


Figura 9: Livelli di espressione delle citochine nei PBMCs trattati 1,2,4-Benzenetriol rispetto ai controlli non trattati

Analisi di correlazione CCL2 vs CHIT1

Abbiamo effettuato un'analisi di correlazione tra *CHIT1* e *CCL2* nei PBMCs trattati con 1,2,4-Benzenetriol per 24 ore alla concentrazione di 5 μ M rispetto ai PBMCs non trattati, la quale ci ha rivelato una correlazione diretta ($p=0.0047$, $r=0.8082$) tra l'espressione di *CHIT1* e l'espressione di *CCL2* (Figura 10).

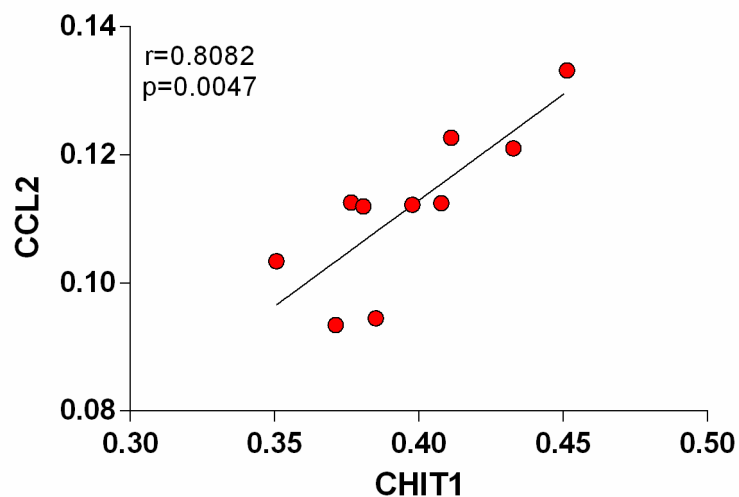


Figura 10: Correlazione dei livelli di espressione di *CCL2* e *CHIT1* nei PBMCs trattati con 1,2,4-Benzenetriol rispetto ai controlli non trattati

Analisi di correlazione fra i livelli di espressione dell'mRNA delle principali chemochine vs i livelli di CHIT1

L'analisi di correlazione fra i livelli di espressione del messaggero della CHIT1 con le diverse chitinasi non ha prodotto risultati significativi (Figura 11A). Al contrario, i livelli di espressione dell'mRNA delle principali chemochine infiammatorie (*CXCL5*, *CXCL1*, *CXCL3*, *CXCL6*, *CXCL8*, *CXCL2*) nei PBMCs trattati con 1,2,4-Benzenetriol per 24 ore alla concentrazione di 5 μ M risultavano essere, invece, negativamente correlati con la *CHIT1* (Figura 11B).

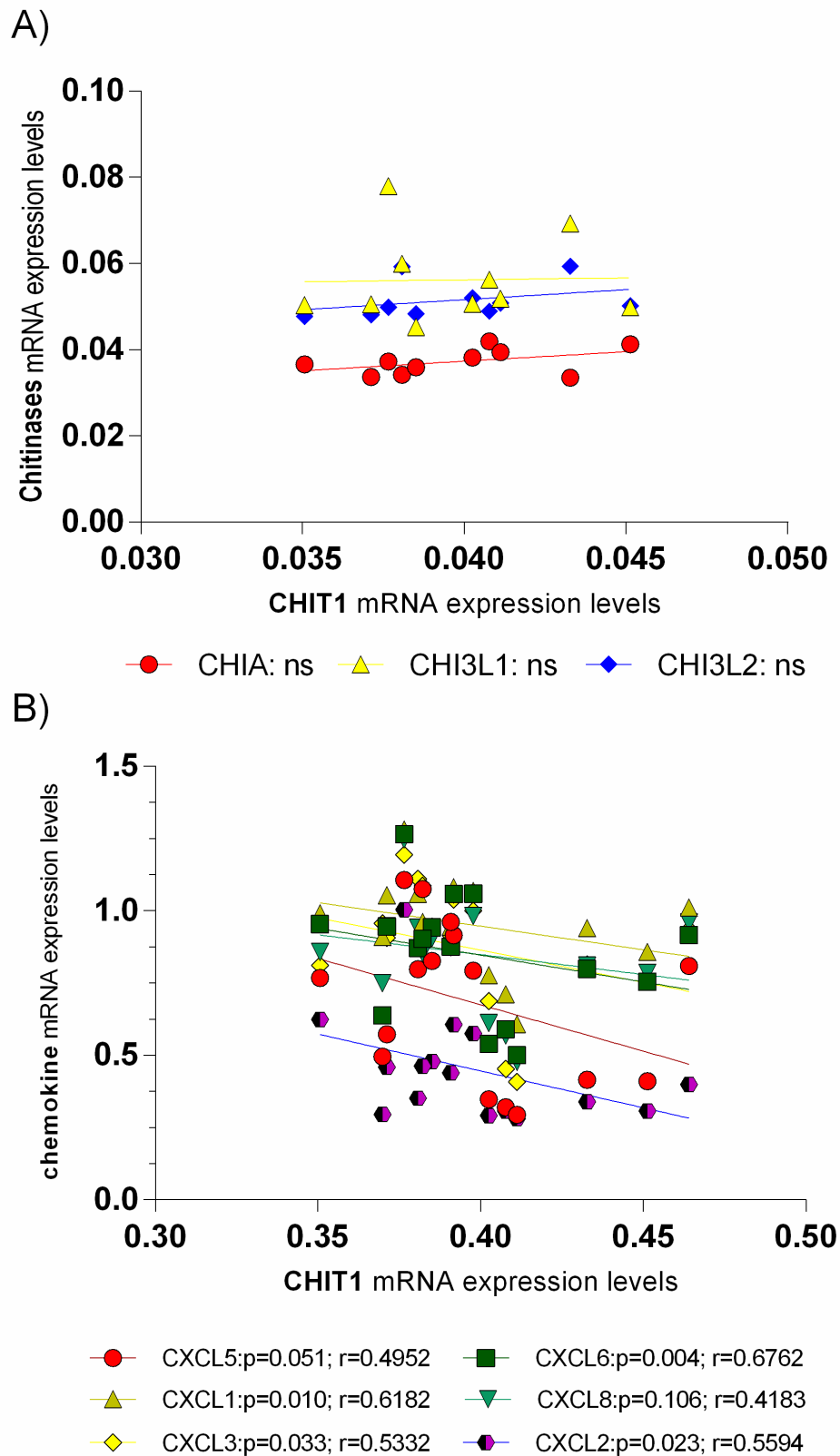


Figura 11: Analisi di correlazione fra i livelli di espressione dell'mRNA delle chemochine rispetto ai livelli CHIT1 nei PBMCS trattati con 1,2,4-Benzenetriol rispetto ai controlli non trattati

Analisi dei livelli di espressione delle chemochine nei PBMCs trattati con 1,2,4-Benzenetriol mediante real-time PCR

L'analisi effettuata mediante real-time PCR ci ha permesso di rilevare i livelli di espressione dell'mRNA delle chemochine (*CXCL5*, *CXCL1*, *CXCL3*, *CXCL6*, *CXCL8*, *CXCL2*) nei PBMCs trattati con 1,2,4-Benzenetriol per 24 ore alla concentrazione di 5 μ M.

Tutte le chemochine in esame sono risultate significativamente modulate nei PBMCs trattati paragonati ai PBMCs controllo (Figura 12).

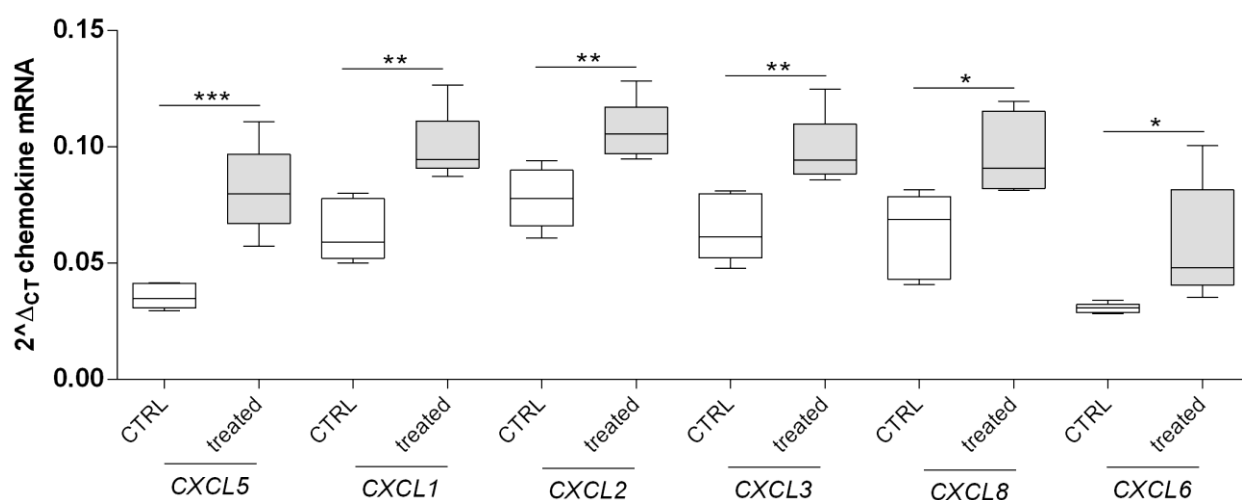


Figura 12: Analisi di espressione mediante real-time PCR delle chemochine nei PBMCs trattati con 1,2,4-Benzenetriol rispetto ai controlli non trattati

Livelli di espressione delle chitinasi nei macrofagi alveolari di soggetti fumatori

Mediante l'utilizzo dei dati depositati su NCBI nella sezione GEOProfile, abbiamo potuto verificare se i livelli di espressione delle chitinasi e delle molecole ad esse correlate fossero significativamente espresse nei macrofagi alveolari di soggetti fumatori. Il dataset GSE2125 da noi selezionato era costituito dal transcriptoma di macrofagi alveolari isolati mediante BAL provenienti da 15 soggetti fumatori e 18 controlli non fumatori.

Nei macrofagi dei soggetti fumatori, i livelli di espressione dell'mRNA non risultavano significativi per la *CHIA* e il *CTBS* (Figura 13 B-E-F), al contrario aumentavano significativamente sia per la *CHIT1* ($p<0.0001$ (Figura 13A), per la *CHI3L1* ($p<0.0001$) (Figura 13C) e diminuivano per *CHID1* ($p<0.01$) (Figura 13D).

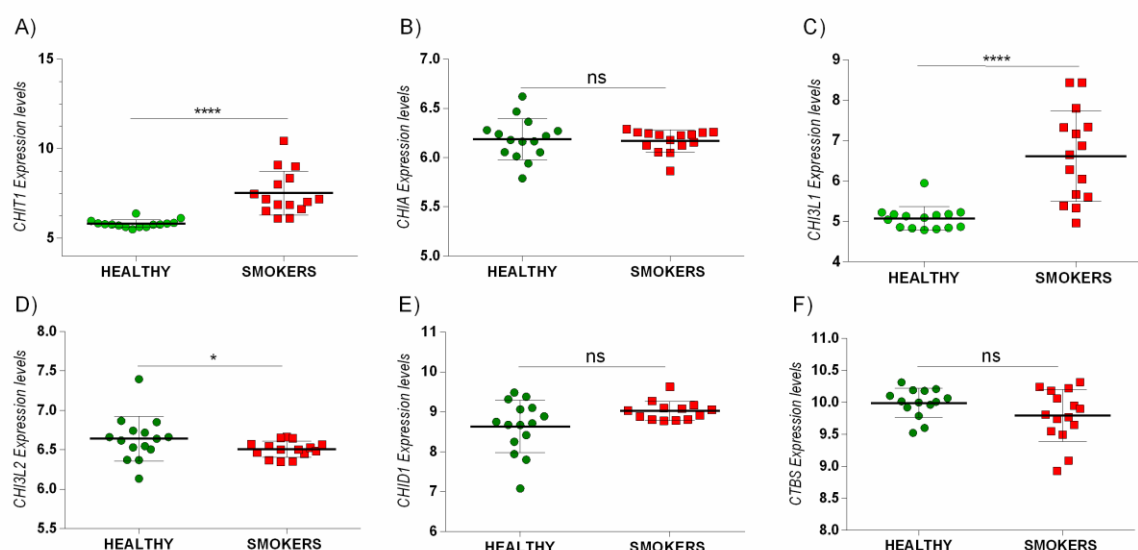


Figura 13: Espressione delle chitinasi nei macrofagi alveolari di soggetti fumatori.
Numero di accesso alla banca dati GSE2125.

Livelli di espressione delle chemochine nei macrofagi alveolari di soggetti fumatori

Il dataset GSE2125 è stato esplorato anche per i livelli di espressione delle chemochine.

I dati ottenuti hanno confermato che i livelli di espressione dell'mRNA di *CCL2* e *CXCL8* sono significativamente modulati nei soggetti fumatori rispetto ai non fumatori. Dati non significativi sono stati ottenuti per le rimanenti chemochine analizzate (Figura 14).

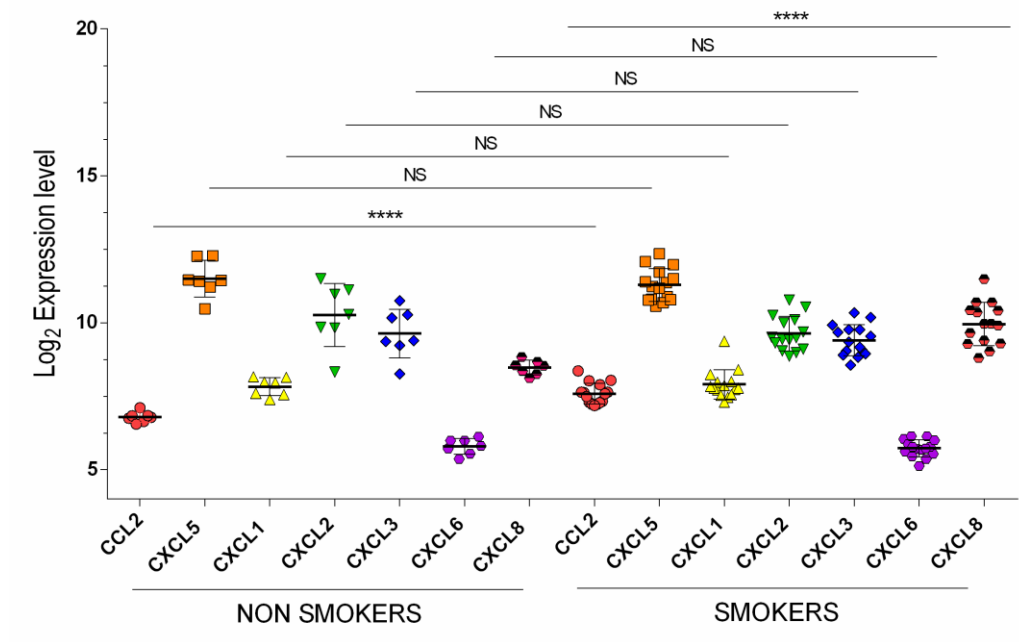


Figura 14: Espressione delle chemochine nei macrofagi alveolari di soggetti fumatori
Numero di accesso alla banca dati GSE2125.

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni le patologie del tratto respiratorio hanno avuto un notevole aumento. Le condizioni ambientali, come allergeni, inquinanti, smog e abitudini sociali come il fumo di sigarette, rappresentano tutt'oggi i principali sospettati. La ricerca di nuovi bio-marcatori di sofferenza del tratto respiratorio è oggi un obiettivo scientifico molto ambito.

Diversi studi hanno mostrato che le Chitinasi possono essere prodotte ad opera dei macrofagi alveolari. Il loro ruolo nel parenchima alveolare potrebbe essere riconducibile all'evoluzione di numerose patologie respiratorie. Nel 2010 Létuvé S. et al. ha dimostrato che, l'attività chitinolitica e i livelli di espressione della *CHIT1* aumentavano selettivamente nelle vie aeree di pazienti con BPCO contribuendo alla sua patogenesi e rappresentando un nuovo importante meccanismo coinvolto nell'insorgenza e nella progressione di questa patologia (58). In un recente studio del 2016, Tianwen Lai et al., ha constatato che anche la *CHI3L1* svolge un importante ruolo patogenetico nei pazienti con BPCO. Lo studio su questi pazienti ha evidenziato un aumento dell'espressione durante gli episodi di esacerbazione della malattia. L'ipotesi più accreditata è stata che la *CHI3L1* potesse giocare un ruolo direttamente sui fibroblasti, contribuendo al rimodellamento delle vie aeree (59).

Nel nostro studio sperimentale abbiamo arruolato un totale di 74 soggetti, di cui 49 esposti giornalmente ad agenti inquinanti per motivi occupazionali e 25 soggetti sani non esposti sistematicamente ad agenti inquinanti accertati. Dei soggetti arruolati abbiamo effettuato la *genotipizzazione* per il principale polimorfismo del gene *CHIT1* (ripetizione di 24bp nell'esone 10) al fine di verificare se la frequenza allelica potesse subire delle variazioni nei soggetti con un outcome negativo. La duplicazione di 24 pb del gene della *CHIT1* non ha mostrato variazione della frequenza allelica all'interno dei gruppi con condizioni patologiche riconducibili all'esposizione degli agenti inquinanti. La frequenza dell'intera popolazione reclutata ha confermato i numeri presenti in bibliografia: 52% omozigoti wild type (AA), 41% eterozigoti (Aa) e 7% omozigoti mutati (aa). La frequenza allelica ha trovato conferma nella misurazione dell'attività enzimatica

della CHIT1 nel plasma dei soggetti reclutati. Infatti, i soggetti omozigoti wild type esprimevano un'attività quasi doppia rispetto agli eterozigoti (Aa) e la rilevazione dell'attività negli omozigoti mutati (aa) risultava pressoché assente. Tutto questo era riconducibile al fatto che la presenza del polimorfismo di 24bp nell'esone 10 determina una perdita per la proteina dell'attività enzimatica. Alla luce di questi risultati, abbiamo verificato se l'attività enzimatica della CHIT1 fosse correlata con i principali dati clinici di laboratorio (RBC, WBC, PLT, glicemia, FVC, PEF, dosaggi urinari di idrossipirene e benzene) ottenuti dai soggetti reclutati. Nessun dato significativo è stato rilevato all'interno delle analisi effettuate, fatta eccezione per i livelli di piastrine che sembrerebbero essere correlati positivamente con i livelli di attività della CHIT1. Un dato a supporto dell'ipotesi che i due fenomeni siano collegati viene da uno studio del 2016 nel quale è stato visto che i lavoratori esposti per periodi brevi ai fumi di piombo presentavano un cambiamento morfologico e di numero dei leucociti e delle piastrine (60). Questo risultato potrebbe trovare una spiegazione nel ruolo, oramai ampiamente dimostrato, svolto dalla CHIT1 durante i processi di trasformazione e differenziamento cellulare (61, 62, 63).

Durante le nostre analisi è emerso che, nei soggetti fumatori esposti professionalmente, i valori del *Volume espiratorio massimo al secondo* (FEV1) (*indice di funzionalità polmonare*) subivano l'influenza della presenza del polimorfismo della CHIT1. I soggetti fumatori eterozigoti per il gene della *CHIT1* presentavano una migliore funzionalità polmonare rispetto ai soggetti omozigoti Wild Type. Questo dato sembrerebbe corroborare l'ipotesi che l'attività della CHIT1 potrebbe essere correlata con un incremento dei processi degenerativi e che il polimorfismo intervenga per spegnere l'esacerbazione dei processi flogistici. Effettuando un'analisi di comparazione dei livelli di attività enzimatica fra i soggetti esposti e non, con il medesimo genotipo, abbiamo riscontrato un aumento significativo nei soggetti esposti. Alla luce di questo risultato, ci siamo chiesti se un concentrato di agenti inquinanti come può essere la sigaretta potesse giocare un ruolo nella modulazione dell'espressione e per conseguenza dell'attività enzimatica della CHIT1. I dati ottenuti hanno dimostrato che non solo l'attività enzimatica della CHIT1 è influenzabile dal fumo di sigaretta ma

anche che, nei soggetti omozigoti wild type fumatori, è maggiore rispetto ai controlli fumatori con lo stesso genotipo. L'analisi ulteriore dei livelli del messaggero sia delle Chitinasi che delle Chitlectine nei PBMCs dei soggetti reclutati non ha mostrato risultati significativi. Questo dato potrebbe trovare una spiegazione nel fatto che la fonte di produzione delle chitinasi nei soggetti esposti ad agenti inquinanti potrebbe essere diversa e che la concentrazione delle molecole inquinanti siano più alte negli organi bersaglio. Inoltre, dai dati in bibliografia, è ampiamente dimostrato che l'espressione delle chitinasi è riconducibile alle cellule stanziali nelle regioni d'organo, come possono essere i polmoni, il fegato, le ossa, la cartilagine, il cervello (61, 64, 65, 66, 67, 68).

Al fine di dare una risposta esaustiva sull'effetto del benzene sulla modulazione dell'espressione delle Chitinasi, abbiamo deciso di trattare i PBMCs in vitro con un suo metabolita (l'1,2,4-Benzenetriol) conosciuto per le caratteristiche mielotossiche. Quando un soggetto è esposto al benzene, questo viene metabolizzato principalmente nel fegato dal citocromo P450 2E1 in ossido di benzene che, successivamente, è convertito in diversi metaboliti tra cui l'1,2,4-benzenetriolo (69). Dall'analisi dei livelli di espressione delle chitinasi nei PBMCs trattati con l'1,2,4-benzenetriolo è emerso che la *CHIT1* risultava essere down regolata in maniera statisticamente significativa. Questo risultato apparentemente contraddittorio potrebbe trovare una spiegazione nell'esposizione diretta e non sistematica delle cellule al metabolita. Probabilmente, un'esposizione continua potrebbe determinare una trasformazione cellulare con conseguente attivazione nei distretti locali come il parenchima alveolare e avere come conseguenza un incremento della CHIT1. Invece, un'esposizione iniziale ad alte dosi, potrebbe regolare diversamente la modulazione della CHIT1 nelle cellule presenti nel torrente circolatorio. L'analisi dei livelli di espressione delle citochine infiammatorie, ha confermato l'effetto tossico giocato dal'1,2,4-benzenetriolo sulle cellule. Infatti, è emerso che il *TNF α* , un fattore tipicamente pro-infiammatorio e necrotizzante coinvolto nell'infiammazione sistemica, veniva up regolato nei PBMCs trattati in vitro. L'espressione del *TNF α* seguiva un andamento contrario rispetto all'espressione sia della *CCL2* che della *CHIT1*. Le due molecole risultavano positivamente e significativamente correlate. Uno studio pubblicato nel

2016 correlava positivamente la CCL2 alla CHI3L1 in patologie come l'Alzheimer. A tutt'oggi, non esistono dati in bibliografia che testimoniano una correlazione tra i livelli di espressione della *CHIT1* e di *CCL2* (70).

Al fine di avere un quadro più completo sulla relazione di espressione intercorsa tra la *CHIT1* e la *CCL2*, abbiamo deciso di analizzare i livelli di espressione della famiglia delle chemochine (*CXCL5*, *CXCL1*, *CXCL3*, *CXCL6*, *CXCL8*, *CXCL2*). I risultati ottenuti hanno mostrato che tutte le chemochine analizzate risultavano essere negativamente correlate con l'espressione della *CHIT1* nei PBMCs trattati con l'1,2,4-benzenetriolo. Inoltre l'espressione del *TNF α* risultava positivamente correlato alle chemochine analizzate. Una spiegazione a questo evento potrebbe essere che l'esposizione al 1,2,4-benzenetriolo rappresenta un insulto pro-flogistico per i PBMCs e che le molecole trasformanti come *CHIT1* e *CCL2* subiscano una deregolazione solo nella fase iniziale. È molto probabile che un'esposizione sistematica al metabolita potrebbe portare le cellule verso una linea cronica infiammatoria, con la conseguente regolazione positiva questa volta sia della *CHIT1* che di *CCL2*.

I nostri dati hanno dimostrato che, l'attività enzimatica della *CHIT1* rimane, comunque, maggiore negli esposti rispetto ai controlli. L'ipotesi è che, mutando il parenchima alveolare, in seguito ad un insulto cronico, i monociti da sangue periferico, giungendo in prossimità del parenchima alveolare ed entrando in contatto con l'inquinante ambientale, maturano trasformandosi in macrofagi alveolari ed aumentando la sintesi della *CHIT1* e quindi la sua attività.

Quando inizia un fenomeno cronicizzante, determinato da un'esposizione continua ad un dato agente, non si ha più un effetto periferico sui PBMCs ma un'azione di tipo tissutale e, nella fattispecie, a livello degli alveoli polmonari; quindi probabilmente in sede centrale, nei macrofagi alveolari esposti cronicamente ad un agente inquinante, l'espressione delle chitinasi risulta essere diversa.

In mancanza dei macrofagi alveolari ottenibili tramite lavaggio bronco alveolare (BAL), abbiamo analizzato un dataset microarray, al fine di poter dare una risposta alle nostre ipotesi. I soggetti

reclutati per questo dataset erano esposti ad un insulto classico come il fumo di sigaretta. L'aumento nei soggetti fumatori dei livelli di espressione dell'mRNA della *CHIT1* e della *CHI3L1*, nonché della chemochina infiammatoria *CCL2*, hanno confermato la nostra ipotesi e cioè che le chitinasi giocano due ruoli separati nei PBMCs e nelle cellule immunitarie dei diversi distretti tissutali, come lo sono i macrofagi alveolari.

L'infiammazione cronica è un processo flogistico di lunga durata in cui coesistono l'infiammazione attiva, la distruzione tissutale e i tentativi di riparazione da parte del sistema immunitario.

Concludendo, nei soggetti cronicamente esposti l'aumento dei livelli di espressione dell'mRNA e dell'attività enzimatica della *CHIT1* potrebbero influenzare in maniera negativa lo stato di salute di soggetti giornalmente esposti ad agenti inquinanti, mentre la variante allelica omozigote del gene mutato potrebbe prevenire l'insorgenza di malattie respiratorie ambientali ed evitare l'esacerbazione dell'attivazione dell'immunità innata nel parenchima alveolare.

Poter individuare un marker plasmatico con valore prognostico rappresenta, tutt'oggi, un obiettivo da raggiungere; ulteriori studi sono necessari per una completa comprensione del ruolo della *CHIT1* all'interno delle patologie respiratorie, così da poter essere considerata, in un prossimo futuro, una molecola target per il trattamento naturale o farmacologico delle suddette malattie, attraverso la modulazione della sua attività enzimatica.

Abbreviazioni

CHIT1: chitotriosidase,
CHIA: acid mammalian chitinase
CHI3L1: chitinase 3-like-1
CHI3L2: chitinase 3-like- 2
OVGP1 Oviductal Glycoprotein 1
CHID1 o SI-CLP : chitinase domain-containing 1
TNF α : Tumor Necrosis Factor- α
CCL2: C-C motif chemokine ligand 2
BAL: lavaggio bronco alveolare
PBMCs: cellule polimorfo nucleate del sangue periferico

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. Muzzarelli R. A.A., Boudrant, J. Meyer D., Manno N., DeMarchis M., Paoletti M. G. (2012); Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydrate Polymers*, Volume 87, Issue 2, 15, Pages 995-1012.
2. Merzendorfer H, Zimoch L.(2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol.* 206(Pt 24):4393-412. Review.
3. Raafat D, Sahl HG (2009); Chitosan and its antimicrobial potential--a critical literature survey. *Microb Biotechnol* ;2(2):186-201.
4. Muanprasat C, Chatsudthipong V. (2017); Chitosan oligosaccharide: Biological activities and potential therapeutic applications. *Pharmacol Ther*; 170:80-97, Review.
5. Henrissat, B. & Bairoch, A. (1993); New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 293 (Pt 3), 781-8.
6. Kasprzewska A. (2003); Plant chitinases--regulation and function. *Cell Mol Biol Lett.*; 8(3):809-24. Review.
7. Rathore AS, Gupta RD. (2015); Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives. *Enzyme Res*; 2015:791907. Review.
8. Huang QS, Xie XL, Liang G, Gong F, Wang Y, Wei XQ, Wang Q, Ji ZL, Chen QX. (2012); The GH18 family of chitinases: their domain architectures, functions and evolutions. *Glycobiology*, 22(1):23-34.
9. Kuranda MJ, Robbins PW. (1991); Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*;266(29):19758-67.
10. Gooday GW. (1999) Aggressive and defensive roles for chitinases. *EXS*;87:157-69. Review.
11. Hussain M, Wilson JB. (2013); New paralogues and revised time line in the expansion of the vertebrate GH18 family. *J Mol Evol* ;76(4):240-60.
12. Bussink AP, Speijer D, Aerts JM, Boot RG. (2007); Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. *Genetics*.;177(2):959-70.
13. Terwisscha van Scheltinga AC, Hennig M, Dijkstra BW. (1996); The 1.8 Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18. *J Mol Biol.* 262(2):243-57.
14. Fusetti F, von Moeller H, Houston D, Rozeboom HJ, Dijkstra BW, Boot RG, Aerts JM, Van Aalten DM. (2002); Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *J Biol Chem.* 277(28):25537-44.

15. Funkhouser JD, Aronson NN Jr. (2007); Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evol Biol.* 7:96.
16. Watanabe T, Kobori K, Miyashita K, Fujii T, Sakai H, Uchida M, Tanaka H. (1993); Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. *J Biol Chem.* 268(25):18567-72.
17. Boot RG, Blommaert EF, Swart E, Ghauharali-van der Vlugt K, Bijl N, Moe C, Place A, Aerts JM. (2001); Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J Biol Chem.* 276(9):6770-8.
18. Van Aalten DM, Komander D, Synstad B, Gåseidnes S, Peter MG, Eijsink VG. (2001); Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 98(16):8979-84.
19. Kognole AA, Payne CM. (2017); Inhibition of Mammalian Glycoprotein YKL-40: Identification of the physiological ligand. *J Biol Chem.*;292(7):2624-2636. doi: 10.1074/jbc.M116.764985.
20. Elieh Ali Komi D, Sharma L, Dela Cruz CS.(2017); Chitin and Its Effects on Inflammatory and Immune Responses. *Clin Rev Allergy Immunol.*
21. Boot RG, Renkema GH, Verhoek M, Strijland A, Blik J, de Meulemeester TM, Mannens MM, Aerts JM. (1998); The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem.* 273(40):25680-5.
22. Boot RG, Renkema GH, Strijland A, van Zonneveld AJ, Aerts JM. (1995); Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem.*270(44):26252-6.
23. Di Rosa M, Malaguarnera G, De Gregorio C, D'Amico F, Mazzarino MC, Malaguarnera L. (2013); Modulation of chitotriosidase during macrophage differentiation. *Cell Biochem Biophys.* 66(2):239-47.
24. Di Rosa M, Distefano G, Zorena K, Malaguarnera L. (2016) Chitinases and immunity: Ancestral molecules with new functions. *Immunobiology.* 221(3):399-411. Review.
25. Renkema GH, Boot RG, Strijland A, Donker-Koopman WE, van den Berg M, Muijsers AO, Aerts JM. (1997); Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase. *Eur J Biochem.*244(2):279-85.
26. Malaguarnera L, Simporè J, Prodi DA, Angius A, Sassu A, Persico I, Barone R, Musumeci S. (2003); A 24-bp duplication in exon 10 of human chitotriosidase gene from the sub-Saharan to the Mediterranean area: role of parasitic diseases and environmental conditions. *Genes Immun.* 4(8):570-4.
27. Di Rosa M, Malaguarnera L. (2016); Chitotriosidase: A New Inflammatory Marker in Diabetic Complications. *Pathobiology.* 83(4):211-9. Review.

28. Boven LA, van Meurs M, Boot RG, Mehta A, Boon L, Aerts JM, Laman JD. (2004); Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *Am J Clin Pathol.* 122(3):359-69.
29. Di Rosa M, Dell'Ombra N, Zambito AM, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. (2006); Chitotriosidase and inflammatory mediator levels in Alzheimer's disease and cerebrovascular dementia. *Eur J Neurosci.* 23(10):2648-56.
30. Boot RG, van Achterberg TA, van Aken BE, Renkema GH, Jacobs MJ, Aerts JM, deVries CJ. (1999); Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis: chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;19(3):687-94.
31. Kurt I, Abasli D, Cihan M, Serdar MA, Olgun A, Saruhan E, Erbil MK. (2007); Chitotriosidase levels in healthy elderly subjects. *Ann N Y Acad Sci.* 1100:185-8.
32. Artieda M, Cenarro A, Gañán A, Jericó I, Gonzalvo C, Casado JM, Vitoria I, Puzo J, Pocoví M, Civeira F. (2003); Serum chitotriosidase activity is increased in subjects with atherosclerosis disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(9):1645-52.
33. Malaguarnera L, Di Rosa M, Zambito AM, dell'Ombra N, Di Marco R, Malaguarnera M. (2006); Potential role of chitotriosidase gene in nonalcoholic fatty liver disease evolution. *Am J Gastroenterol.* 101(9):2060-9.
34. Ober C, Chupp GL.(2009); The chitinase and chitinase-like proteins: a review of genetic and functional studies in asthma and immune-mediated diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 9(5):401-8. Review.
35. Bierbaum S, Nickel R, Koch A, Lau S, Deichmann KA, Wahn U, Superti-Furga A, Heinzmann (2005); A. Polymorphisms and haplotypes of acid mammalian chitinase are associated with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med.*172(12):1505-9.
36. Ohno M, Kimura M, Miyazaki H, Okawa K, Onuki R, Nemoto C, Tabata E, Wakita S, Kashimura A, Sakaguchi M, Sugahara Y, Nukina N, Bauer PO, Oyama F. (2016); Acidic mammalian chitinase is a proteases-resistant glycosidase in mouse digestive system. *Sci Rep.* 2016 Nov 24;6:37756.
37. Musumeci M, Bellin M, Maltese A, Aragona P, Bucolo C, Musumeci S. (2008); Chitinase levels in the tears of subjects with ocular allergies. *Cornea*;27(2):168-73.
38. Adrangi S, Faramarzi MA.(2013) From bacteria to human: a journey into the world of chitinases. *Biotechnol Adv.* 31(8):1786-95. Review.
39. Zhu Z, Zheng T, Homer RJ, Kim YK, Chen NY, Cohn L, Hamid Q, Elias JA. (2004); Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science.* 11;304(5677):1678-82.
40. Johansen JS, Jensen BV, Roslind A, Nielsen D, Price PA. (2006); Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15(2):194-202. Review.

41. Di Rosa M, Tibullo D, Saccone S, Distefano G, Basile MS, Di Raimondo F, Malaguarnera L.(2015); CHI3L1 nuclear localization in monocyte derived dendritic cells. *Immunobiology*. 221(2):347-56.
42. Eurich K, Segawa M, Toei-Shimizu S, Mizoguchi E.(2009); Potential role of chitinase 3-like-1 in inflammation-associated carcinogenic changes of epithelial cells. *World J Gastroenterol*.15(42):5249-59. Review.
43. Hinsinger G, Galéotti N, Nabholz N, Urbach S, Rigau V, Demattei C, Lehmann S, Camu W, Labauge P, Castelnovo G, Brassat D, Loussouarn D, Salou M, Laplaud D, Casez O, Bockaert J, Marin P, Thouvenot E. (2015); Chitinase 3-like proteins as diagnostic and prognostic biomarkers of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 21(10):1251-61.
44. Choi J, Lee HW, Suk K. (2011); Plasma level of chitinase 3-like 1 protein increases in patients with early Alzheimer's disease. *J Neurol*. 258(12):2181-5.
45. Rehli M, Niller HH, Ammon C, Langmann S, Schwarzfischer L, Andreesen R, Krause SW. (2003); Transcriptional regulation of CHI3L1, a marker gene for late stages of macrophage differentiation. *J Biol Chem*. 278(45):44058-67.
46. Erzin Y, Uzun H, Karatas A, Celik AF.(2008); Serum YKL-40 as a marker of disease activity and stricture formation in patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*.;23(8 Pt 2):e357-62.
47. Vind I, Johansen JS, Price PA, Munkholm P.(2003); Serum YKL-40, a potential new marker of disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Scand Gastroenterol*.;38(6):599-605.
48. Ranok A, Khunkaewla P, Suginta W. (2013); Human cartilage chitinase 3-like protein 2: cloning, expression, and production of polyclonal and monoclonal antibodies for osteoarthritis detection and identification of potential binding partners. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 32(5):317-25.
49. Kzhyshkowska J, Mamidi S, Gratchev A, Kremmer E, Schmuttermayr C, Krusell L, Haus G, Utikal J, Schledzewski K, Scholtze J, Goerd S. (2006); Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway. *Blood*. 107(8):3221-8.
50. Wilson WE, Chow JC, Claiborn C, Fusheng W, Engelbrecht J, Watson JG. (2002); Monitoring of particulate matter outdoors. *Chemosphere*. 49(9):1009-43.Review.
51. Sioutas C, Delfino RJ, Singh M. (2005); Exposure assessment for atmospheric ultrafine particles (UFPs) and implications in epidemiologic research. *Environ Health Perspect*. 113(8):947-55. Review.
52. Xu X, Liao W, Lin Y, Dai Y, Shi Z, Huo X. (2017); Blood concentrations of lead, cadmium, mercury and their association with biomarkers of DNA oxidative damage in preschool children living in an e-waste recycling area. *Environ Geochem Health*.
53. Diggs DL, Huderson AC, Harris KL, Myers JN, Banks LD, Rekhadevi PV, Niaz MS, Ramesh A.(2011); Polycyclic aromatic hydrocarbons and digestive tract cancers: a

- perspective. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 29(4):324-57. Review.
54. Kooltheat N, Sranujit RP, Chumark P, Potup P, Laytragoon-Lewin N, Usuwanthim K. (2014); An ethyl acetate fraction of *Moringa oleifera* Lam. Inhibits human macrophage cytokine production induced by cigarette smoke. *Nutrients.* 6(2):697-710.
 55. Eurostat Statistics Explained
http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Causes_of_death_statistics/it
 56. Lee YJ, Lim YW, Yang JY, Kim CS, Shin YC, Shin DC. (2011); Evaluating the PM damage cost due to urban air pollution and vehicle emissions in Seoul, Korea. *J Environ Manage.* 92(3):603-9.
 57. Malaguarnera L, Ohazuruike LN, Tsianaka C, Antic T, Di Rosa M, Malaguarnera M. (2010); Human chitotriosidase polymorphism is associated with human longevity in Mediterranean nonagenarians and centenarians. *J Hum Genet.* 2010 Jan;55(1):8-12.
 58. Létuvé S, Kozhich A, Humbles A, Brewah Y, Dombret MC, Grandsaigne M, Adle H, Kolbeck R, Aubier M, Coyle AJ, Pretolani M. (2010); Lung chitinolytic activity and chitotriosidase are elevated in chronic obstructive pulmonary disease and contribute to lung inflammation. *Am J Pathol.* 176(2):638-49.
 59. Lai T, Wu D, Chen M, Cao C, Jing Z, Huang L, Lv Y, Zhao X, Lv Q, Wang Y, Li D, Wu B, Shen H. (2016); YKL-40 expression in chronic obstructive pulmonary disease: relation to acute exacerbations and airway remodeling. *Respir Res.* 17:31.
 60. Dobrakowski M, Boroń M, Czuba ZP, Birkner E, Chwalba A, Hudziec E, Kasperczyk S. (2016); Blood morphology and the levels of selected cytokines related to hematopoiesis in occupational short-term exposure to lead. *Toxicol Appl Pharmacol.*;305:111-7.
 61. Di Rosa M, Tibullo D, Cambria D, Distefano G, Saccone S, Di Raimondo F, Malaguarnera L. (2015); Chitotriosidase Expression during Monocyte-Derived Dendritic Cells Differentiation and Maturation. *Inflammation.*;38(6):2082-91.
 62. Di Rosa M, Tibullo D, Vecchio M, Nunnari G, Saccone S, Di Raimondo F, Malaguarnera L. (2014); Determination of chitinases family during osteoclastogenesis. *Bone*;61:55-63.
 63. Di Rosa M, De Gregorio C, Malaguarnera G, Tuttobene M, Biazzo F, Malaguarnera L. (2013); Evaluation of AMCase and CHIT-1 expression in monocyte macrophages lineage. *Mol Cell Biochem.*;374(1-2):73-80.
 64. Di Rosa M, Szychlinska MA, Tibullo D, Malaguarnera L, Musumeci G. (2014); Expression of CHI3L1 and CHIT1 in osteoarthritic rat cartilage model. A morphological study. *Eur J Histochem.*;58(3):2423.
 65. Di Rosa M, Mangano K, De Gregorio C, Nicoletti F, Malaguarnera L. (2013); Association of chitotriosidase genotype with the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res.*;43(3):267-75.

66. Sanfilippo C, Malaguarnera L, Di Rosa M. (2016); Chitinase expression in Alzheimer's disease and non-demented brains regions. *J Neurol Sci.*;369:242-249.
67. Pizano-Martínez O, Yañez-Sánchez I, Alatorre-Carranza P, Miranda-Díaz A, Ortiz-Lazareno PC, García-Iglesias T, Daneri-Navarro A, Vázquez-Del Mercado M, Fafutis-Morris M, Delgado-Rizo V. (2011); YKL-40 expression in CD14⁺ liver cells in acute and chronic injury. *World J Gastroenterol.*;17(33):3830-5.
68. Furuhashi K, Suda T, Nakamura Y, Inui N, Hashimoto D, Miwa S, Hayakawa H, Kusagaya H, Nakano Y, Nakamura H, Chida K. (2010); Increased expression of YKL-40, a chitinase-like protein, in serum and lung of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med.*;104(8):1204-10.
69. Miyahara E, Nishikawa T, Takeuchi T, Yasuda K, Okamoto Y, Kawano Y, Horiuchi M. (2014); Effect of myeloperoxidase inhibition on gene expression profiles in HL-60 cells exposed to 1,2,4,-benzenetriol. *Toxicology*;317:50-7.
70. Melah KE, Lu SY, Hoscheidt SM, Alexander AL, Adluru N, Destiche DJ, Carlsson CM, Zetterberg H, Blennow K, Okonkwo OC, Gleason CE, Dowling NM, Bratzke LC, Rowley HA, Sager MA, Asthana S, Johnson SC, Bendlin BB. (2016); Cerebrospinal Fluid Markers of Alzheimer's Disease Pathology and Microglial Activation are Associated with Altered White Matter Microstructure in Asymptomatic Adults at Risk for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.*;50(3):873-86.