RELAZIONE FINALE SULL'ATTIVITA' SVOLTA DURANTE LA SHORT TERM MOBILITY 2011 – MARCO GIRASOLE

La mia missione, supportata dal programma STM 2011, si è svolta presso il dipartimento di fisica della materia vivente dell'EPFL di Losanna (CH) sotto la supervisione dei professori Giovanni Dietler e Sandor Kasas che, oltre al prezioso contributo in termini di sostegno e discussione, hanno garantito l'accesso alle facilities e strumentazioni necessarie all'esecuzione degli esperimenti.

Il principale obiettivo dello studio consiste nell'indagine dell'invecchiamento dei globuli rossi mantenuti in condizioni ambientali normali oppure di microgravità. Presso l'istituzione ospitante, infatti, è operante uno strumento (detto RPM – Random Position Machine) che, eseguendo una rotazione tridimensionale del campione su due assi indipendenti e basandosi sul principio della media del vettore gravità, è di fatto in grado di esporre i campioni a condizioni di gravità simili a quelle che si realizzano nella stazione spaziale internazionale (ISS).

Lo studio è motivato da diverse considerazioni generali:

Gli eritrociti hanno una notevole importanza fisiologica e la loro funzionalità è collegata con lo stato di invecchiamento cellulare, per cui acquisire informazioni su questo fenomeno è di chiara importanza. Inoltre, negli anni trascorsi io ed il mio gruppo abbiamo sviluppato metodologie specifiche per investigare l'integrità strutturale dei globuli rossi e la sua relazione con la funzionalità delle cellule mediante analisi di parametri morfologici. Queste nuove metodologie, in particolare, si sono dimostrate efficaci per studiare stati patologici ma anche per caratterizzare il percorso di invecchiamento di queste cellule in condizioni controllate. Evidentemente, l'esperimento in condizioni di microgravità rappresenta l'estensione di quanto precedentemente osservato in condizioni ambientali particolari.

Ulteriori motivi di interesse sono legati al fatto che le caratteristiche meccaniche dei globuli rossi sono assolutamente peculiari e sono intrinsecamente correlate con la loro funzionalità ed inoltre le sollecitazioni meccaniche costituiscono un determinante funzionale che contribuisce a regolare il metabolismo eritrocitario. In questo contesto, le diverse condizioni ambientali derivanti dalla permanenza in microgravità sono attese causare differenti sollecitazioni di natura meccanica sulle cellule e, pertanto, questo studio appare particolarmente prezioso anche per investigare le caratteristiche di mecano-trasduzione degli stimoli da parte di queste cellule.

Infine, vale la pena sottolineare l'ovvio l'interesse dell'esperimento proposto per le scienze dello spazio. Infatti è stato studiato il comportamento di diverse linee cellulari in condizioni di

microgravità ed i risultati ottenuti hanno consentito di comprendere alcuni aspetti delle alterazioni funzionali e dei meccanismi adattativi che hanno luogo negli esseri viventi mantenuti in condizioni ambiente extra planetarie. Gli eritrociti, tuttavia, non sono stati oggetto di precedenti indagini specifiche sebbene sia noto fin dai primi voli extraterrestri della durata di pochi giorni che il metabolismo del sangue subisce un notevole riarrangiamento che determina stati transienti di anemia di carattere, apparentemente, pseudo-fisiologico.

Lo schema sperimentale seguito durante la mia permanenza nel laboratorio di fisica della materia vivente dell'EPFL è descritto nel seguito.

Sono state realizzate 3 serie di esperimenti della durata temporale di almeno 9-10 giorni ciascuna: in tutte le serie di misure sono stati analizzati diversi aspetti e diverse conseguenze dell'invecchiamento che, messi insieme, possono consentire di proporre un panorama coerente sullo stato cellulare ad ogni tempo di campionamento scelto. In particolare i diversi parametri cellulari misurati si possono dividere in due grandi famiglie: parametri morfologici e nano-meccanici (da investigare essenzialmente con microscopia a forza atomica) oppure parametri biochimici. Questi ultimi, studiati essenzialmente mediante tecniche spettroscopiche o immunochimiche, includono la determinazione dell'ATP intra- ed extracellulare, la misura dell'esposizione di acidi sialici all'esterno della membrana e la misura dello spettro di assorbimento dell'emoglobina intracellulare. I parametri morfologici sono importanti perché rendono ragione dell'integrità strutturale del membrano-scheletro ed individuano la presenza di specifici marcatori morfologici cellulari che consentono di valutare la progressione dell'invecchiamento cellulare ed, in questo contesto, gioca un ruolo essenziale la simultanea misura delle proprietà nano-meccaniche (e.g. misura e mappatura del modulo di Young) delle cellule in funzione del loro stato di invecchiamento.

I diversi parametri biochimici considerati, d'altro canto, consentono di monitorare aspetti diversi del metabolismo che a loro volta si correlano con la funzionalità e con la degradazione cellulare. Ad esempio la quantità di acidi sialici (tra i pochi residui carichi negativamente presenti sulla membrana esterna) è stata precedentemente osservata diminuire via via che la cellula invecchia e si può utilizzare come un parametro indipendente ed oggettivo per misurare la specifica età cellulare. Il ruolo dell'ATP, invece, è fondamentale per tutte le attività dei globuli rossi e svolge un ruolo, a diversi livelli, nella regolazione dei meccanismi di trasduzione delle sollecitazioni meccaniche e nella mediazione delle interazioni meccaniche delle cellule con l'ambiente naturale circostante. Per questo motivo la misura dell'ATP intra ed extracellulare è utile per la comprensione delle relazioni tra la risposta cellulare e le sollecitazioni meccaniche da essa subite. La misura delle caratteristiche dell'emoglobina, invece, fornisce una indicazione dello stato di integrità della più importante

proteina intracellulare dei globuli rossi ed il cui stato di ossidazione e funzionalità è un altro dei principali determinanti dell'invecchiamento cellulare.

Inoltre, particolare attenzione è stata dedicata al monitoraggio ed alla quantificazione della presenza di lisi cellulare in tutte le situazioni sperimentali investigate.

Infine va sottolineato che, durante tutte e tre le serie di misure, è stato curato anche lo sviluppo e l'ottimizzazione di metodi di preparazione dei campioni che consentissero di incrementare il grado di adesività di eritrociti vitali su un supporto opportuno per le misure di microscopia AFM. Questa attenzione è giustificata dal desiderio di analizzare, sotto il profilo morfologico, le principali fasi del percorso di invecchiamento eseguendo esperimenti su cellule vive. Tuttavia, una delle principali caratteristiche naturali degli eritrociti è che queste cellule vivono esclusivamente in sospensione nel liquido fisiologico e, di conseguenza, realizzare una metodica per farli aderire energicamente ad un substrato rappresenta una sfida di notevole complessità. In particolare nel corso della mia permanenza sono stati testati diversi protocolli basati sull'impiego di vari tipi di cross-linker (APTES, polilisina, plasma) e su vari tipi (silicio, vetro, piastre Petri etc.) e metodiche di trattamento dei supporti. I risultati, in termini di numero di cellule adese, sono stati piuttosto eterogenei e dipendenti dallo stadio di invecchiamento cellulare. Per questo motivo ulteriori approcci sono attualmente in corso di svolgimento, anche se va sottolineato che alcune buone preparazioni sono state ottenute in diverse condizioni sperimentali. Questo aspetto dello studio è chiaramente orientato alla ottimizzazione delle metodiche di preparazione in previsione di ulteriori future sessioni sperimentali sui medesimi campioni.

Nella prima serie di misure sono state misurate le curve di invecchiamento standard delle cellule mantenute in condizioni di gravità normale ed in condizioni di microgravità ed è stata valutata la reversibilità degli effetti osservati, sia in termini morfologici che biochimici, mediante incubazione in una opportuna soluzione rivitalizzante a tempi di invecchiamento stabiliti. Il tutto è stato confrontato con quanto si osserva in un campione conservato in presenza di abbondante quantità di glucosio. Per la scelta dei tempi di rivitalizzazione è stata preziosa l'esperienza precedentemente maturata nello studio di questi sistemi e di queste tematiche anche se questa prima tornata di esperimenti è stata condotta a temperatura ambiente mentre gli studi eseguiti dal mio gruppo negli anni scorsi erano state condotti a 4 °C. Pertanto, è stato necessario valutare la dipendenza dei parametri morfologici e biochimici di invecchiamento dalla temperatura.

I campioni di controllo sono stati alloggiati in condizioni di gravità normale su un roto-traslattore capace di muoverli sul piano X-Y a velocità selezionabile (tipicamente circa un ciclo al secondo) e sono stati mantenuti, ovviamente, alla medesima temperatura di quelli in microgravità.

Come precedentemente sottolineato nella prima serie di misure, così come in tutte le altre, sono stati prodotti campioni per analisi biochimiche (da eseguirsi *in house* a fine missione) per la determinazione dell'ATP intracellulare ed extracellulare, per la valutazione degli acidi sialici e misure ottiche per la valutazione dello stato di invecchiamento e funzionalità dell'emoglobina. Ognuna di queste misure ha richiesto uno specifico pre-trattamento dei campioni per purificare le componenti desiderate (es. una frazione di lisato cellulare contenente l'ATP intra- oppure extracellulare) che sono poi state conservate a -80 gradi per consentire una più pratica caratterizzazione dei preparati.

Sotto il profilo morfologico, invece, sono stati prodotti vetrini di globuli rossi essiccati per successive analisi morfologiche da eseguire mediante AFM e, nella sede del laboratorio ospitante, sono state svolti una serie di test preliminari alla realizzazione di misure di globuli rossi in condizioni fisiologiche. A tempi selezionati sono state anche prodotti campioni di cellule fissate in soluzioni di paraformaldeide o glutaraldeide che consentiranno la realizzazione di misure morfologiche e nano-meccaniche in liquido sui campioni che verranno identificati come i più interessanti utilizzando la strumentazione AFM presente a Losanna che presenta caratteristiche tecniche di assoluta eccellenza.

La prima tornata di misure, sfortunatamente, è stata influenzata da un iniziale malfunzionamento dello strumento RPM che ha causato una interruzione della rotazione dell'apparecchio per un tempo non noto ma verosimilmente quantificabile in parecchie ore. Per questo motivo la prima serie di esperimenti è stata sostanzialmente dedicata a raffinare ed ottimizzare le metodiche di trattamento dei campioni ed i metodi di estrazione e purificazione dei prodotti richiesti per le analisi biochimiche e biofisiche.

Tutta la serie di campioni per le analisi morfologiche e biochimiche è stata prodotta a vari tempi di invecchiamento: in particolare nella prima serie di esperimenti sono stati valutati i parametri cellulari al tempo iniziale (t_0), dopo 4 giorni, 5 giorni, 8 giorni e dopo 13 giorni.

Nella seconda serie di misure, anch'essa svolta a temperatura ambiente e con campionamenti temporali sostanzialmente analoghi alla prima, oltre alla riproposizione dei campioni del primo run di misure abbiamo rivolto attenzione anche ad eritrociti trattati con farmaci che interagiscono in vario modo con la cascata della mecano-trasduzione del segnale.

Il rationale dell'approccio è basato sul fatto che le differenze nelle sollecitazioni meccaniche subite dalle cellule in condizioni normali e di microgravità possono essere, in linea di principio, compensate oppure amplificate interferendo con vari effettori della cascata della trasduzione meccanica dei segnali. Questa metodologia, inoltre, può consentire anche di comprendere se ci

sono, ed eventualmente quali sono, le vie metaboliche maggiormente sollecitate in queste condizioni sperimentali.

Specificamente, in questa seconda serie di misure si è considerato l'utilizzo di farmaci come la glibenclamide ed il carbenoxolone che influenzano il rilascio dell'ATP intracellulare in risposta a stimolazioni meccaniche. In effetti il loro meccanismo di azione agisce direttamente (carbenoxolone) oppure indirettamente (tramite inibizione dei regolatori CFTR) sulla pannessina I, che è il principale canale di membrana responsabile del rilascio di ATP. Pertanto l'inibizione del rilascio di ATP dovrebbe preservare struttura e funzionalità cellulare ma soprattutto, in questo contesto, rappresenta un meccanismo che interferisce con le variazioni di sollecitazioni meccaniche indotte dalla differenza di gravità.

Per la verità, i dati osservati durante l'esecuzione dell'esperimento riguardo l'uso dei farmaci hanno evidenziato una significativa stimolazione della lisi cellulare per conseguenza del trattamento. L'incremento della lisi si è osservato già ai primi tempi di incubazione ed è cresciuta più o meno linearmente con il tempo e, trattandosi di un effetto non prevedibile, è stato attribuito in prima ipotesi all'impiego di una concentrazione troppo elevata di farmaco.

Nella terza serie di misure sono state introdotte alcune variazioni sulle modalità di espletamento delle misure. In particolare le cellule sono state mantenute in condizioni di ematocrito più basso (10 o 20%) rispetto alle precedenti serie di misure (40%) ed il rotatore tridimensionale RPM che realizza le condizioni di microgravità è stato implementato con successo in un refrigeratore che garantisce la possibilità di eseguire l'esperimento ad una temperatura controllata di 4 °C. Inoltre sono state realizzate due serie distinte di controlli (anch'essi conservati a 4 gradi): una serie è stata mantenuta in condizioni statiche il più possibile imperturbate in modo da minimizzare le sollecitazioni meccaniche subite dalle cellule, mentre una seconda serie di controlli è stata mantenuta in agitazione sul solito movimentatore a velocità costante (circa una rototraslazione sul piano X-Y al secondo).

Infine è stata riconsiderata la modalità di esecuzione degli esperimenti con i farmaci che sono stati aumentati di numero e variati in concentrazione utilizzata. Specificamente, sono stati impiegati i seguenti farmaci: glibenclamide (20 µM); carbenoxolone (20 µM); dipiridamolo (20 µM) e probenecid (2 mM) che sono stati usati sia da soli che in combinazione (glibenclamide + carbenoxolone) e (dipiridamolo + probenecid). Il rationale di queste misure è ancora quello di estendere l'indagine sulle conseguenze di una interferenza con la cascata della mecano-trasduzione del segnale. In questo caso, oltre ai già menzionati glibenclamide e carbenoxolone che inibiscono il rilascio di ATP interferendo con i CFTR e con la pannessina I, abbiamo considerato anche il

probenecid ed il dipiridamolo che sono, rispettivamente, uno stimolatore ed un inibitore dell'attività delle proteine G. Queste ultime sono i più precoci mediatori biochimici della meccano-trasduzione la cui attività distribuisce il segnale proveniente dallo stimolo meccanico su una varietà di vie metaboliche. In termini di ATP (il parametro che noi misuriamo) il probenecid dovrebbe condurre ad un incremento del rilascio di ATP mentre il dipiridamolo ad una diminuzione.

Vale la pena segnalare che, parallelamente all'esperimento principale, è stato anche condotto un esperimento sul solo effetto morfologico dei farmaci derivante da una incubazione delle cellule per circa 90' a temperatura ambiente e gravità normale.

I tempi considerati in questa terza tornata di misure sono i seguenti: tempo zero (t_0); dopo un giorno; dopo 2 giorni; dopo 5 giorni e dopo 9 giorni di incubazione. In queste condizioni le osservazioni fatte durante l'esecuzione degli esperimenti hanno mostrato un effetto di lisi cellulare abbastanza nella norma e comunque molto ridotto rispetto a quello della seconda serie di esperimenti, confermando pertanto che le concentrazioni di farmaci impiegate in questa terza tornata di misure sono ragionevolmente adatte per uno studio con prospettive fisiologiche.

Alla data della stesura della presente relazione alcune caratterizzazioni *in house* dei campioni riportati in sede sono state eseguite. In particolare il primo screening dei dati morfologici, condotto con microscopia ottica convenzionale, ha consentito di evidenziare il corretto progresso del pattern di invecchiamento sia in condizioni di gravità normale che di microgravità. Effetti significativi si possono individuare ed associare all'uso dei diversi farmaci che sono stati impiegati nel secondo e terzo run di misure per interferire con la regolazione del processo di invecchiamento. Infine, va sottolineato che i dati morfologici preliminari osservati hanno evidenziato una comprensibile accelerazione del pattern di invecchiamento quando i campioni sono stati incubati a temperatura ambiente anziché, come di consueto, a 4 °C. Di questo effetto si è dovuto, e si dovrà, tener conto quando si vorranno confrontare tra loro dati ottenuti nei tre diversi run di misura ma anche quando tutti questi nuovi dati si vorranno confrontare con i risultati presenti nel nostro archivio storico.

Un altro aspetto preliminarmente analizzato è quello della determinazione della quantità di lisato presente nei campioni in funzione del trattamento effettuato (controlli o trattati con farmaci sia a gravità normale che in microgravità) e del tempo di invecchiamento. Questo dato rappresenta una misura indipendente del grado di sofferenza cui sono sottoposte le cellule nelle condizioni ambientali scelte.

I dati osservati indicano che, in tutti run di misura, c'è un aumento della quantità di lisato al crescere del tempo di invecchiamento ma si riescono anche ad evidenziare peculiari comportamenti

dei farmaci: ad esempio il probenecid manifesta sempre un elevato grado di tossicità (con lisi da 2 a 4 volte quella dei controlli) che è significativamente ridotto dalla simultanea incubazione con dipiridamolo. Comportamenti cooperativi si possono osservare anche nel caso dei trattamenti con glibenclamide e carbenoxolone. Risulta inoltre che, in tutti i campioni del terzo run, l'incubazione in microgravità produce una lisi inferiore a quella dei i controlli statici indipendentemente, dal trattamento farmacologico scelto e dal tempo di invecchiamento considerato.

A parte questi dati preliminari, le analisi dei campioni preparati a Losanna sono ancora in corso e, data la notevolissima quantità di dati prodotta, impiegheranno prevedibilmente parecchie settimane per essere espletate ed assemblate in uno schema interpretativo globale. In questo quadro ulteriori approfondimenti sperimentali da condurre sia in sede che presso i laboratori dell'EPFL sono senz'altro auspicabili.