

Fosforilazione della Jun N-Terminal-Kinase e attivazione linfomonocitaria in emodialisi: ruolo del complemento e della vitamina E

M. Soccio, G. Grandaliano, C. Martino, F.P. Schena, G. Pertosa

Divisione di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Dipartimento dell'Emergenza e Trapianti d'Organo, Università di Bari, Bari

Riassunto

Premesse. Durante l'emodialisi con membrane bioincompatibili, la concomitante attivazione dei linfomonociti periferici (LMP) e del complemento (C) inducono il rilascio in circolo di numerosi mediatori proflogistici, tra cui citochine, radicali dell'O₂ ed ossido nitrico (NO). Tuttavia, restano ancora da chiarire le vie del segnale intracellulare coinvolte nell'attivazione dei LMP in corso di emodialisi. Recentemente, è stato dimostrato che la JUNK può essere attivata in risposta allo "stress ossidativo". Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare *in vivo* l'attivazione della JUNK nei LMP in risposta allo stress dialitico e il ruolo giocato in questo evento dal C.

Metodi. Lo studio è stato condotto su 7 pazienti uremici cronici dializzati, in maniera randomizzata, per 3 mesi con una nuova membrana cellulosa, modificata sinteticamente e contenente in superficie molecole di vitamina E (Excebrane, CL-E, Terumo, Italia), o con una membrana in Acetato di Cellulosa (AC). Al termine dei 3 mesi di trattamento a tutti i pazienti è stato effettuato un prelievo di sangue prima (T0), durante (T15 e T180) e 4 h dopo (T480) la dialisi. Ai tempi indicati, sono state studiate la generazione plasmatica del C5b-9, mediante ELISA, le proteine fosforilate in tirosina e l'attività della JUNK, mediante Western Blotting; infine, è stata valutata l'espressione genica dell'isoforma inducibile della sintetasi dell'NO (iNOS) mediante ibridizzazione *in situ*.

Risultati. Al T0 i livelli plasmatici di C5b-9 erano significativamente più elevati nei pazienti trattati con AC rispetto a quelli trattati con CL-E. Durante la dialisi, le concentrazioni plasmatiche di C5b-9 aumentavano con le due membrane e ritornavano alla normalità al T480 solo con l'Excebrane. Similmente, al T180 abbiamo osservato un aumento dei livelli delle proteine fosforilate in tirosina e della JUN nei LMP dei pazienti trattati con AC. Al contrario, nei pazienti dializzati con CL-E si assisteva ad una significativa riduzione dell'attività tirosinchinasica e della JUNK. Inoltre, abbiamo osservato un aumento dell'espressione genica dell'iNOS nei pazienti trattati con AC, che si riduceva con il trattamento con la membrana contenente vitamina E.

Conclusioni. La fosforilazione di JUNK è notevolmente aumentata nei LMP isolati dai pazienti trattati con AC e può rappresentare un importante evento cellulare nell'attivazione dei LMP durante la dialisi con membrane bioincompatibili. L'attivazione di questo enzima, mediata verosimilmente dalla cronica generazione di C5b-9, può essere ridotta mediante l'uso di membrane contenenti vitamina E.

PAROLE CHIAVE: Emodialisi, Segnale intracellulare, Jun N-Terminal-Kinase, Monociti, Vitamina E, Biocompatibilità

Phosphorylation and activation of Jun N-Terminal-Kinase (Junk) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) during hemodialysis: the role of complement (C) and vitamin E

Background. The generation during hemodialysis (HD) of activated complement (C) fragments and oxidants, including NO, may affect PBMC function. Currently, little is known about signal transduction pathway involved in HD-induced PBMC activation. JUNK is a novel MAPK phosphorylated and activated in response to oxidative stress and directly involved in cell activation. In the attempt to identify at least some of the intracellular signaling pathways leading to

PBMC activation, we evaluated PBMC inducible NO synthase (iNOS) expression, cellular tyrosine kinase activity and JUNK activation, and plasma C5b-9 generation in uremic patients treated with a cellulosic or a vitamin-E modified membrane.

Methods. Seven uremic patients were randomized to receive three month-subsequent period of HD with a low-flux cellulose acetate (CA) and a vitamin E-modified cellulose membrane (CL-E, Terumo, Italy). After each period of treatment, PBMC were harvested before (T0), during (T15 and T180) and 4 hours (T480) after each dialysis session. At the indicated time points, we evaluated plasma C5b-9 generation, by ELISA, and iNOS gene expression by in situ hybridization. Tyrosine-phosphorylated proteins level and JUNK activity were studied by western blotting.

Results. At T0, a significant increase in plasma C5b-9 levels was found in CA patients compared to CL-E –treated patients. During HD C5b-9 concentrations rose more significantly in CA patients than in CL-E patients and returned to baseline values (at T480) only in CL-E patients. At the same time, we observed in CA patients an increase of the tyrosine phosphorylation levels at T180 together with a striking activation of JUNK. By contrast, PBMC from CL-E-treated patients showed a significant reduction in tyrosine phosphorylation and undetectable levels of JUNK. Moreover, we observed a clear upregulation of mRNA iNOS expression in PBMC isolated from CA treated patients. Interestingly, CL-E treatment down-regulated iNOS mRNA expression.

Conclusions. Our data suggest that JUNK activation is highly upregulated in CA-treated patients, most likely in a complement-dependent manner. CL-E treatment reduces PBMC JUNK activation probably by blunting the generation of oxygen radicals in response to C5b-9-induced immune cell activation. (*Giorn It Nefrol* 2001; 18: 564-70)

KEY WORDS: Hemodialysis, Intracellular signaling, Jun N-Terminal Kinase, Mononuclear cells, Vitamin E, Biocompatibility
