

## Studio dei recettori implicati nell'inibizione immunitaria mediata dallo splanchnic anti-inflammatory pathway

### Progetto di ricerca

**IL PROBLEMA.** Le infezioni acquisite in ambito ospedaliero rappresentano un problema prioritario di salute pubblica per la loro frequenza e gravità. Il loro impatto sulla popolazione e sui sistemi sanitari, in termini di morbilità, mortalità e costi associati, è significativo nel mondo industrializzato. A causa della scarsità di nuovi antibiotici e della rapida diffusione di microrganismi multiresistenti, la situazione continua a peggiorare inesorabilmente. Secondo uno studio del 2016 in Italia, su 14.773 pazienti ricoverati, l'8,03% ha sviluppato infezioni nosocomiali (<https://www.epicentro.iss.it/infezioni-correlate/epidemiologia>). Uno studio del 2018 ha stimato che ogni anno in Europa si verificano circa 8,9 milioni di casi di infezioni correlate all'assistenza sanitaria, delle quali una su tre è resistente agli antibiotici [1].

**BACKGROUND DELLA SOLUZIONE.** Questo progetto mira ad affrontare il problema sopra descritto. Si basa sulla capacità del sistema nervoso di influenzare fortemente le risposte immunitarie. Il sistema immunitario riconosce la presenza di un'infezione grazie a specifici recettori dell'immunità innata presenti su diversi leucociti. Tra questi, i toll-like receptors (TLRs) rivestono un'importanza significativa. La prima reazione immunitaria consiste nello sviluppo di una risposta infiammatoria [2]. L'entità dell'infiammazione è cruciale: risposte insufficienti portano a immunodeficienza, ma anche risposte eccessive causano morbilità e mortalità. La regolazione di questa risposta è stata a lungo considerata autonoma, mediata da interazioni tra cellule immunitarie in un sistema ampiamente autoregolato. Tuttavia, ricerche più recenti hanno fornito prove sostanziali del ruolo attivo del sistema nervoso nel mantenere questo equilibrio [3]. Il cervello controlla l'infiammazione indotta da una sfida immunitaria attraverso due meccanismi principali: 1) attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene per rilasciare glucocorticoidi che sopprimono l'infiammazione [4]; 2) attraverso un meccanismo denominato riflesso infiammatorio (IR) [5].

L'IR è in grado di rispondere rapidamente e regolare la risposta infiammatoria in modo integrato. Agisce per fornire un feedback negativo inibendo la risposta immunitaria innata e prevenendo un rilascio eccessivo di fattori pro-infiammatori [6, 7]. Il braccio efferente dell'IR è lo splanchnic anti-inflammatory pathway (SAIP, [8]). La SAIP è costituita da fibre simpatiche raccolte nel nervo grande splanchnico, che comprende assoni simpatici pre- e post-gangliari. Alcuni neuroni simpatici pregangliari splanchnici promuovono il rilascio di adrenalina (A) dalla midollare del surrene, mentre altri formano sinapsi a livello dei gangli simpatici prevertebrali con neuroni postgangliari. Questi ultimi proiettano verso vari organi come la milza, il fegato, il pancreas, lo stomaco, l'intestino e tutti i linfonodi situati nella zona addominale [9], dove risiedono i leucociti. Quando attivati in risposta a una sfida immunitaria, i neuroni simpatici postgangliari rilasciano noradrenalina (NA), che insieme all'adrenalina, influenza la funzione immunitaria legandosi a recettori adrenergici presenti su diversi leucociti [5].

La SAIP si attiva in diverse specie in risposta a vari stimoli immunitari riconosciuti da diversi TLRs, simulando infezioni batteriche (sia Gram-positive che Gram-negative) e virali [10]. Pertanto, l'IR rappresenta un meccanismo biologico fondamentale, conservato evolutivamente in tutti i mammiferi per limitare le conseguenze infiammatorie sistemiche delle citochine quando sfuggono da un'infezione localizzata nel circolo sanguigno e nel resto del corpo. Se l'infezione stessa diventa sistemica, tuttavia, possono applicarsi regole diverse.

Recentemente, il PI ha dimostrato che la disattivazione della SAIP, ottenuta mediante resezione chirurgica dei nervi simpatici splanchnici, induce lo sviluppo di una risposta infiammatoria esagerata nelle pecore infettate per via endovenosa con *Escherichia coli* (*E. coli*), rispetto a quanto osservato negli animali con i nervi intatti. Tuttavia, questa reazione si risolve nel giro di poche ore, lasciando l'animale in perfetta forma, libero di muoversi, bere e mangiare, a differenza delle pecore con i nervi splanchnici intatti. Sorprendentemente, il sistema immunitario innato, senza il freno inibitorio esercitato dalla SAIP, riesce a eradicare qualsiasi batterio circolante in meno di 90 minuti dalla somministrazione del bolo di *E. coli*, mentre gli animali di controllo, con

il riflesso perfettamente funzionante, continuano a presentare batteri circolanti vivi nel flusso sanguigno anche 48 ore dopo [11].

**Contesto.** La SAIP, il braccio efferente dell'IR, si attiva endogenamente in risposta a una sfida immunitaria e la sua funzione è quella di attenuare la risposta infiammatoria successiva. La sua attivazione provoca il rilascio di adrenalina nel flusso sanguigno e di NA in diversi organi addominali [5]. Insieme alla NA, alcuni nervi simpatici rilasciano neuropeptide Y (NPY).

**Ipotesi: La SAIP inibisce il sistema immunitario innato tramite i  $\beta$ 2-adrenorecettori e i recettori NPY1.**

La maggior parte della letteratura sugli effetti simpatici sull'immunità si concentra sugli effetti mediati dal recettore  $\beta$ 2-adrenergico (AR), anche perché i  $\beta$ 2 sono i recettori AR più espressi sui leucociti [12, 13]. La visione canonica è che gli effetti mediati dai  $\beta$ 2-AR sull'immunità siano inibitori. Di fatto, diversi laboratori indipendenti hanno descritto un forte effetto anti-infiammatorio delle catecolamine, sia in vitro che in vivo, attraverso l'attivazione dei  $\beta$ 2AR [14, 15]. Recentemente, Yu et al. hanno dimostrato che il NPY, attraverso i recettori NPY1 (NPY1R), inibisce endogenamente la risposta infiammatoria al lipopolisaccaride (LPS) nei ratti [16]. La NA e il NPY influenzano anche l'attività fagocitica di neutrofili, monociti, cellule dendritiche e macrofagi [17, 18]. Vogliamo comprendere l'implicazione generale dei  $\beta$ 2AR e dei NPY1R nella funzione della SAIP.

## Procedure sperimentali

**Esperimenti proposti.** Il modello animale studiato sarà il topo settico, reso endotossiemico mediante iniezione endovenosa di LPS. Questi esperimenti verranno condotti su animali anestetizzati. Lo stesso esperimento verrà eseguito su diversi gruppi di topi transgenici:  $\beta$ 2-AR knock out ( $\beta$ 2-KO), NPY1Rs-KO,  $\beta$ 2-KO + NPY1Rs-KO e topi wild-type (WT). Ogni gruppo sarà suddiviso in due sottogruppi, in cui i topi sono sottoposti, prima dell'iniezione di LPS, a sezione bilaterale dei nervi grandi splanchnici (SplanX) o a chirurgia fittizia (Sham). 90 minuti dopo l'iniezione di LPS, si preleverà il sangue tramite puntura intracardiaca per la misurazione successiva delle citochine. I livelli plasmatici di fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF), interleuchina-10 (IL-10) e proteina chemiotattica dei monociti-1 (MCP-1) verranno valutati.

**Risultati attesi.** Negli esperimenti condotti sui topi WT, il taglio dei nervi splanchnici impedirà l'attivazione della SAIP e disinibirà la risposta infiammatoria. In particolare, 90 minuti dopo la sfida immunitaria, gli animali SplanX risponderanno al LPS con livelli più elevati di TNF e MCP-1 e livelli più bassi di IL-10, rispetto agli animali Sham, confermando i risultati precedenti pubblicati dal PI [10]. La funzione della SAIP sarà compromessa nei topi  $\beta$ 2-KO e NPY1Rs-KO, ma solo nel gruppo  $\beta$ 2-KO + NPY1Rs-KO la differenza nelle citochine plasmatiche tra i topi Sham e SplanX sarà nulla.

## Piano di attività

Il titolare dell'assegno di ricerca sarà responsabile di varie procedure tra le quali:

- 1) Cura dell'allevamento dei topi transgenici.
- 2) Procedure chirurgiche su topi. Queste includono l'induzione di anestesia profonda gassosa negli animali. Esposizione di determinati nervi simpatici per la manipolazione. Somministrazione endovena di farmaci. Estrazione di sangue.
- 3) Procedure immunoistochimiche
- 4) Saggi immunologici per testare la concentrazione plasmatica di marker infiammatori
- 5) Stesura di protocolli sperimentali da sottomettere al comitato etico
- 6) Stesura di manoscritti per la pubblicazione su riviste internazionali del settore

## Bibliografia

1. Suetens, C., et al., *Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: results from two European point prevalence surveys, 2016 to 2017*. Euro Surveill, 2018. **23**(46).
2. Nathan, C., *Points of control in inflammation*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 846-52.
3. Bellinger, D.L. and D. Lorton, *Autonomic regulation of cellular immune function*. Auton Neurosci, 2014. **182**: p. 15-41.
4. Besedovsky, H.O. and A. del Rey, *Regulating inflammation by glucocorticoids*. Nat Immunol, 2006. **7**(6): p. 537.
5. McAllen, R.M., M.J. McKinley, and D. Martelli, *Reflex regulation of systemic inflammation by the autonomic nervous system*. Auton Neurosci, 2022. **237**: p. 102926.
6. Martelli, D., et al., *Reflex control of inflammation by sympathetic nerves, not the vagus*. J Physiol, 2014. **592**(Pt 7): p. 1677-86.
7. Martelli, D., et al., *Reflex control of inflammation by the splanchnic anti-inflammatory pathway is sustained and independent of anesthesia*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2014. **307**(9): p. R1085-91.
8. Martelli, D., D.G. Farmer, and S.T. Yao, *The splanchnic anti-inflammatory pathway: could it be the efferent arm of the inflammatory reflex?* Exp Physiol, 2016. **101**(10): p. 1245-1252.
9. Martelli, D., et al., *Anti-inflammatory reflex action of splanchnic sympathetic nerves is distributed across abdominal organs*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2019. **316**(3): p. R235-R242.
10. Occhinegro, A., et al., *The endogenous inflammatory reflex inhibits the inflammatory response to different immune challenges in mice*. Brain Behav Immun, 2021. **97**: p. 371-375.
11. Lankadeva, Y.R., et al., *Sympathetic nerves control bacterial clearance*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 15009.
12. Khan, M.M., et al., *Beta-adrenergic receptors on human suppressor, helper, and cytolytic lymphocytes*. Biochem Pharmacol, 1986. **35**(7): p. 1137-42.
13. Elenkov, I.J., et al., *The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(4): p. 595-638.
14. Grailer, J.J., et al., *Induction of M2 regulatory macrophages through the beta2-adrenergic receptor with protection during endotoxemia and acute lung injury*. J Innate Immun, 2014. **6**(5): p. 607-18.
15. Agac, D., et al., *The beta2-adrenergic receptor controls inflammation by driving rapid IL-10 secretion*. Brain Behav Immun, 2018. **74**: p. 176-185.
16. Yu, J., et al., *Neuron-derived neuropeptide Y fine-tunes the splenic immune responses*. Neuron, 2022.
17. Nicholls, A.J., et al., *Activation of the sympathetic nervous system modulates neutrophil function*. J Leukoc Biol, 2018. **103**(2): p. 295-309.
18. Bedoui, S., S. von Horsten, and T. Gebhardt, *A role for neuropeptide Y (NPY) in phagocytosis: implications for innate and adaptive immunity*. Peptides, 2007. **28**(2): p. 373-6.