

L'iporeattività vascolare nelle sindromi di Bartter e di Gitelman

L. Calò¹, G. Ceolotto¹, M. Milani², E. Pagnin¹, E. Baritono¹, A. Maresca¹, L. Bonfante², R. Marcon², S. Cantaro², A. Antonello², A. Semplicini¹

¹ Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Clinica Medica IV

² Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Divisione di Nefrologia, Università di Padova, Padova

Riassunto

Premesse. La sindrome di Bartter (BS) e la sindrome di Gitelman (GS) sono caratterizzate da un anomalo signaling intracellulare che indirizza verso una condizione di ridotta attività della PKC e quindi di ridotta reattività vascolare. In BS e GS il sistema dell'ossido nitrico (NO) è attivato e potrebbe ulteriormente contribuire all'iporeattività vascolare di questi pazienti. Poiché la PKC regola molti processi di signaling cellulare e regola anche l'espressione genica di dell'isoforma endoteliale della sintasi di NO, ecNOS, abbiamo valutato, l'attività della PKC citosolica e di membrana, basale e fMLP stimolata nei neutrofili di BS e GS. Abbiamo inoltre valutato l'effetto della stimolazione della PKC monocitaria sull'espressione genica di ecNOS in BS e GS e dell'inibizione della PKC nei soggetti di controllo (C).

Metodi. In 3 pazienti con BS, 6 con GS e 10 C è stata determinata l'attività basale e fMLP stimolata (10 min, 300 nM) della PKC come ³²P fosforilazione di uno specifico peptide nel citosol e nella membrana di neutrofili.

L'espressione genica di ecNOS (estrazione di RNA, RT-PCR, amplificazione con PCR usando primer specifici, sequenziamento e valutazione quantitativa dei prodotti di PCR) è stata valutata dopo incubazione di PMA (50,100,200 nM) con monociti di BS e GS e dopo inibizione della PKC con GFX (1.2 µM) nei C.

Risultati. L'attività basale della PKC, citosolica e di membrana non era diversa nei due gruppi (70±3 vs 80±2; 37±3 vs 46±2 pmol/min/mg prot, rispettivamente), mentre l'attività della PKC di membrana, fMLP-stimolata risultava minore in BS and GS vs C (da 43±2 a 53±3 vs 38±2 a 66±3 pmol/min/mg prot, p<0.05). Il PMA riduceva l'espressione genica di ecNOS in modo dose dipendente in BS e GS (a 100 nM: 0.55±0.07 vs 0.80±0.05, unità densitometriche (d.u.) p<0.001), mentre il GFX aumentava l'espressione genica di ecNOS nei C (0.41±0.04 vs 0.62±0.05, d.u. p<0.001).

Conclusioni. I nostri dati dimostrano in BS e GS la presenza di una ridotta attivazione della PKC e che l'attivazione del sistema NOS-NO in questi pazienti è secondario alla ridotta attività della PKC dovuta alla presenza di un anomalo signaling cellulare che può contribuire all'iporeattività vascolare di questi pazienti.

PAROLE CHIAVE: *Sindrome di Bartter, Sindrome di Gitelman, PKC, NO, Reattività vascolare*

Vascular hyporeactivity in Bartter and Gitelman's syndromes

Background. Bartter's and Gitelman's syndromes (BS and GS) are characterized by abnormal cell signaling, pointing toward a reduced PKC activity and therefore reduced cell reactivity. In BS and GS the NO system is upregulated, which could further contribute to the vascular hyporeactivity. Since PKC regulates many signaling processes and PKC regulates also ecNOS gene expression, we evaluated basal and fMLP-stimulated (10 min, 300 nM) PKC activity in BS and GS and controls (C). The effect of stimulation and inhibition of PKC in BS, GS and C on ecNOS gene expression was tested in monocytes.

Methods. Basal and fMLP-stimulated PKC activity in the cytosols and membranes of neutrophils from 3 BS, 6 GS and 10 controls (C) was evaluated as ³²P phosphorylation of specific peptide. The effect of PKC stimulation and inhibition on monocyte ecNOS gene expression in BS, GS and C was also evaluated (RNA extraction, RT-PCR, amplification with specific primers, sequencing and quantitative evaluation of PCR products).

Results. Cytosol and membrane basal PKC activity were similar in the two groups (70 ± 3 vs 80 ± 2 ; 37 ± 3 vs 46 ± 2 pmol/min/mg prot, respectively), while fMLP-stimulated membrane PKC activity was lower in BS and GS compared to C (from 43 ± 2 to 53 ± 3 vs 38 ± 2 to 66 ± 3 pmol/min/mg prot, $p<0.05$). PMA (PKC activator) (50,100,200 nM) dose-dependently reduced and normalized ecNOS gene expression in BS and GS monocytes [at 100 nM: 0.55 ± 0.07 vs 0.80 ± 0.05 , densitometric units (d.u.) $p<0.001$], while incubation of GFX, a selective PKC inhibitor (1.2 mM), with C monocytes increased ecNOS mRNA production (0.41 ± 0.04 vs 0.62 ± 0.05 , d.u. $p<0.001$).

Conclusions. These data establish that BS and GS NO system upregulation is secondary to suppressed PKC activity due to the presence of an anomalous cell signaling system which may contribute to vascular hyporeactivity. (*Giorn It Nefrol* 2000; 17: 250-4)

KEY WORDS: Bartter's syndrome, Gitelman's syndrome, PKC, NO, Vascular reactivity
