

TESI DI DOTTORATO

**CARATTERIZZAZIONE PRE-CLINICA DI UNA NUOVA  
STRATEGIA TERAPEUTICA PER L'ISCHEMIA CEREBRALE  
IDENTIFICATA MEDIANTE *DRUG REPURPOSING* DI UN  
ANTIBIOTICO MACROLIDE**

**DOTTORATO DI RICERCA**

in

Biochimica cellulare ed attività dei farmaci in oncologia  
XXVI Ciclo

Settore Scientifico Disciplinare BIO/14 Farmacologia

Coordinatore: Ch.mo Prof. Diego Sisci

Firma .....

Tutor: Dott.ssa Diana Amantea

Firma .....

Dottorando: Dott. Michelangelo Certo

Firma .....





Alla mia amata famiglia...

**OMISSIS**

**UNIVERSITA' DELLA CALABRIA**  
***Dottorato di Ricerca in Biochimica Cellulare***  
***ed Attività dei Farmaci in Oncologia.***

Il giorno 14 Ottobre 2013 alle ore 11.00 è convocato per via telematica il Collegio dei Docenti del Dottorato di Ricerca in Biochimica Cellulare ed Attività dei Farmaci in Oncologia per discutere il seguente ordine del giorno.

- 1. Valutazione relazioni fine anno dottorandi XXVI, XXVII e XXVIII ciclo.**
- 2. Autorizzazione a redigere la tesi di Dottorato in lingua inglese.**
- 3. Varie ed eventuali.**

**OMISSIS**

Il Coordinatore, verificata la presenza del numero legale, dichiara valida la seduta ed assume le funzioni di Presidente, la Dott.ssa Francesca De Amicis quelle di segretario verbalizzante.

**Valutazione relazioni fine anno dei Dottorandi del XXVI ciclo.**

**OMISSIS**

**Dott. Certo Michelangelo.** L'attività formativa e di ricerca svolta dal Dott. Michelangelo Certo è rivolta allo studio del coinvolgimento della risposta infiammatoria nella fisiopatologia dell'ictus ischemico e allo sviluppo di modelli animali di ischemia focale per l'identificazione di nuovi target terapeutici.

Seguendo uno studio già avviato presso l'Unità di Ricerca di Base e Traslazionale "Stroke" dell'Università della Calabria sugli effetti neuroprotettivi dell'azitromicina (deposito brevetto n. RM2011A000233), il Dott. Certo ha contribuito alla caratterizzazione delle azioni di tale antibiotico macrolide in modelli di ischemia focale indotta nei roditori mediante occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAo).

Dal momento che la letteratura corrente sui meccanismi alla base della morte cellulare post-ischemica è molto vasta, la fase di acquisizione di informazioni bibliografiche su

cui avviare il lavoro di ricerca è risultato complesso e lungo. Similmente, un periodo sufficientemente lungo è stato dedicato all'apprendimento ed alla riproduzione dei modelli sperimentali di ischemia cerebrale focale, unitamente alla comprensione delle tecniche biochimiche e di analisi d'immagine per la caratterizzazione della risposta infiammatoria. Durante uno stage svolto presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche dell'Università di Perugia, il candidato ha dedicato parte della sua attività all'apprendimento di tecniche cirofluorimetriche per la caratterizzazione della modulazione della risposta immune centrale e sistemica in corso di ischemia.

I risultati dello studio condotto dal Dott. Certo dimostrano il coinvolgimento delle diverse componenti del sistema immune nella patofisiologia del danno ischemico indotto dall'occlusione dell'arteria cerebrale media nei roditori. I dati prodotti durante i primi due anni di dottorato contribuiscono a descrivere l'andamento spazio-temporale della risposta neuroinfiammatoria (astrociti e microglia) indotta dall'insulto ischemico e la correlazione dell'evoluzione di quest'ultima e del danno con l'infiltrazione cerebrale di macrofagi, neutrofili e linfociti T. Durante l'ultimo anno di dottorato, il Dott. Certo ha contribuito ad un progetto di ricerca sulla caratterizzazione degli effetti neuroprotettivi dell'azitromicina, confermando la capacità del farmaco di ridurre il danno cerebrale e il deficit neurologico indotti dall'ischemia focale transitoria nei roditori.

Nella fase di elaborazione e analisi dei risultati, il Dott. Certo ha mostrato eccellenti capacità nella valutazione critica dei dati sperimentali.

Il Collegio dei Docenti valuta, nel complesso, positivo il lavoro svolto dal candidato che durante i tre anni di corso ha partecipato attivamente alle attività di aggiornamento organizzate dalle Società Italiane di Farmacologia e di Neuroscienze, nonché alle iniziative didattiche organizzate sotto forma di workshops e seminari.

Il Collegio dei docenti valutato il contenuto della relazione di fine anno della Dott. Michelangelo Certo esprime parere **favorevole** a sostenere l'esame finale del corso di Dottorato.

**OMISSIS**

Rende, 14.10.2013

Il Coordinatore  
Prof. Diego Sisci



## **ABSTRACT**

Cerebral ischemia is one of the most common causes of disability and mortality worldwide and the only pharmacological treatment currently available is thrombolysis. The understanding of the mechanisms underlying ischemic injury has led to the identification of several neuroprotective compounds aimed at the recovery of the damaged brain tissue. However, most of these drugs have produced disappointing results in clinical trials because of the high toxicity or lack of efficacy in patients. Therefore, there is a real need to develop novel therapeutic strategies that do not consider neurons as the only target. In fact, the neuronal damage is strongly influenced by the inflammatory and immune processes that develop both locally and systemically after ischemia. The inflammatory response evolves slowly, and this allows to significantly expand the time window for pharmacological intervention, highlighting the therapeutic potential of anti-inflammatory and immunomodulatory drugs.

Therefore, the first objective of this work was to characterize central and peripheral inflammatory responses that occur following an ischemic insult in rodents. In particular, in order to identify potential targets, we have evaluated the temporal profile of activation of specific inflammatory cells. By immunofluorescence analysis, we observed an early activation of microglia and astrocytes in the ischemic hemisphere, as a result of transient middle cerebral artery occlusion (MCAo) in rodents. We have also detected a massive brain recruitment of neutrophils and macrophages, with a peak

of infiltration 48 hours after the insult, whereas T lymphocytes have been identified only at later times. Together with evidence from microarray studies demonstrating that the majority of genes modulated acutely in the blood of stroke patients resides in neutrophils and monocytes, our findings suggest that these cells may be useful therapeutic targets.

Using the repurposing approach we have selected a drug, azithromycin, that is able to modulate the functions of macrophages and neutrophils in pathological conditions other than ischemia. Pre-treatment with azithromycin (150 mg/kg, orally) produces a significant reduction of the cerebral infarct volume induced by transient or permanent MCAo in rats. This suggests a potential prophylactic use of the drug during surgical procedures associated to a high risk of ischemic tissue damage. We have also observed the neuroprotective activity of azithromycin when the drug is administered systemically after a transient ischemic insult. The reduction of the infarct volume induced by transient MCAo is dose-dependent ( $ED_{50} = 0.59$  mg/kg in mice,  $ED_{50} = 1.19$  mg/kg in rats) and is approximately 60% (compared to vehicle) with the most effective dose of azithromycin (150 mg/kg, i.p.). The neuroprotective doses in rodents are therefore much lower than the antibiotic ones. We have also documented that the reduction of the infarct volume and the improvement of the neurological deficit due to azithromycin post-treatment (150 mg/kg, ip) are maintained up to 7 days after the insult. Furthermore, the time window of efficacy is rather wide, since neuroprotection is observed with the drug administered up to 6 hours after the insult both in rats and in mice subjected to transient MCAo. The characterization of the neuroprotective effects of azithromycin, demonstrated by the present study in models of focal ischemia in rodents, provides the basis for the validation of the drug efficacy in patients suffering from ischemic stroke.

## SOMMARIO

L'ischemia cerebrale è una delle cause più comuni di disabilità e mortalità nel mondo e l'unico trattamento farmacologico attualmente disponibile è la trombolisi. La comprensione dei meccanismi alla base del danno ischemico ha portato all'identificazione di numerosi composti neuroprotettivi mirati al recupero del tessuto cerebrale danneggiato. Tuttavia, la maggior parte di questi farmaci ha prodotto risultati deludenti in clinica a causa della scarsa efficacia o dell'elevata tossicità nei pazienti. Da qui, la necessità di potenziare la ricerca di nuove strategie terapeutiche che non considerino come unico target il neurone. Infatti, il danno neuronale è fortemente influenzato dai processi infiammatori e immunitari che si sviluppano sia a livello locale che sistemico dopo ischemia. La risposta infiammatoria evolve lentamente, consentendo di ampliare in maniera significativa la finestra temporale per l'intervento farmacologico e sottolineando il potenziale terapeutico dei farmaci antinfiammatori e immunomodulanti.

Pertanto, il primo obiettivo di questo lavoro è stato quello di caratterizzare la risposta infiammatoria, sia centrale che periferica, che si instaura in seguito ad un insulto ischemico nei roditori. In particolare, al fine di identificare potenziali target, è stato valutato il profilo temporale dell'attivazione di specifiche cellule infiammatorie. Mediante analisi di immunofluorescenza, abbiamo osservato come in seguito ad occlusione transitoria dell'arteria cerebrale media (MCAo) nei roditori vi sia una precoce attivazione della microglia e degli astrociti nell'emisfero ischemico. Abbiamo inoltre rilevato un massiccio reclutamento nel cervello di neutrofili e macrofagi, con un picco di infiltrazione 48 ore dopo l'insulto, mentre i linfociti T sono stati individuati soltanto a tempi più tardivi. Questi nostri



risultati, insieme alle evidenze ottenute da studi di microarray che indicano come la maggior parte dei geni modulati acutamente nel sangue dei pazienti colpiti da ictus ischemico risieda proprio nei neutrofilo e nei monociti, suggeriscono come tali cellule possano essere utili bersagli terapeutici.

Mediante l'approccio del drug repurposing abbiamo pertanto individuato un farmaco, l'azitromicina, capace di modulare le funzioni dei macrofagi e dei neutrofilo in condizioni patologiche diverse dall'ischemia. Il pre-trattamento con azitromicina (150 mg/kg per via orale) produce una significativa riduzione del volume di infarto cerebrale indotto da MCAo permanente o transitoria nei ratti. Questo dato suggerisce un potenziale utilizzo profilattico del farmaco durante procedure chirurgiche che comportano un elevato rischio di danno tissutale ischemico. L'attività neuroprotettiva dell'azitromicina si manifesta anche quando il farmaco è somministrato per via sistemica dopo un insulto ischemico di natura transitoria. La riduzione del volume di infarto indotto da MCAo transitoria è dose-dipendente ( $ED_{50} = 0,59$  mg/kg nei topi,  $ED_{50} = 1,19$  mg/kg nei ratti) ed è pari a circa il 60% (rispetto al veicolo) con la dose più efficace di azitromicina (150 mg/kg, i.p.). Le dosi neuroprotettive nei roditori sono pertanto molto inferiori rispetto a quelle antibiotiche. Abbiamo inoltre documentato che la riduzione del volume d'infarto ed il miglioramento del deficit neurologico a seguito di post-trattamento con azitromicina (150 mg/kg, i.p.) si mantengono fino a 7 giorni dopo l'insulto. Inoltre, la finestra temporale di efficacia è risultata essere piuttosto ampia, in quanto la neuroprotezione si osserva se il farmaco è somministrato fino a 6 ore dall'insulto sia nei ratti che nei topi sottoposti ad MCAo transitoria. La caratterizzazione degli effetti neuroprotettivi dell'azitromicina dimostrata nel presente studio in modelli di ischemia focale nei roditori pone le basi per la validazione dell'efficacia del farmaco in pazienti colpiti da ictus ischemico.

## INDICE

ABSTRACT.....	vi
SOMMARIO.....	viii
ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI.....	xiii
LISTA DELLE FIGURE .....	xv
LISTA DELLE TABELLE.....	xix
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE.....	1
1.1    L'ischemia cerebrale: incidenza e principali fattori di rischio.....	1
1.2    Fisiopatologia dell'ischemia cerebrale .....	7
1.2.1    Eccitotossicità mediata dal glutammato.....	9
1.2.2    Effetti del calcio intracellulare.....	13
1.2.3    Danno indotto dallo stress ossidativo .....	14
1.2.4    Morte cellulare .....	16
1.2.5    Alterazioni a carico della barriera emato-encefalica.....	19
1.2.6    La risposta infiammatoria .....	23
1.2.6.1    Mediatori cellulari dell'infiammazione .....	24
1.2.6.2    Mediatori solubili dell'infiammazione .....	33
1.3    Dai fallimenti clinici all'esigenza di nuovi approcci di R&S .....	39
1.4    Il <i>drug repurposing</i> come strategia per l'identificazione di nuove terapie...45	

1.4.1	L'approccio del <i>drug repurposing</i> nell'ischemia cerebrale.....	51
1.4.2	Prospettive per l'impiego degli antibiotici macrolidi nello stroke.....	55
CAPITOLO 2 SCOPO DELLA TESI .....		66
CAPITOLO 3 METODI .....		68
3.1	Animali e procedure chirurgiche .....	68
3.1.1	Occlusione dell'arteria cerebrale media.....	68
3.1.2	Monitoraggio del flusso ematico cerebrale mediante Laser-Doppler .....	71
3.1.3	Perfusione intracardiaca .....	72
3.2	Trattamento farmacologico .....	73
3.3	Neuropatologia e quantificazione del danno ischemico .....	73
3.4	Valutazione del deficit neurologico .....	76
3.5	Valutazione della permeabilità della BEE mediante Evans Blue .....	77
3.6	Immunofluorescenza.....	78
3.7	Analisi citofluorimetrica .....	79
3.8	Analisi statistica .....	82
CAPITOLO 4 RISULTATI .....		83
4.1	Analisi del danno cerebrale indotto da MCAo nei roditori.....	83
4.2	Caratterizzazione della risposta neuroinfiammatoria in seguito ad ischemia cerebrale focale transitoria.....	90
4.3	Analisi spazio-temporale della risposta infiammatoria sistemica indotta dall'ischemia cerebrale .....	96
4.3.1	Caratterizzazione della risposta dei neutrofili.....	96
4.3.2	Caratterizzazione della risposta dei macrofagi .....	102
4.3.3	Caratterizzazione della risposta dei linfociti T .....	107
4.4	Effetti del pre-trattamento orale con azitromicina sul danno cerebrale indotto da MCAo nei ratti .....	110

4.5 Effetti del post-trattamento con azitromicina sul danno cerebrale indotto da MCAo nei ratti .....	114
4.6 Effetti del trattamento con azitromicina sul danno cerebrale indotto da MCAo nei topi .....	120
CAPITOLO 5 DISCUSSIONE .....	125
REFERENZE .....	140
RINGRAZIAMENTI .....	168

## ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

ADHD	Sindrome da deficit di attenzione e iperattività
Apaf	Fattore attivante le proteasi dell'apoptosi
Arg1	Arginasi 1
BEE	Barriera emato-encefalica
CBF	Flusso ematico cerebrale
CCA	Arteria carotide comune
COX-2	Ciclossigenasi-2
CSF	Liquido cerebrospinale
DAMP	Pattern molecolari associati al danno cellulare
EB	Evans blue
ETC	Catena di trasporto degli elettroni
FDA	Food and drug administration
GFAP	Proteina fibrillare acida della glia
ICAM	Molecola di adesione intercellulare
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IGF-1	Fattore di crescita insulino simile tipo 1
IL	Interleuchina
LPS	Lipopolisaccaride
Mac-1	Antigene macrofagico-1
MCAo	Occlusione dell'arteria cerebrale media
MCP-1	Proteina chemotattica per i monociti-1
MHC-II	Complesso maggiore di istocompatibilità-II
MIC	Concentrazione minima inibente
MIP-1 $\alpha$	Proteina infiammatoria macrofagica-1 $\alpha$
MLCK	Chinasi della catena leggera della miosina
MMP	Metalloproteasi della matrice
NF $\kappa$ B	Fattore nucleare $\kappa$ B
NIH	National Institute of Health
NMDA	Recettore N-metil-D-aspartato
NOS	Ossido nitrico sintasi

PB	Tampone fosfato
PLA2	Fosfolipasi A2
PSD95	Proteina della densità postsinaptica di 95 kDa
R&S	Ricerca e sviluppo
RNS	Specie reattive dell'azoto
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
SCID	Sindrome da immunodeficienza grave combinata
SDF-1	Fattore di derivazione stromale cellulare-1
SNC	Sistema nervoso centrale
STAIR	Stroke therapy academic industry roundtable
STAT3	Trasduttore del segnale e attivatore della trascrizione 3
TEER	Resistenza elettrica trans-epiteliale
TGF- $\beta$	Fattore di crescita trasformante- $\beta$
TJ	Giunzioni strette
TLR	Recettore toll like
TNF- $\alpha$	Fattore di necrosi tumorale $\alpha$
TTC	Trifeniltetrazolio cloruro
VCAM	Molecola di adesione cellulare vascolare

## LISTA DELLE FIGURE

<b>Figura 1-1:</b> Principali cause di ictus nelle popolazioni caucasiche e sottotipi di ictus ischemico .....	5
<b>Figura 1-2:</b> Illustrazione schematica dell'ictus ischemico .....	6
<b>Figura 1-3:</b> La cascata ischemica.....	8
<b>Figura 1-4:</b> Evoluzione temporale degli eventi scatenati da un insulto ischemico.....	8
<b>Figura 1-5:</b> Eccitotossicità mediata dal glutammato .....	11
<b>Figura 1-6:</b> Core e penombra nel cervello ischemico.....	17
<b>Figura 1-7:</b> Rappresentazione schematica dell'unità neurovascolare .....	20
<b>Figura 1-8:</b> Infiammazione locale e sistemica nell'insulto ischemico .....	30
<b>Figura 1-9:</b> Fasi di sviluppo di un nuovo farmaco.....	46
<b>Figura 1-10:</b> Strutture chimiche di alcuni macrolidi .....	56
<b>Figura 1-11:</b> Origine cellulare dei geni regolati dallo stroke.....	64
<b>Figura 3-1:</b> Illustrazione schematica delle principali arterie cerebrali nel ratto .....	69
<b>Figura 3-2:</b> Occlusione distale dell'arteria cerebrale media nel ratto .....	71
<b>Figura 3-3:</b> Esempio di tracciato relativo alla registrazione del CBF mediante Laser-Doppler .....	72
<b>Figura 3-4:</b> Colorazione con TTC di sezioni cerebrali di ratto.....	74
<b>Figura 3-5:</b> Definizione delle otto fettine coronali secondo Osborne et al (1987).....	75
<b>Figura 3-6:</b> Illustrazione schematica delle principali fasi del prelievo delle cellule peritoneali .....	81
<b>Figura 4-1:</b> Quantificazione del danno cerebrale indotto da MCAo transitoria nel ratto .....	84

<b>Figura 4-2:</b> Quantificazione del danno cerebrale indotto da MCAo permanente nel ratto .....	85
<b>Figura 4-3:</b> Quantificazione del danno cerebrale indotto da MCAo transitoria nel topo .....	86
<b>Figura 4-4:</b> Monitoraggio del flusso ematico cerebrale.....	87
<b>Figura 4-5:</b> Valutazione del danno alla BEE causato da MCAo nei topi .....	88
<b>Figura 4-6:</b> Analisi della permeabilità della BEE dopo MCAo.....	89
<b>Figura 4-7:</b> Attivazione della microglia nell'emisfero ischemico .....	90
<b>Figura 4-8:</b> Espressione di Iba1 48h dopo tMCAo nel topo.....	91
<b>Figura 4-9:</b> Caratterizzazione dell'espressione di CD11b a tempi tardivi rispetto all'insulto ischemico .....	92
<b>Figura 4-10:</b> Attivazione delle cellule astrocitarie nell'emisfero ischemico .....	93
<b>Figura 4-11:</b> Caratterizzazione morfologica e spaziale dell'espressione di GFAP in seguito ad insulto ischemico nel topo .....	94
<b>Figura 4-12:</b> Caratterizzazione dell'espressione di GFAP a tempi tardivi rispetto all'insulto ischemico .....	95
<b>Figura 4-13:</b> Immagine rappresentativa dell'infiltrazione dei neutrofilii nell'emisfero ischemico .....	97
<b>Figura 4-14:</b> Analisi della distribuzione dei neutrofilii nell'emisfero ischemico in topi sottoposti a 30 minuti di MCAo seguiti da 48 ore di riperfusione .....	98
<b>Figura 4-15:</b> Caratterizzazione spatio-temporale dell'infiltrazione dei neutrofilii nell'emisfero ischemico .....	99
<b>Figura 4-16:</b> Plots rappresentativi dell'analisi citofluorimetrica dell'infiltrazione dei neutrofilii nel parenchima cerebrale.....	100
<b>Figura 4-17:</b> Plots di citofluorimetria rappresentativi dell'evoluzione temporale del numero di neutrofilii nel sangue in seguito a 30 minuti di MCAo nei topi .....	101
<b>Figura 4-18:</b> Plots di citofluorimetria rappresentativi dell'incremento temporale del numero di neutrofilii nella milza in seguito a 30 minuti di MCAo nei topi.....	102
<b>Figura 4-19:</b> Infiltrazione cerebrale dei macrofagi dopo 48 ore di riperfusione .....	103
<b>Figura 4-20:</b> Plots di citofluorimetria rappresentativi dell'incremento temporale del numero di macrofagi nel cervello in seguito a 30 minuti di MCAo nei topi .....	104



<b>Figura 4-21:</b> : Plots di citofluorimetria rappresentativi dell'evoluzione temporale del numero di macrofagi M1 nel sangue in seguito a 30 minuti di MCAo nei topi ...	105
<b>Figura 4-22:</b> Plots di citofluorimetria rappresentativi dell'evoluzione temporale del numero di macrofagi M1 peritoneali in seguito a 30 minuti di MCAo nei topi ...	106
<b>Figura 4-23:</b> Plots di citofluorimetria rappresentativi dell'andamento temporale del numero di macrofagi M1 nella milza in seguito a 30 minuti di MCAo nei topi...	107
<b>Figura 4-24:</b> Caratterizzazione dell'infiltrazione dei linfociti T nel cervello ischemico .....	108
<b>Figura 4-25:</b> Rappresentazione schematica dell'attivazione/reclutamento delle cellule coinvolte nell'infiammazione post-ischemica.....	109
<b>Figura 4-26:</b> Effetto dell'azitromicina, somministrata per os 15 minuti prima della MCAo transitoria nei ratti .....	110
<b>Figura 4-27:</b> Monitoraggio del flusso ematico cerebrale nei ratti .....	111
<b>Figura 4-28:</b> Effetti a lungo termine della somministrazione orale di azitromicina..	112
<b>Figura 4-29:</b> Effetto dell'azitromicina somministrata per os 30 minuti prima della MCAo permanente nei ratti.....	113
<b>Figura 4-30:</b> Effetto dell'azitromicina somministrata per os o i.p. al momento della ri-perfusione .....	114
<b>Figura 4-31:</b> Effetto neuroprotettivo dell'azitromicina somministrata i.p. al momento della ri-perfusione, in ratti sottoposti ad MCAo transitoria (2h) .....	115
<b>Figura 4-32:</b> Effetto neuroprotettivo dell'azitromicina somministrata i.p. al momento della ri-perfusione, in ratti sottoposti ad MCAo transitoria (4,5h) .....	116
<b>Figura 4-33:</b> Valutazione dell' effetto neuroprotettivo dell'azitromicina dopo sette giorni di ri-perfusione.....	118
<b>Figura 4-34:</b> Effetto dell'azitromicina somministrata i.p. 2h dopo MCAo permanente .....	119
<b>Figura 4-35:</b> Immagini rappresentative della riduzione del danno cerebrale in topi trattati con AZM .....	120
<b>Figura 4-36:</b> : Effetto dell'azitromicina somministrata, i.p., al momento della ri-perfusione, in topi sottoposti ad MCAo transitoria (30 min) .....	121
<b>Figura 4-37:</b> Monitoraggio del flusso ematico cerebrale.....	122

**Figura 4-38:** Finestra temporale dell'azitromicina in topi sottoposti a MCAo transitoria ..... 123

**Figura 4-39:** Valutazione dell'effetto neuroprotettivo dell'azitromicina dopo 7 giorni di ri-perfusione..... 124

## LISTA DELLE TABELLE

<b>Tabella 1-1:</b> Principali fattori di rischio modificabili per l'ictus ischemico.....	3
<b>Tabella 1-2:</b> Esempi di composti falliti nella valutazione clinica per il trattamento dello stroke.....	16
<b>Tabella 1-3:</b> Ruolo dualistico delle cellule immunitarie sull'evoluzione dell'insulto cerebrale ischemico.....	26
<b>Tabella 1-4:</b> Esempi di farmaci riposizionati per nuove indicazioni terapeutiche.....	50
<b>Tabella 1-5:</b> Trial clinici per il riposizionamento di farmaci nell'ictus ischemico .....	53
<b>Tabella 1-6:</b> Effetti dei macrolidi sul rilascio delle citochine in vitro .....	60
<b>Tabella 1-7:</b> Effetti immunomodulatori dei macrolidi.....	62
<b>Tabella 1-8:</b> Principali geni indotti in seguito all'insulto ischemico.....	65
<b>Tabella 3-1:</b> Scala di valutazione del deficit funzionale in animali con MCAo.....	77

# CAPITOLO 1

## INTRODUZIONE

### **1.1 L'ischemia cerebrale: incidenza e principali fattori di rischio**

L'ischemia cerebrale rappresenta una delle maggiori cause di morte nel mondo e la principale causa di disabilità neurologica nell'adulto (Wittchen *et al.*, 2011; Go *et al.*, 2013). Nel 1988 l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha definito l'ictus (o stroke) una sindrome caratterizzata da “un rapido sviluppo di segni e/o sintomi clinici riferibili ad un deficit focale o globale delle funzioni cerebrali, di durata superiore alle ventiquattro ore o con esito infausto, non attribuibile ad altra causa apparente se non a vascolopatia cerebrale”. Il cervello costituisce circa il 2-3% del peso corporeo ma riceve approssimativamente il 15% della gittata cardiaca totale. Inoltre, esso presenta un'elevata richiesta metabolica, consumando circa il 20% dell'ossigeno totale dell'organismo e il 25 % del glucosio. Il cervello ha una limitata capacità di immagazzinare energia e quindi richiede un costante rifornimento di substrati per le normali funzioni metaboliche. Questa elevata richiesta di substrati spiega perché anche una transitoria riduzione del flusso ematico possa essere molto dannosa per il tessuto cerebrale.

Il numero totale di morti per stroke è stimato a 508.000 per anno nei Paesi dell'Unione Europea, con un costo annuale di 27 miliardi di euro (*European cardiovascular disease statistics*, 2008). Secondo i dati forniti dall'Istituto Superiore di Sanità, in Italia l'ictus è responsabile del 10-12% di tutti i decessi per anno e rappresenta la prima causa d'invalidità e la seconda di demenza con perdita di autosufficienza. Nel complesso, il costo medio annuo a paziente con disabilità grave, escludendo i costi a carico del Sistema Sanitario Nazionale (quantificati ad oggi in circa 3,5 miliardi di euro/anno), è di circa 30.000 euro, per un totale di circa 14 miliardi di Euro/anno. Questa cifra, che rappresenta il 78,8% dei costi totali riguarda la riduzione di produttività relativa alla perdita di lavoro dei pazienti (26,2%) e quella principale legata all'assistenza (52,6%) (Ministero della Salute, 2011). Dall'indagine emerge, dunque, che il peso dell'assistenza ricade in maniera considerevole sulle famiglie e che esiste un peso più complessivo pagato dalla collettività: questo rende sempre più urgente e strategico l'avvio di una revisione dell'offerta di servizi e prestazioni, soprattutto sotto il profilo socio-assistenziale. L'ictus non è soltanto una malattia dell'anziano: circa 10.000 casi, ogni anno, in Italia riguardano soggetti con età inferiore ai 54 anni; tuttavia l'aumento dell'età rappresenta uno dei principali fattori di rischio, difatti il 75% di nuovi casi è rappresentato da soggetti di età superiore ai 75 anni (Sudlow & Warlow, 1997). In aggiunta all'avanzare dell'età, anche l'ipertensione rappresenta un importante fattore di rischio dal momento che in soggetti ipertesi il rischio per questa patologia raddoppia rispetto ai soggetti normotesi (Lloyd-Jones *et al.*, 2010). Altri fattori che contribuiscono all'incidenza dell'ictus sono il diabete mellito e la dislipidemia, oltre che fattori legati allo stile di vita come l'obesità, il fumo di sigaretta e l'eccessivo consumo di alcol (Tabella 1-1). Alcuni

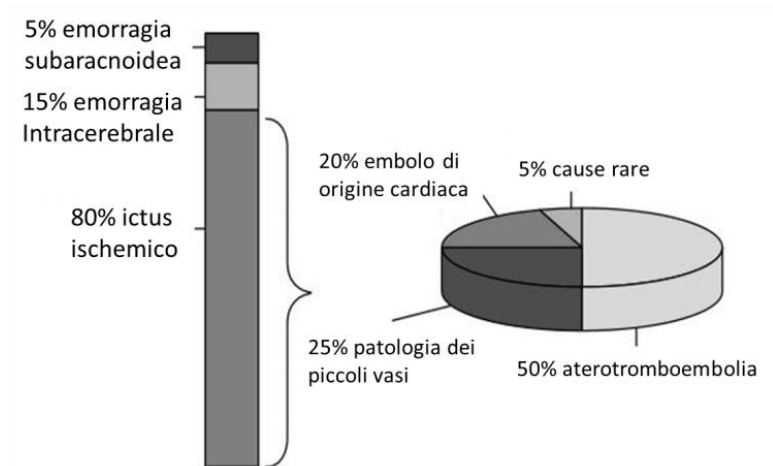
fattori di rischio non possono essere modificati, come la predisposizione familiare per patologie cerebrovascolari, l'età avanzata, la razza e il sesso (Allen & Bayraktutan, 2008).

**Tabella 1-1:** Principali fattori di rischio modificabili per l'ictus ischemico.

<b>Classificazione</b>	<b>Fattore di rischio</b>	<b>Referenze</b>
Causale	Iperensione	(Lawes <i>et al.</i> , 2004a)
	Diabete	(Lawes <i>et al.</i> , 2004b)
	Ipercolesterolemia	(Amarenco <i>et al.</i> , 2006)
	Fumo di sigaretta	(Bonita <i>et al.</i> , 1999)
	Fibrillazione atriale	(Hart <i>et al.</i> , 1999)
	Patologia cardiaca valvolare	(Kizer <i>et al.</i> , 2005)
	Cardiomiopatia ischemica	(Loh <i>et al.</i> , 1997)
	Stenosi carotidea	(Rothwell <i>et al.</i> , 2003)
Probabile	Iperomocisteinemia	(Wald <i>et al.</i> , 2002)
	Aumento del fibrinogeno	(Rothwell <i>et al.</i> , 2004)
	Dislipidemia	(Holme <i>et al.</i> , 2009)
	Forame ovale pervio	(Nedeltchev <i>et al.</i> , 2008)
	Apnea notturna ostruttiva	(Culebras, 2009)
	Indice di massa corporea	(Hu <i>et al.</i> , 2007)
	Inattività fisica	(Hu <i>et al.</i> , 2005)
	Stress psicosociale	(Simons <i>et al.</i> , 1998)

I fattori di rischio hanno importanti effetti sulla struttura e sulla funzione dei vasi sanguigni. Molti di questi fattori alterano la struttura vascolare promuovendo l'aterosclerosi e l'irrigidimento delle arterie e inducendo il restringimento, l'ispessimento e la tortuosità delle arteriole e dei capillari (Allen & Bayraktutan, 2008;

Iadecola & Davisson, 2008). Nel cervello, questi cambiamenti morfologici sono spesso associati ad una riduzione del flusso ematico cerebrale (CBF) e a marcate alterazioni nella sua regolazione. L'età, l'ipertensione, il diabete e l'ipercolesterolemia alterano meccanismi adattativi vitali che assicurano al cervello un'adeguata perfusione (Iadecola *et al.*, 2009). L'abilità dell'endotelio di regolare il flusso nei microvasi risulta compromessa e l'aumento del flusso ematico evocato dall'attività neuronale non è adeguato portando ad uno squilibrio tra l'energia fornita al cervello e la richiesta (Iadecola & Davisson, 2008). Alcuni fattori di rischio, come l'ipertensione e il diabete, danneggiano i meccanismi vascolari protettivi che mantengono il CBF stabile in caso di riduzione della pressione ematica (autoregolazione cerebrovascolare), facilitando eventi ischemici se si abbassa la pressione intravascolare (Kim *et al.*, 2008). Queste alterazioni vascolari aumentano la vulnerabilità del cervello all'ischemia in seguito all'occlusione di un'arteria perché risulta compromesso il mantenimento del flusso da parte dei vasi collaterali che originano dai territori adiacenti non ischemici. In aggiunta ai loro effetti vascolari, alcuni fattori di rischio, come l'età e il diabete, possono aumentare la suscettibilità intrinseca del cervello all'insulto cellulare, amplificando il danno tissutale prodotto dall'ischemia (Biessels *et al.*, 2002), sebbene le basi biologiche di quest'effetto non siano state ancora chiarite. La riduzione del flusso cerebrale che causa l'ictus può derivare da un'emorragia o dall'occlusione di un vaso cerebrale. Lo stroke può, quindi, essere suddiviso in due tipi: ischemico, corrispondente a circa l'80% dei casi, o emorragico (Fig. 1-1) (Warlow *et al.*, 2003).

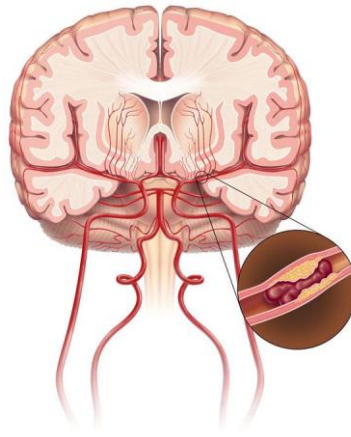


**Figura 1-1: Principali cause di ictus nelle popolazioni caucasiche e sottotipi di ictus ischemico.**

L'ipertensione, l'eccessivo consumo di alcol e il fumo di sigaretta sono importanti fattori di rischio per l'ictus emorragico (Feigin *et al.*, 2005). Questo tipo di stroke può derivare da un'emorragia subaracnoidea o da un'emorragia intracerebrale primaria (la seconda tipologia è la più diffusa, rappresentando circa il 75% di tutti i casi) (Warlow *et al.*, 2003). L'emorragia subaracnoidea deriva dalla rottura di un aneurisma intracranico e porta ad un accumulo di sangue nello spazio subaracnoideo che è situato tra l'aracnoide e la pia madre. Il grado di mortalità è alto e in circa un terzo dei pazienti con emorragia subaracnoidea la stessa emorragia si estende nel parenchima. In questi casi la mortalità è ancora più alta, mentre risulta molto basso il recupero funzionale (Liu & Rinkel, 2011). L'emorragia intracerebrale primaria può derivare dalla rottura di microaneurismi localizzati all'interno degli emisferi cerebrali e si riscontra più frequentemente in pazienti ipertesi; il grado di mortalità è del 50% entro un mese dall'evento iniziale (Donnan *et al.*, 2008). Nei paesi occidentali, l'ictus ischemico causa il 10-12% di tutte le morti (Brouns & De Deyn, 2009).



L'occlusione di un'arteria cerebrale deriva molto spesso dalla formazione di una placca aterosclerotica, da un trombo (Fig. 1-2) o da un embolo.



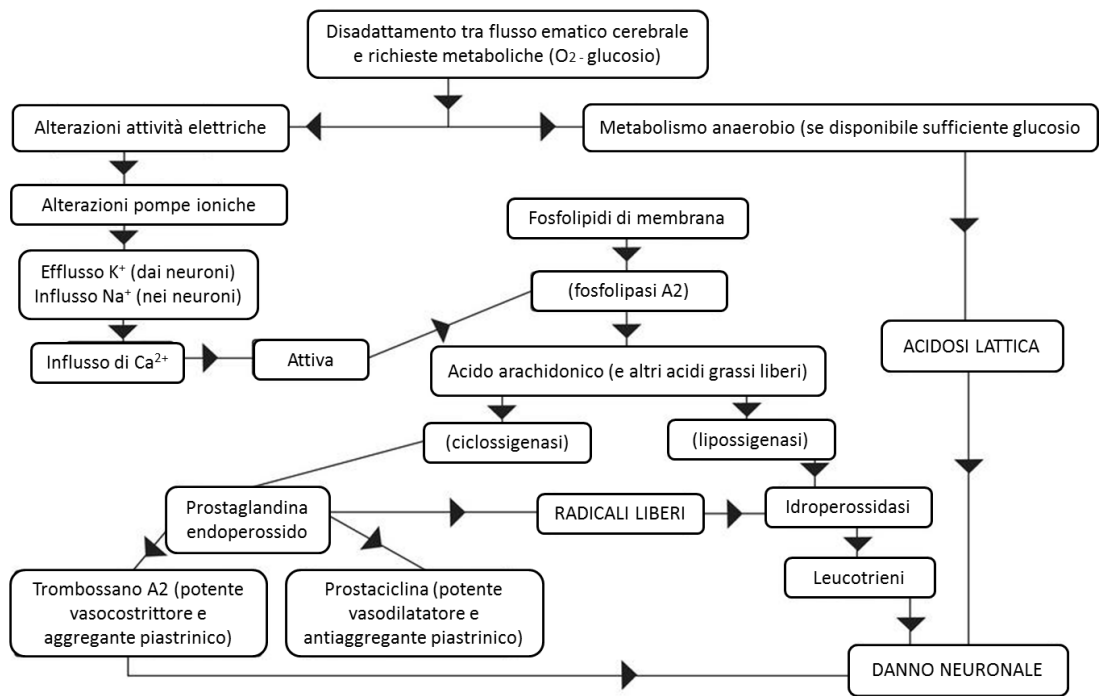
**Figura 1-2: Illustrazione schematica dell'ictus ischemico.** L'ictus ischemico si genera quando, all'interno di un'arteria cerebrale, si forma un coagulo di sangue, il trombo, che restringe il lume vascolare. Questo processo può interrompere completamente il rifornimento nutritivo all'area cerebrale irrorata dall'arteria occlusa.

La riduzione del flusso ematico può essere transitoria o permanente e il territorio dell'arteria cerebrale occlusa determina i sintomi mostrati dal paziente. Il 50% degli ictus ischemici è il risultato diretto di una malattia aterotrombotica di vasi extra- o intra-cranici, sebbene i grossi vasi intracranici siano meno comunemente implicati nella formazione del trombo (Warlow *et al.*, 2003). Il sito di occlusione è rappresentato spesso da punti di biforcazione del sistema arterioso, dove il flusso risulta più turbolento e le pareti dei vasi più indebolite. Il 20% degli ictus ischemici sono causati da emboli di origine cardiaca. Esistono varie cause di emboli cardiaci, tra queste la più comune è rappresentata dalla fibrillazione atriale (Warlow *et al.*, 2003). Altre cause includono la patologia valvolare cardiaca e il forame ovale pervio, sebbene ci siano state difficoltà nello stabilire una relazione causale tra quest'ultima condizione ed eventi ischemici ricorrenti (Almekhlafi *et al.*, 2009). Un quarto di tutti

gli stroke ischemici deriva dall'occlusione di piccoli vasi intracranici. Questi vasi di piccolo calibro ( $\leq 400 \mu\text{m}$ ) penetrano in profondità nel tessuto cerebrale e la risultante tortuosità li rende suscettibili all'occlusione da parte di micro-trombi e depositi di fibrina (Ogata *et al.*, 2011).

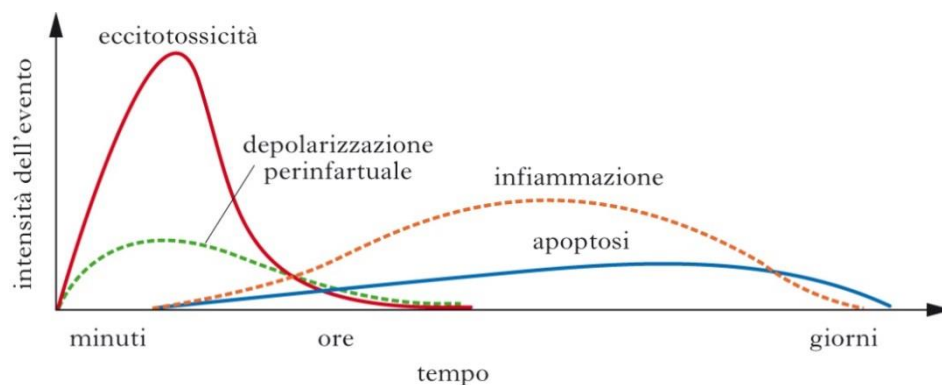
## 1.2 Fisiopatologia dell'ischemia cerebrale

La serie di processi neurochimici scatenati dall'occlusione di un vaso cerebrale viene definita "cascata ischemica" ed è caratterizzata da un numero eterogeneo di eventi che evolve nel tempo e nello spazio (Fig. 1-3). In seguito all'insulto ischemico, le alterazioni del flusso ematico nelle aree interessate dall'occlusione vascolare determinano una ridotta disponibilità di ossigeno e substrati metabolici ai neuroni causando una riduzione dei livelli di ATP e una insufficiente produzione di energia. Il deficit di glucosio e ossigeno che si verifica in seguito ad un'occlusione vascolare severa è alla base dei meccanismi che portano alla morte cellulare. Questi meccanismi includono: squilibrio ionico, rilascio eccessivo di glutammato nello spazio extracellulare, incremento massiccio del calcio intracellulare che a sua volta induce disfunzione mitocondriale e stress ossidativo. Sebbene esistano numerosi substrati alternativi al glucosio come il glicogeno, il lattato e gli acidi grassi, l'ossigeno risulta indispensabile per la fosforilazione ossidativa mitocondriale, la principale fonte di ATP nei neuroni.



**Figura 1-3: La cascata ischemica.** Il diagramma illustra la serie di eventi della cascata ischemica che si verifica in seguito all'insulto ischemico. Il risultato finale di questo processo è il danno cellulare a carico dei neuroni.

La riduzione dell'ATP stimola il metabolismo glicolitico del glucosio e del glicogeno residui causando un accumulo di protoni e lattato che porta ad una rapida acidificazione intracellulare e alla deplezione di ATP (Martin *et al.*, 1994). In assenza di ATP la funzionalità della  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi viene compromessa (Katsura *et al.*, 1994).



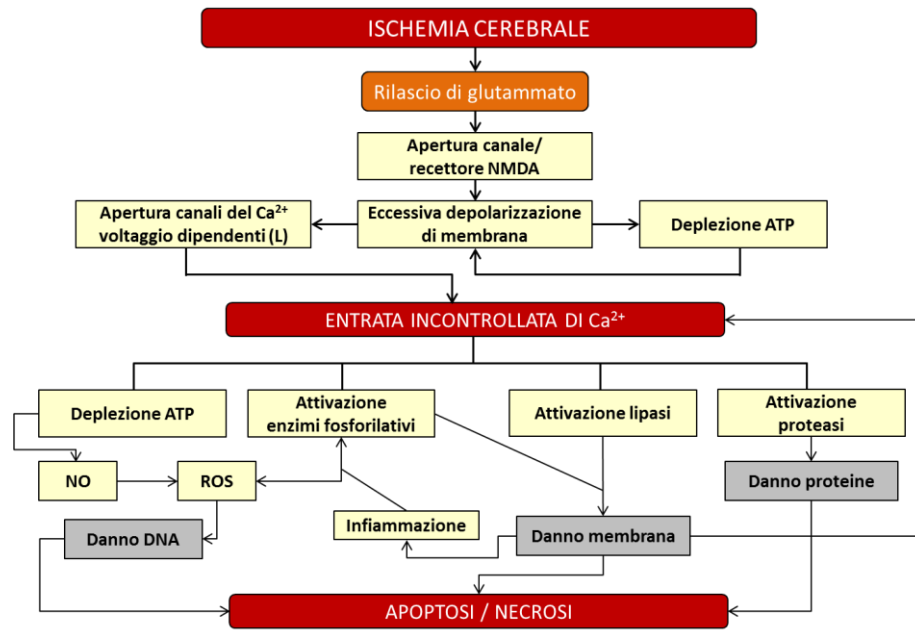
**Figura 1-4: Evoluzione temporale degli eventi scatenati da un insulto ischemico.**

Dopo pochi minuti dall'ischemia, si ha un'importante perdita dei gradienti ionici e la depolarizzazione di neuroni e astrociti (Hansen & Nedergaard, 1988). Ciò porta all'attivazione dei canali al calcio voltaggio-dipendenti con conseguente eccessivo rilascio di amminoacidi eccitatori, particolarmente glutammato, nel compartimento extracellulare. Allo stesso tempo, il recupero del neurotrasmettitore dallo spazio extracellulare risulta ridotto (Rossi *et al.*, 2000). L'aumento della concentrazione del glutammato extracellulare inizia un ciclo a feedback positivo con ulteriore attivazione dei suoi recettori e conseguente ingresso di  $\text{Na}^+$  nei neuroni attraverso canali ionici (Choi & Rothman, 1990). I trasportatori del glutammato nei neuroni e negli astrociti iniziano a funzionare al contrario, rilasciando glutammato nello spazio extracellulare e promuovendo l'eccitotossicità.

### 1.2.1 Eccitotossicità mediata dal glutammato

L'eccitotossicità è considerata un meccanismo centrale alla base della morte neuronale nello stroke (Siesjo *et al.*, 1995) e la sua importanza è stata studiata sia in modelli sperimentali di ischemia cerebrale (Arundine & Tymianky, 2004) che nei pazienti ischemici (Castillo *et al.*, 1997). La quantità di glutammato rilasciato a livello extracellulare è correlata con l'iniziale deterioramento neurologico nei pazienti con ictus ischemico (Castillo *et al.*, 1997). Concentrazioni di glutammato superiori a 8,2 mmol/l nel CSF o superiori a 200mmol/l nel plasma risultano associate al danno neurologico nella fase acuta dell'infarto cerebrale. I meccanismi eccitotossici che portano alla morte neuronale sono complessi, ma coinvolgono innanzitutto la produzione di radicali liberi (Oh & Betz, 1991), la disfunzione mitocondriale (Nicholls & Budd, 1998) e la partecipazione di vari fattori di trascrizione come

attivatori dell'espressione genica (Clemens, 2000). Tutti questi meccanismi agiscono simultaneamente provocando un danno a livello delle proteine, dei lipidi e del DNA (Cui *et al.*, 2000), con conseguente deterioramento dell'architettura cellulare e morte delle cellule (Ünal-Çevik *et al.*, 2004) (Fig. 1-5). Gli effetti eccitatori del glutammato sono mediati principalmente dai recettori ionotropici di tipo NMDA permeabili al  $\text{Ca}^{2+}$  (Waxman & Lynch, 2005). Questi recettori possono avere una localizzazione sia sinaptica che extra-sinaptica e la differente localizzazione sulla membrana cellulare è considerata un fattore determinante nell'eccitotossicità in seguito ad insulto ischemico (Liu *et al.*, 2007). Diverse evidenze suggeriscono come l'attività dei recettori NMDA sinaptici sia necessaria per la sopravvivenza neuronale mentre i recettori extra-sinaptici sono coinvolti nella morte cellulare dal momento che la loro stimolazione porta all'espressione di proteine pro-apoptotiche e alla soppressione delle vie di sopravvivenza (Léveillé *et al.*, 2008). Alcune evidenze suggeriscono come l'attività deleteria di questi recettori sia anche determinata dalle molecole con cui interagiscono (Sattler *et al.*, 1998). Ad esempio i recettori NMDA sono collegati alla nNOS attraverso il primo e il secondo dominio PDZ della PSD-95. L'attivazione della nNOS ad opera di questi recettori porta alla produzione di elevati livelli di ossido nitrico (Sattler *et al.*, 1999).



**Figura 1-5: Eccitotossicità mediata dal glutammato.** Il diagramma illustra le varie fasi dell'eccitotossicità mediata dal rilascio eccessivo di glutammato in seguito all'insulto ischemico. Il conseguente ingresso incontrollato di calcio nelle cellule porta all'attivazione di una serie di enzimi che inducono danni a carico del DNA, delle proteine e delle membrane con conseguente morte cellulare.

L'ossido nitrico funziona da substrato per la produzione di radicali liberi altamente reattivi come i perossinitriti che promuovono il danno cellulare e in definitiva la morte neuronale (Moro *et al.*, 2004). Durante l'ischemia cerebrale, l'influsso di ioni calcio attraverso i recettori NMDA promuove la morte cellulare più efficientemente rispetto all'influsso attraverso altri canali (Arundine & Tymianski, 2003), suggerendo che le proteine responsabili dell'eccitotossicità calcio-dipendente risiedono nei complessi di segnale di questi recettori. È stato dimostrato che inibendo le interazioni NMDAR/PSD-95 si previene il danno cerebrale ischemico mentre rimangono intatte le funzioni fisiologiche di questi recettori (Sun *et al.*, 2008). Rimane poco chiaro se la morte neuronale sia associata anche alle diverse tipologie di subunità dei recettori NMDA o sia dipendente unicamente dalla localizzazione dei recettori. I tentativi di mitigare l'eccitotossicità hanno avuto numerosi bersagli che vanno dall'inibizione del

rilascio del glutammato al blocco dei suoi recettori. Uno dei target più studiati è il recettore NMDA postsinaptico, il cui blocco determina riduzione dell'influsso cellulare di calcio. Tra gli antagonisti non competitivi è utile ricordare l'MK-801 e l'Aptiganel, entrambi efficaci nei modelli preclinici (Ginsberg, 1995), ma risultati fallimentari nei trial clinici. Quando l'aptiganel è stato testato in volontari nell'*Aptiganel Acute Stroke Trial*, la massima dose tollerata è risultata essere assai più bassa rispetto alla dose neuroprotettiva studiata negli animali. Tra gli antagonisti competitivi, il selfotel, somministrato entro 5 minuti dall'inizio di MCAo nei ratti, ha determinato una riduzione significativa del volume di infarto. Tuttavia, quando testato nei trial clinici, il selfotel ha mostrato eccessiva tossicità. Sono stati studiati anche gli effetti di antagonisti del sito della glicina sul recettore NMDA come il gavestinel (*GAIN International Trial*), ma anche in questo caso gli effetti benefici osservati negli studi pre-clinici non sono stati poi confermati nel trial clinico (Albers *et al.*, 2001; Lees *et al.*, 2000).

Una delle cause dei fallimenti va ricercata nel fatto che in tutti gli studi pre-clinici gli antagonisti NMDA sono stati utilizzati a tempi molto precoci rispetto all'inizio dell'insulto, mentre in clinica esiste l'esigenza di somministrare il farmaco in una finestra temporale più ampia. Un secondo motivo è legato al fatto che nei trial clinici non è stato possibile somministrare le stesse dosi di farmaco risultate efficaci negli animali a causa dei loro effetti tossici (Dawson *et al.*, 2001). Inoltre, sebbene il blocco di questi recettori possa avere effetti benefici nell'ischemia cerebrale, vanno presi in considerazione gli effetti deleteri associati all'inibizione dei meccanismi di sopravvivenza e di plasticità neuronale mediati dal glutammato (Hoyte *et al.*, 2004).

### 1.2.2 Effetti del calcio intracellulare

Il calcio gioca un ruolo critico nella cascata eccitotossica e, in effetti, la rimozione del calcio dallo spazio extracellulare o il blocco dell'ingresso dello ione nei mitocondri mediante l'utilizzo di disaccoppianti (Stout *et al.*, 1998) proteggono i neuroni dall'insulto eccitotossico. Numerose evidenze indicano come l'alterazione dell'omeostasi cellulare del calcio sia di primaria importanza nella morte neuronale ischemica (Sattler & Tymiansky, 2000). La sostenuta stimolazione dei recettori NMDA porta all'influsso di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^{+}$  nei neuroni post-sinaptici, con i livelli di calcio citoplasmatico che possono raggiungere i 50-100  $\mu\text{M}$ . Questi livelli elevati di calcio attivano una serie di cascate neurotossiche (Orrenius *et al.*, 2003) come l'attivazione e la stimolazione di proteasi, lipasi, fosfatasi e endonucleasi. Come risultato si ha l'attivazione di diverse vie di segnale che portano alla produzione di radicali liberi, disfunzione mitocondriale, distruzione della membrana cellulare e frammentazione del DNA, quindi si arriva in definitiva alla morte neuronale (Nicholls, 2009). La disfunzione mitocondriale è causata sia dallo stress ossidativo che da un effetto diretto dei livelli eccessivi di  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare. In condizioni di eccesso di calcio nella cellula, i mitocondri risultano importanti per la sopravvivenza cellulare, dal momento che sono in grado di sequestrare grosse quantità di questo ione. Questo processo, nei neuroni intatti, dura poco tempo; infatti il calcio viene nuovamente rilasciato nel citoplasma quando la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasi è nuovamente in grado di pompare fuori dalla cellula il calcio. Durante l'ischemia cerebrale, il calcio si accumula rapidamente nei mitocondri e questo stato persiste per diverse ore (Zaidan & Sims, 1994) causando disfunzione mitocondriale, che è considerato l'evento primario nella morte neuronale su base eccitotossica. La nimodipina è un antagonista del canale



per il calcio con effetti a livello neuronale ed è, in aggiunta, un vasodilatatore selettivo per i vasi cerebrali. Il farmaco è stato testato su modelli animali in oltre 250 studi, di cui solo 20 prevedevano la somministrazione della nimodipina dopo l'induzione dell'ischemia (Horn *et al.*, 2001b). I dati ottenuti sono risultati contrastanti e non sempre si sono osservati degli effetti benefici per quanto riguarda l'estensione del danno ischemico. La scarsa efficacia del farmaco è stata confermata nel trial clinico VENUS (Horn *et al.*, 2001a).

### 1.2.3 Danno indotto dallo stress ossidativo

Lo stress ossidativo riveste un ruolo di primaria importanza nell'induzione del danno ischemico (Lin & Beal, 2006). I più importanti radicali liberi indotti dall'eccitotossicità derivano dall'ossigeno (ROS) e dall'ossido nitrico (RNS). Nell'ischemia cerebrale e, in particolare, in seguito alla riperfusione, si ha un'eccessiva produzione di radicali superossido e ossidrilico che sono direttamente coinvolti nel danno alle macromolecole cellulari, come i lipidi, le proteine e gli acidi nucleici. La riossigenazione durante la riperfusione fornisce l'ossigeno necessario per la vitalità neuronale ma anche l'ossigeno come substrato per numerose reazioni di ossidazione enzimatica che producono ossidanti reattivi. ROS e RNS possono, anche indirettamente, contribuire al danno tissutale mediante l'attivazione di diverse vie cellulari che portano all'espressione di geni sensibili allo stress e proteine che a loro volta causano un insulto ossidativo (Akins *et al.*, 1996). Fonti intracellulari di ROS includono la catena di trasporto di elettroni mitocondriale (ETC), la xantina ossidasi, l'acido arachidonico e le NADPH ossidasi. La produzione di ROS nei mitocondri determina il non corretto funzionamento della ETC con conseguente riduzione della

produzione di ATP. La NADPH ossidasi è la principale fonte di superossido in seguito all'attivazione dei recettori NMDA (Suh *et al.*, 2008). Inoltre, durante la fase ischemica, alcuni enzimi calcio-dipendenti, come la fosfolipasi A2 (PLA2) e la ciclossigenasi, producono radicali liberi dell'ossigeno. I livelli di PLA2 aumentano nel cervello entro pochi minuti dall'inizio dell'ischemia portando al rilascio di acido arachidonico dai fosfolipidi e alla sua metabolizzazione in eicosanoidi con concomitante produzione di radicali liberi (Muralikrishna *et al.*, 2006). Durante l'ischemia la produzione di NO aumenta considerevolmente nel cervello in seguito all'attivazione delle isoforme neuronale e inducibile della nitrossido sintasi. Il radicale NO si combina con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ossigeno radicalico per formare il radicale ossidrilico e il perossinitrito contribuendo al danno cerebrale. Numerosi composti antiossidanti sono stati testati nel tentativo di ridurre gli effetti deleteri di queste specie radicaliche durante l'insulto ischemico. L'NXY-059 si è dimostrato efficace in modelli sperimentali di ischemia cerebrale (Kuroda *et al.*, 1999). Tuttavia, la scarsa potenza di questo composto rappresenta il principale motivo dei fallimenti dei trial clinici (SAINT I e II) (Shuaib *et al.*, 2007). Il tirilazad, un composto che inibisce la perossidazione lipidica, è stato testato senza successo in 6 trial per il trattamento dello stroke (*Tirilazad International Steering Committee*, 2001). Infine, l'edaravone, uno scavenger dei radicali liberi dell'ossigeno e bloccante della perossidazione lipidica, ha mostrato buoni risultati in numerosi studi preclinici (Watanabe *et al.*, 1994). Risultati promettenti si sono ottenuti anche in un trial clinico (*Edaravone Acute Infarction Study*, 2003), in cui si è osservato un miglioramento dell'outcome di pazienti ischemici.

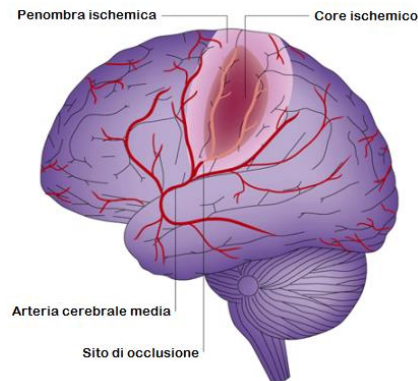
**Tabella 1-2:** Esempi di composti falliti nella valutazione clinica per il trattamento dello stroke

<b>Composto</b>	<b>Meccanismo</b>	<b>Outcome (Fase)</b>	<b>Motivazione</b>
Selfotel	Antagonista recettore NMDA	Negativo (III)	Eventi avversi
Aptiganel	Antagonista recettore NMDA	Negativo (III)	Mancanza di efficacia
Gavestinel	Antagonista sito glicina	Negativo (III)	Mancanza di efficacia
Eliprodil	Bloccante sito poliammine, NMDA	Negativo (II)	Eventi avversi
Magnesio solfato	Bloccante canale NMDA	Negativo (III)	Mancanza di efficacia
Cervene	Antagonista recettore kappa oppioide	Negativo (III)	Mancanza di efficacia
Lubeluzolo	Inibitore NOS e bloccante canale Na <sup>+</sup>	Negativo (III)	Mancanza di efficacia
BMS-204352	Bloccante canale K <sup>+</sup>	Negativo (III)	Mancanza di efficacia
Calcio antagonisti	Antagonisti canale Ca <sup>2+</sup>	Negativo	Mancanza di efficacia
Tirilazad	Inibitore perossidazione lipidica	Negativo (III)	Mancanza di efficacia
Ebselen	Inibitore perossidazione lipidica	Negativo (II)	Mancanza di efficacia

#### 1.2.4 Morte cellulare

In seguito ad un evento ischemico i neuroni muoiono attraverso due meccanismi principali, la necrosi, prevalente nel core, e l'apoptosi, più diffusa nella penombra (Fig. 1-6). La necrosi è un processo che non richiede un consumo di energia ed è indipendente dalla sintesi proteica. È caratterizzato da disfunzione della membrana e rigonfiamento cellulare e, generalmente, induce una risposta infiammatoria. Al contrario, l'apoptosi è un meccanismo energia- dipendente (Choi,

1996) che richiede un'attiva trascrizione genica e sintesi proteica per degradare il DNA delle cellule interessate.



**Figura 1-6: Core e penombra nel cervello ischemico.** In seguito all'occlusione di un vaso cerebrale, nella maggior parte dei casi l'arteria cerebrale media, nel territorio del vaso occluso si individua una regione severamente ipoperfusa, definita *core* circondata da una zona ancora metabolicamente attiva, detta penombra. Quest'ultima rappresenta il tessuto ancora recuperabile con un intervento terapeutico.

Morfologicamente l'apoptosi è caratterizzata da modificazioni nucleari come la condensazione della cromatina e le successive marginalizzazione, segregazione e frammentazione (Snider *et al.*, 1999). Nelle fasi finali si ha la formazione dei corpi apoptotici con perdita dell'architettura cellulare mediata dall'attività di caspasi e altri sistemi enzimatici. Le caspasi appartengono ad una famiglia di proteasi che clivano le proteine strutturali del citoscheletro e del nucleo e proteine di riparazione del DNA. Un'aumentata espressione ed attivazione cerebrale delle caspasi 3, 8 e 9 è stata osservata, come evento che precede la morte neuronale, in diversi modelli di ischemia focale transitoria (Namura *et al.*, 1998; Hermann *et al.*, 2001), ischemia focale permanente (Velier *et al.*, 1999; Sasaki *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2001) ed ischemia globale (Ni *et al.*, 1998; Ouyang *et al.*, 1999). Entrambe le vie apoptotiche, intrinseca ed estrinseca, sono coinvolte nell'ischemia cerebrale (Guan *et al.*, 2006). La via

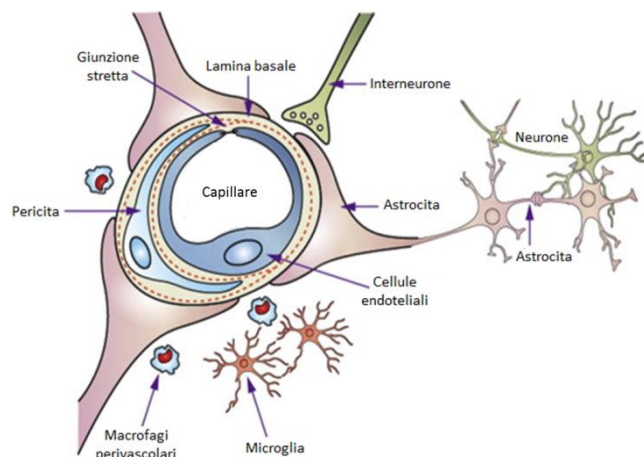
intrinseca scaturisce dal danno mitocondriale, con aumento della permeabilità di questo organello e fuoriuscita del citocromo c, con conseguente formazione dell'apoptosoma e morte cellulare mediata dalle caspasi 9 e 3. La proteina proapoptotica Bax gioca un ruolo essenziale nella permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna durante l'ischemia ed è stata suggerita come potenziale target terapeutico (Wang *et al.*, 2010). Nella via estrinseca, il legame di FasL al recettore di morte Fas porta alla dimerizzazione, clivaggio e attivazione della caspasi 8 e quindi all'apoptosi. Negli ultimi anni sono state proposte altre modalità con cui le cellule possono andare incontro a morte nello stroke, considerando le due modalità classiche di morte cellulare, necrosi e apoptosi, come gli estremi di un continuum di meccanismi. Una di queste forme è stata definita "necroptosi". In questo caso il recettore Fas attiva vie alternative a quella estrinseca, portando all'autofagia (Degterev *et al.*, 2005), un meccanismo di morte cellulare che è stato implicato nell'ischemia cerebrale (Adhami *et al.*, 2006). L'inibizione delle caspasi è un altro potenziale per controllare il processo apoptotico e migliorare l'esito di un evento ischemico (Nuttall *et al.*, 2001). Le caspasi sono proteasi, inizialmente sintetizzate nella forma di procaspasi, che vengono rapidamente attivate in risposta ai primi eventi della cascata apoptotica come la formazione dell'apoptosoma o l'attivazione del segnale del recettore di morte (Robertson *et al.*, 2000). L'attivazione delle caspasi porta alla frammentazione del DNA attraverso il clivaggio e l'inattivazione dell'inibitore della DNAsi attivata dalle caspasi (Joly *et al.*, 2004). Topi geneticamente ingegnerizzati per esprimere dominanza negativa per la caspasi 1 risultano resistenti al danno cerebrale ischemico (Friedlander *et al.*, 1997) e l'attivazione della caspasi 3 precede di diverse ore la frammentazione del DNA

rinforzando così il ruolo della morte neuronale caspasi dipendente nel cervello ischemico (Endres *et al.*, 1998). L'esecuzione del programma di morte prevede la preventiva traslocazione del citocromo c dal mitocondrio al citosol, dove determina l'oligomerizzazione del fattore di attivazione dell'apoptosi (Apaf-1) e l'attivazione della pro-caspasi 9 (Krajewski *et al.*, 1999) con conseguente formazione dell'apoptosoma e successiva attivazione della pro-caspasi 3 (Li *et al.*, 1997). Tale sequenza di eventi, appartenenti alla cosiddetta via mitocondriale (o intrinseca) di attivazione dell'apoptosi (Kroemer & Reed, 2000), è stata documentata sia in modelli sperimentali di ischemia cerebrale transitoria che permanente (Dirnagl *et al.*, 1999). Tuttavia, è stato recentemente riportato come in corso di ischemia focale transitoria si verifichi la precoce attivazione della caspasi 8 (Yin *et al.*, 2002) suggerendo come in tali condizioni sperimentali un ruolo importante possa anche essere svolto dalle caspasi appartenenti alla via estrinseca (recettoriale) di attivazione dell'apoptosi e collocate a monte della traslocazione del citocromo e successiva attivazione a valle delle caspasi (9 e 3) esecutrici. Evidenze sperimentali documentano come inibitori peptidici delle caspasi esecutrici riducono sia il volume dell'infarto cerebrale che il deficit neurologico conseguente (Endres *et al.*, 1998) aprendo nuove prospettive per lo sviluppo clinico di tali farmaci per la neuroprotezione in corso di ischemia cerebrale.

#### 1.2.5 Alterazioni a carico della barriera emato-encefalica

La barriera emato-encefalica (BEE) è una struttura endoteliale del cervello altamente specializzata che è localizzata all'interfaccia tra la circolazione periferica e il sistema nervoso centrale (SNC). Le principali funzioni della BEE sono quelle di assicurare un costante rifornimento di nutrienti al cervello e, allo stesso tempo, di

limitare il movimento paracellulare dei soluti idrofilici e la migrazione trans-endoteliale di cellule ematiche circolanti e di agenti patogeni. Le cellule endoteliali del cervello differiscono dalle altre per la presenza delle cosiddette “*tight junctions*” (TJ) intercellulari che conferiscono alla BEE le sue caratteristiche di bassa permeabilità paracellulare e alta resistenza elettrica transendoteliale (TEER) (Zlokovic, 2008). Nelle immediate vicinanze delle cellule endoteliali cerebrali, periciti, cellule gliali (astrociti e microglia) e neuroni, insieme alla lamina basale, formano un’unità funzionale chiamata unità neurovascolare (Fig. 1-7). La stretta interazione tra i diversi tipi cellulari è alla base delle effettive regolazioni paracrine che sono importanti per il mantenimento dell’omeostasi cerebrale.



**Figura 1-7: Rappresentazione schematica dell’unità neurovascolare.** Le cellule endoteliali capillari, insieme ai periciti, sono circondate dalla lamina basale e dalla terminazioni perivascolari degli astrociti. Gli astrociti inoltre provvedono alle interazioni cellulari con i neuroni.

In condizioni ischemiche, la barriera emato-encefalica risulta danneggiata, con un’ aumentata permeabilità paracellulare che contribuisce direttamente alla formazione dell’edema cerebrale, alla trasformazione emorragica e all’ aumentata mortalità. Diversi meccanismi contribuiscono al danno ischemico della BEE, danno che sembra

essere di natura bifasica (Belayev *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1999). Entro due ore dall'inizio dell'ischemia la lamina basale endoteliale comincia a dissolversi (Hamann *et al.*, 1995); questo evento è rapidamente seguito da un aumento della permeabilità della BEE. Una precoce ri-perfusione può temporaneamente alleviare le alterazioni della BEE, ma l'utilizzo della terapia trombolitica e la ri-perfusione tardiva possono, al contrario, esacerbare l'insulto endoteliale (Kidwell *et al.*, 2008; Hjort *et al.*, 2008). Il fenomeno multi-fasico di questo cambiamento di permeabilità è determinato da vari fattori come la durata dell'ischemia, il grado di ri-perfusione e il modello sperimentale di ischemia utilizzato. L'aumento della permeabilità paracellulare è generalmente associato all'alterazione dell'espressione delle TJ e/o alla redistribuzione delle stesse lungo la membrana cellulare. È stato dimostrato che una riduzione del TEER è accompagnata da una ridotta espressione di claudina-5 in condizioni ipossiche (Koto *et al.*, 2007) con conseguente aumento della permeabilità paracellulare. In risposta all'ischemia cerebrale, l'accumulo di bradichinina, del fattore di crescita dell'endotelio vascolare e di trombina porta ad un incremento della concentrazione di calcio intracellulare, il cui principale effetto sulle cellule endoteliali è l'attivazione della chinasi della catena leggera della miosina calcio/calmodulina dipendente (MLCK) (Goekeler & Wysolmerski, 1995). Anche lo stress ossidativo rappresenta uno stimolo iniziale per la rottura della BEE e innesca il rilascio di metalloproteasi della matrice (MMP)-9 da neuroni, astrociti, periciti e cellule endoteliali portando alla digestione della lamina basale endoteliale. In una fase più tardiva risulta evidente un severo danno a carico della BEE dovuto a meccanismi più complessi come l'induzione di citochine proinfiammatorie, chemochine e molecole di adesione espresse sull'endotelio attivato (Huang *et al.*, 2006). L'espressione di citochine e



molecole di adesione precede l'infiltrazione di leucociti che, insieme alla microglia, aumentano ulteriormente le risposte infiammatorie e la produzione di radicali liberi tossici (Huang *et al.*, 2006; Lo *et al.*, 2003). La BEE danneggiata permette la fuoriuscita di costituenti ematici nel parenchima cerebrale. La perdita di componenti ad elevato peso molecolare, che è seguita per osmosi dall'acqua, porta ad edema vasogenico e ipertensione intracranica. In aggiunta, la fuoriuscita di eritrociti può determinare la trasformazione emorragica dell'area infartuata. L'ischemia ha come bersaglio anche il microcircolo, che contribuisce al danno tissutale cerebrale mediante un'aumentata permeabilità delle cellule endoteliali, la degradazione della matrice e la perdita di autoregolazione, cioè l'incapacità del letto cerebrovascolare di mantenere una perfusione costante nonostante cambiamenti della pressione sanguigna (Paulson *et al.*, 1990). L'insulto endoteliale riduce il rilascio di ossido nitrico e prostaciclina e può indurre la produzione di endotelina-1. Questi processi portano ad un aumento del tono vascolare con conseguente ulteriore riduzione del flusso ematico nell'area di infarto e nei vasi collaterali (Andresen *et al.*, 2006). In seguito ad ischemia focale, il microcircolo cerebrale dà inizio ad una serie di risposte dinamiche, tra cui la presentazione dei recettori di adesione dei leucociti sulle cellule endoteliali (del Zoppo & Mabuchi, 2003). Questo rappresenta uno step fondamentale non soltanto nella risposta infiammatoria post-ischemica, ma contribuisce anche al cosiddetto fenomeno "no-reflow", cioè all'ostruzione del microcircolo in seguito a riperfusione. Esso è attribuito alla compressione estrinseca associata all'edema e all'accumulo di leucociti e piastrine nei vasi (Okada *et al.*, 1994).

### 1.2.6 La risposta infiammatoria

Il sistema nervoso centrale è stato a lungo considerato un'entità immunologicamente privilegiata, con una fine regolazione, ad opera della BEE, dell'influsso di cellule immunitarie e altri mediatori dal compartimento vascolare al parenchima cerebrale. In seguito ad un evento ischemico, si sviluppa un'intensa risposta infiammatoria caratterizzata dall'attivazione della microglia e degli astrociti e dall'espressione di mediatori solubili quali citochine, chemochine e prostaglandine che determinano, a loro volta, un'aumentata espressione di molecole di adesione (Staunton *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 2000b) e un aumento della permeabilità della BEE con conseguente influsso di cellule immunitarie periferiche. Le molecole di adesione giocano un ruolo fondamentale nell'infiltrazione dei leucociti nel parenchima cerebrale dopo l'insulto ischemico e rappresentano, pertanto, importanti target terapeutici. L'interazione tra i leucociti e l'endotelio vascolare è mediata da tre principali gruppi di molecole di adesione cellulare: le selectine (P-selectina, E-selectina e L-selectina), la superfamiglia delle immunoglobuline (ICAM-1 e 2, VCAM-1) e le integrine (CD11a-c). Diversi studi hanno messo in evidenza come l'inibizione dell'adesione dei leucociti determina un ridotto insulto neurologico (Clark *et al.*, 1997) e la delezione o l'inibizione delle molecole di adesione sono associate a minori volumi di infarto in modelli di ischemia cerebrale (Soriano *et al.*, 1999; Mocco *et al.*, 2002; Lahmberg *et al.*, 2006; Kitagawa *et al.*, 1998; Prestigiacomo *et al.*, 1999). Ci sono molte evidenze che suggeriscono un importante ruolo dell'infiammazione e della risposta immunitaria sull'*outcome* di pazienti con ictus ischemico associate sia all'estensione del danno ischemico ma anche all'instaurarsi di meccanismi riparatori (Tabella 1-3). Poiché l'infiammazione ha un importante ruolo in tutte le fasi della

patologia ischemica ed è principalmente diretta dal sistema immunitario, quest'ultimo può rappresentare un utile target nel trattamento dell'ischemia cerebrale (Amantea *et al.*, 2013).

#### 1.2.6.1 Mediatori cellulari dell'infiammazione

La reazione infiammatoria indotta dall'insulto ischemico coinvolge tutte le componenti dell'unità neurovascolare, inclusi neuroni, cellule gliali e microvasi (del Zoppo, 2010). Subito dopo l'evento occlusivo, la reazione infiammatoria è innescata da alcuni processi quali l'attivazione intravascolare delle piastrine, del sistema del complemento e delle cellule endoteliali (Nieswandt *et al.*, 2011; Brennan *et al.*, 2012). L'aumentata espressione delle molecole di adesione, P-selectina e molecola di adesione intercellulare (ICAM)-1, porta all'attivazione dei leucociti polimorfonucleati che, insieme a piastrine e fibrina e a una ridotta biodisponibilità di ossido nitrico contribuiscono all'ostruzione dei microvasi (Wong & Crack, 2008). La fuoriuscita dei leucociti è promossa, anche, dalla rottura della BEE ad opera delle metalloproteasi e di altre proteasi rilasciate dai mastociti perivascolari e dalle citochine pro-infiammatorie prodotte da vari componenti dell'unità neurovascolare e dai macrofagi (Yilmaz & Granger, 2010).

*Astroцитi.* Gli astroцитi rappresentano le cellule più numerose del cervello umano e svolgono numerose funzioni essenziali come la modulazione della plasticità e della trasmissione sinaptica, il mantenimento dell'omeostasi ionica e la regolazione del flusso ematico cerebrale (Verkhatsky & Parpura, 2010). Essi costituiscono parte della BEE, con le loro terminazioni cellulari che vanno a ricoprire la maggior parte della superficie dei capillari permettendo una fine regolazione delle funzione

endoteliali (Abbott *et al.*, 1992). Da studi ultrastrutturali è emerso come siano proprio le terminazioni astrocitarie pericapillari i primi elementi cellulari a rigonfiarsi durante l'ischemia cerebrale, suggerendo il loro iniziale coinvolgimento nella risposta tissutale all'insulto. Pochi minuti dopo l'insulto ischemico, i neuroni e le cellule gliali iniziano a rilasciare mediatori pro-infiammatori, citochine e ROS che portano all'attivazione delle cellule astrogliali con conseguente alterazione dell'espressione molecolare e ipertrofia cellulare, seguite da proliferazione e formazione della cicatrice gliale (Tuttolomondo *et al.*, 2008; Sofroniew, 2009). Inoltre, l'ATP rilasciato dalle cellule danneggiate attiva i recettori P2Y sugli astrociti portando alla produzione di citochine pro-infiammatorie e chemochine attraverso la via di NFκB (Kuboyama *et al.*, 2011). La gliosi reattiva e la formazione della cicatrice gliale durante l'ischemia sono state da sempre considerate come eventi deleteri dal momento che inducono la formazione dell'edema, l'inibizione della rigenerazione assonale, la produzione di mediatori pro-infiammatori come il fattore di necrosi tumorale (TNF)-α e l'IL-1 e, entro poche ore dall'evento ischemico, la produzione di IL-1β e MMP che contribuiscono alla rottura della BEE (Dvorianchikova *et al.*, 2009). Tuttavia, nuove evidenze suggeriscono che le risposte degli astrociti all'insulto ischemico possono essere coinvolte anche nella neuroprotezione e nella riparazione del tessuto mediante il recupero del glutammato extracellulare, la riparazione della BEE e la sintesi di fattori neurotrofici (del Zoppo, 2009; Shen *et al.*, 2010). Difatti, l'inibizione metabolica degli astrociti con il fluorocitrato determina un ritardo nel rimodellamento neurovascolare e nel recupero funzionale in seguito ad ischemia cerebrale focale nei topi (Hayakawa *et al.*, 2010).

**Tabella 1-3:** Ruolo dualistico delle cellule infiammatorie sull'evoluzione dell'insulto cerebrale ischemico

Tipo cellulare	Effetti deleteri	Effetti benefici
Astroцити	Produzione di mediatori pro-infiammatori, inclusi TNF- $\alpha$ , IL-1 e MMP. Formazione dell'edema, inibizione della rigenerazione assonale e rottura della BEE.	Recupero del glutammato extracellulare, sintesi e rilascio di fattori neurotrofici. Formazione della cicatrice gliale e rimodellamento neurovascolare.
Microglia/Macrofagi	Fenotipo M1: produzione di citochine pro-infiammatorie, incluse TNF e IL-1, specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto e proteasi.	Fenotipo M2: risoluzione dell'infiammazione mediante il rilascio di IL-10 e TGF- $\beta$ e l'attività fagocitica. Rimodellamento tissutale.
Neutrofilii	Occlusione microvasi, produzione di ROS e rilascio di MMP.	
Cellule dendritiche	Attivazione dei linfociti	
Linfociti T	Th1: rilascio di mediatori pro-infiammatori, inclusi IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ . $\gamma\delta$ T: rilascio di IL-17	Th2/Treg: rilascio delle citochine anti-infiammatorie IL-10 e IL-13. Immunosoppressione.

L'aumentata proliferazione degli astroцити mediante l'induzione del fattore di trascrizione STAT3 risulta associata alla neuroprotezione in modelli sperimentali di ischemia cerebrale (Amantea *et al.*, 2011). Gli astroцити, quindi, possono giocare un ruolo dualistico nell'evoluzione dell'insulto ischemico cerebrale (Tabella 1-3). L'effetto finale è strettamente dipendente dall'interazione degli astroцити con microglia e neuroni e dalla polarizzazione attraverso specifici fenotipi, come dimostrato da una recente analisi genomica dell'astrogliosi reattiva (Zamanian *et al.*, 2012).

*Microglia.* Le cellule microgliali sono cellule immunitarie residenti di origine ematopoietica che giocano un ruolo cruciale in condizioni sia fisiologiche che patologiche. In aggiunta al loro coinvolgimento nell'infiammazione, esse contribuiscono alla regolazione della neurogenesi, dello sviluppo e della connettività

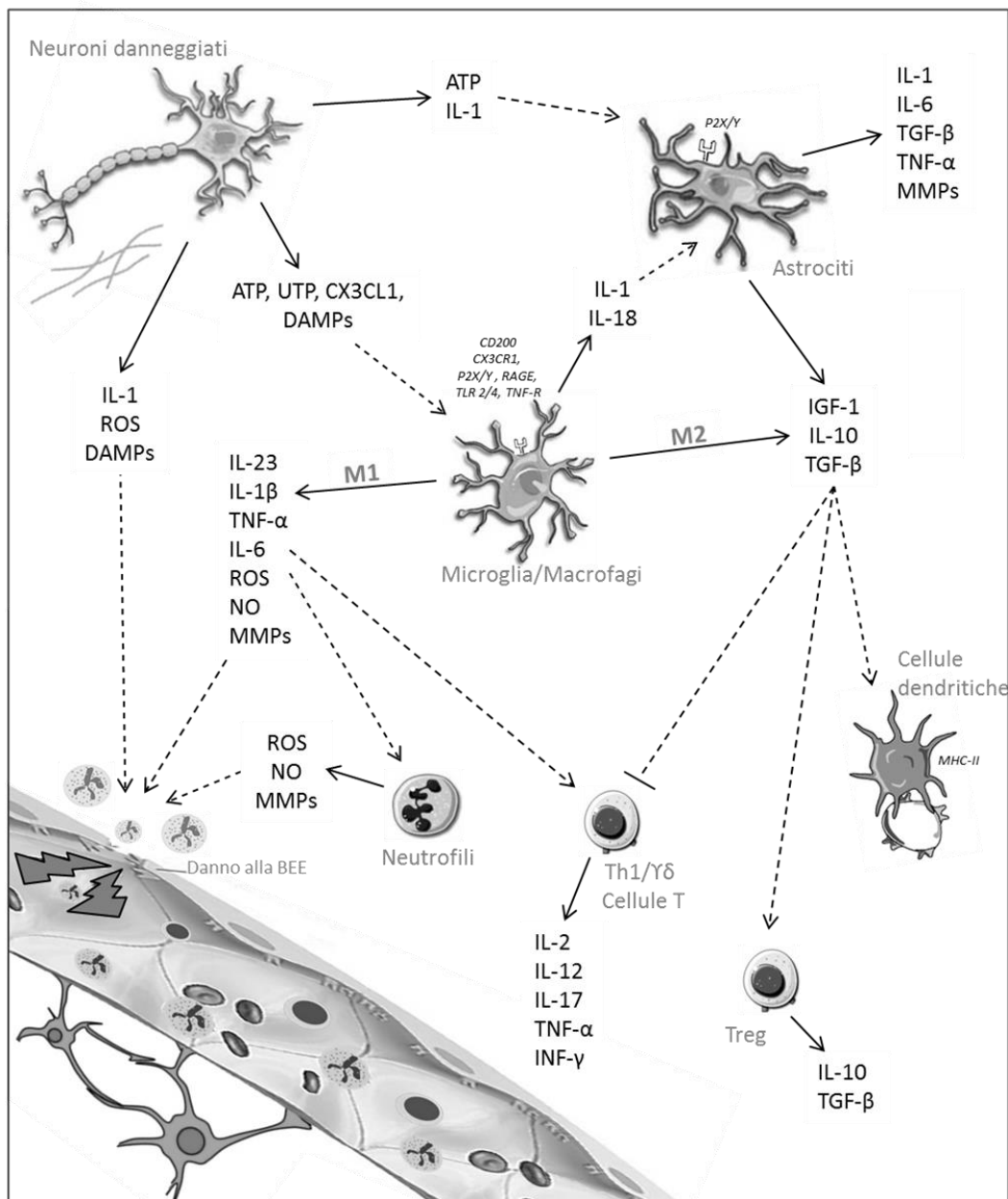
sinaptica, dell'angiogenesi e della fagocitosi di cellule danneggiate e di neutrofilii infiltranti (Ekdahl *et al.*, 2009; Dénes *et al.*, 2007). Entro pochi minuti dall'inizio dell'ischemia si ha il rilascio di ATP dai neuroni e dalle cellule gliali danneggiate, con conseguente attivazione dei recettori P2X7 sulla microglia e rilascio di mediatori pro-infiammatori (Melani *et al.*, 2012). La reattività della microglia può anche essere modulata da altri neurotrasmettitori rapidamente rilasciati nello spazio extracellulare in seguito ad ischemia, inclusi il glutammato e l'acido  $\gamma$ -amminobutirrico (Mead *et al.*, 2012). Poche ore dopo l'occlusione transitoria o permanente dell'arteria cerebrale media nei roditori, si sviluppa, nel tessuto ischemico, un'intensa reazione della microglia associata a modificazioni morfologiche che portano ad un rigonfiamento cellulare e all'accorciamento e ispessimento dei processi che fanno assumere alle cellule un fenotipo fagocitico ameboide indistinguibile dai macrofagi infiltranti (Schilling *et al.*, 2003). Tali modificazioni sono associate ad un'aumentata produzione di citochine pro-infiammatorie come TNF e IL-1, specie reattive di ossigeno e azoto e proteasi come le MMP (del Zoppo *et al.*, 2007). Pertanto, l'attivazione della microglia intensifica il processo infiammatorio e contribuisce al danno tissutale come dimostrato dall'evidenza che la minociclina o altri farmaci immunomodulatori riducono il danno cerebrale ischemico prevenendo la proliferazione di queste cellule o la secrezione delle citochine pro-infiammatorie (Zhang *et al.*, 2012). L'alterazione delle interazioni neuroni-microglia durante l'ischemia è di fondamentale importanza per la stimolazione della microglia attraverso l'attivazione del recettore *Toll like* (TLR)-4, la modulazione del recettore per le chemochine CX3CR1 e la ridotta stimolazione del recettore CD200 (Dentesano *et al.*, 2012). Inoltre, studi recenti hanno messo in evidenza il coinvolgimento del recettore cannabico di tipo 2 (CB2) nella modulazione

della produzione di citochine e chemochine da parte della microglia (Sieber *et al.*, 2013). La microglia contribuisce anche alla risoluzione dell'inflammatione mediante il rilascio di IL-10 e TGF- $\beta$  e, nella fase più tardiva del processo riparativo, mediante la produzione di fattori di crescita (IGF-1) e l'attività fagocitica (Ransohoff & Cardona, 2010). In effetti, l'ablazione selettiva delle cellule microgliali in proliferazione determina un aumento dell'insulto cerebrale prodotto dalla MCAo transitoria nei topi, suggerendo il loro ruolo benefico attraverso le vie mediate dalla galattina-3 e dall'IGF (Lalancette-Hébert *et al.*, 2012). In aggiunta, le cellule microgliali, somministrate attraverso le vie intra-arteriosa o intracerebroventricolare, migrano nella lesione ischemica dove inducono l'espressione di fattori neurotrofici, conferendo protezione in modelli di ischemia sia globale che focale (Imai *et al.*, 2007). In seguito ad un insulto, la microglia può differenziarsi in una moltitudine di fenotipi in relazione alla produzione spazio-temporale di specifici stimoli. Il fenotipo pro-inflammatione M1 è classicamente attivato attraverso i recettori TLR o in seguito a stimolazione con INF- $\gamma$ , mentre il fenotipo M2 è attivato da mediatori regolatori come le interleuchine 4, 10, 13 o il TGF- $\beta$  (Perry *et al.*, 2010). Hu e colleghi (2012) hanno recentemente dimostrato che la microglia assume il fenotipo benefico M2 nelle prime fasi dell'ictus ischemico, ma in seguito a stimolazione da parte dei neuroni, gradualmente viene polarizzata verso il fenotipo pro-inflammatione M1. In modo analogo, la neuroprotezione osservata in topi *knockout* per il recettore mieloide dei mineralcorticoidi, sottoposti a MCAo, risulta associata alla soppressione di marker del fenotipo M1, come TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$  e IL-6 e all'induzione di marker del fenotipo M2 come Arg1 e Ym1 (Frierler *et al.*, 2011). Nel prossimo futuro potrebbero essere prese in considerazione strategie terapeutiche in grado di

promuovere la differenziazione della microglia verso il fenotipo M2, nel trattamento del danno e dell'infiammazione cerebrali post-ischemici (Huang & Feng, 2013).

*Cellule infiltranti.* La risposta immunitaria al danno cerebrale ischemico, oltre ad attivare le cellule gliali residenti, induce il reclutamento di cellule ematiche, inclusi macrofagi, neutrofili, cellule dendritiche e linfociti T, come dimostrato sia in modelli animali sia in pazienti ischemici (Kamel & Iadecola, 2012) (Fig. 1-8). Le cellule danneggiate dall'ischemia promuovono l'attivazione e l'infiltrazione dei leucociti nel cervello mediante il rilascio di una pletera di segnali tra cui ROS, purine e motivi molecolari endogeni associati al danno (DAMP) come HMGB-1, beta-amiloide e la proteina *heat shock* 60 (Chen & Nuñez, 2010). Le citochine prodotte dai macrofagi perivascolari e dalle cellule gliali, così come l'attivazione del complemento possono ulteriormente aumentare l'infiltrazione dei leucociti e il danno tissutale con conseguente, ulteriore, produzione di DAMP che danno origine alla progressione secondaria della lesione (Konsman *et al.*, 2007).





**Figura 1-8: Infiammazione locale e sistemica nell'insulto ischemico.** La reazione infiammatoria indotta dall'insulto ischemico coinvolge tutte le componenti dell'unità neurovascolare, inclusi neuroni, cellule gliali e microvasi oltre che numerose cellule coinvolte nella risposta infiammatoria sistemica. Tutte queste cellule contribuiscono all'evoluzione del danno ischemico mediante il rilascio di specifici mediatori.

La rottura della BEE è di estrema importanza per l'infiltrazione delle cellule immunitarie nel cervello ischemico e per l'esposizione degli antigeni cerebrali che vengono presentati alle cellule T ponendo le basi per l'immunità adattativa.

L'infiltrazione di neutrofili e macrofagi si verifica entro poche ore dall'insulto ischemico. L'accumulo dei neutrofili nel tessuto infartuato è stato correlato allo sviluppo del danno cerebrale in modelli sperimentali di ischemia nei roditori (Atochin *et al.*, 2000) e alla gravità del danno tissutale e all'esito finale sfavorevole nei pazienti ischemici (Buck *et al.*, 2008). Il danno promosso dai neutrofili è dovuto all'ostruzione dei microvasi, alla produzione di ROS e al rilascio di MMP che amplificano la risposta infiammatoria e contribuiscono al danno a carico della BEE promuovendo ulteriormente il richiamo di leucociti nel cervello (Gidday *et al.*, 2005; Bao Dang *et al.*, 2013). L'infiltrazione cerebrale dei macrofagi è stata documentata sia in modelli animali di ischemia che in pazienti con stroke (Jander *et al.*, 2007) ed è stato messo in evidenza il ruolo dualistico di queste cellule nell'evoluzione del danno cerebrale (Hu *et al.*, 2012). Il fenotipo M1 promuove il danno mediante la produzione di NO, ROS e citochine pro-infiammatorie mentre i macrofagi M2 sono implicati nella rimozione dei detriti cellulari, nella stimolazione dell'angiogenesi, nel rimodellamento e nella riparazione del tessuto lesso (Shechter & Schwartz, 2013). I macrofagi possono assumere numerosi fenotipi diversi in relazione ai segnali provenienti dal microambiente e che sono correlati in maniera spazio-temporale all'evoluzione del danno cerebrale ischemico (Perego *et al.*, 2011). Uno studio recente ha documentato come una sottopopolazione di macrofagi derivanti dal midollo osseo, reclutati attraverso CCR2 è in grado di mantenere l'integrità dell'unità neurovascolare e di prevenire la trasformazione emorragica in modelli murini di stroke (Gliem *et al.*, 2012a).

Anche le cellule dendritiche giocano un ruolo cruciale in seguito ad ischemia cerebrale e sono importanti nel collegare l'immunità innata con quella adattativa.

Numerosi studi hanno messo in evidenza la presenza di cellule CD11c<sup>+</sup> nell'emisfero ipsilaterale di roditori sottoposti ad insulto ischemico (Kostulas *et al.*, 2002). Sia nelle cellule dendritiche periferiche che in quelle residenti nel cervello si osserva un'aumentata espressione del complesso maggiore di istocompatibilità di tipo II (MHC-II) e di molecole co-stimolatorie che partecipano all'attivazione dei linfociti (Felger *et al.*, 2010). Studi recenti hanno suggerito come le cellule dendritiche residenti possano giocare un ruolo cruciale nell'orchestrare l'iniziale risposta immunitaria locale e come siano coinvolte nel reclutamento dei linfociti nella fase tardiva della progressione del danno ischemico mediante l'attivazione mediata dall'IFN- $\gamma$  (Gottfried-Blackmore *et al.*, 2009). Sebbene i linfociti T infiltrino il cervello ischemico in una fase tardiva (Schwab *et al.*, 2001), essi rivestono un ruolo fondamentale nello sviluppo del danno tissutale, esercitando effetti diversi in relazione al sottotipo cellulare coinvolto. La carenza di cellule T e B (immunodeficienza combinata severa, SCID) porta a volumi di infarto più piccoli nei topi sottoposti ad ischemia cerebrale sperimentale (Jin *et al.*, 2010). Le cellule Th1 CD4<sup>+</sup> esercitano un effetto deleterio attraverso il rilascio di mediatori pro-infiammatori, inclusi IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , mentre i linfociti Th2 CD4<sup>+</sup> possono avere un ruolo benefico attraverso il rilascio di citochine anti-infiammatorie come IL-10 e IL-13 (Gu *et al.*, 2012). Le cellule T regolatorie (Treg) sono state implicate nelle risposte benefiche all'insulto cerebrale ischemico attraverso un effetto immunomodulatorio mediato dall'IL-10 (Zhu *et al.*, 2012); in effetti, la deplezione dei Treg promuove l'attivazione post-ischemica delle cellule infiammatorie residenti e infiltranti, inclusi microglia e linfociti T, e aumenta significativamente il danno cerebrale e il deficit neurologico nei topi sottoposti ad ischemia (Liesz *et al.*, 2009b). Tuttavia, l'aumento dei Treg

osservato diversi giorni dopo l'insulto nel sangue di pazienti ischemici e di topi sottoposti a MCAo è coinvolto nell'immunosoppressione post-ischemica, rendendo ancora più complessa la regolazione immunitaria mediata dalle cellule T (Brait *et al.*, 2012). Le cellule  $\gamma\delta$ T rappresentano un piccolo sottotipo di cellule T, anch'esse implicate nella patofisiologia ischemica. In seguito a stimolazione da parte dell'IL-23 prodotta dai macrofagi, queste cellule rilasciano IL-17 contribuendo alla fase tardiva dell'insulto cerebrale ischemico (Swardfager *et al.*, 2013).

La risposta immunitaria innata al danno cellulare ischemico che si verifica nel parenchima cerebrale può potenziare la risposta infiammatoria locale, causando un danno tissutale secondario e ponendo le basi per l'immunità adattativa. Sebbene siano stati fatti numerosi progressi, una più approfondita conoscenza dei ruoli delle varie sottopopolazioni di cellule immunitarie e del loro profilo di attivazione spazio-temporale potrà accelerare la traslazione di nuovi farmaci immunomodulatori in ambito clinico.

#### 1.2.6.2 Mediatori solubili dell'infiammazione

I fattori rilasciati dalle cellule danneggiate, compresi purine, ROS e DAMPs agiscono su diversi recettori promuovendo l'infiammazione post-ischemica. Entro pochi minuti dall'inizio dell'ischemia, l'ATP rilasciato dai neuroni e dalle cellule gliali danneggiate attiva i recettori P2X7 della microglia promuovendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie, inclusa l'IL-1 $\beta$  (Melani *et al.*, 2006, 2012; Brough *et al.*, 2002; Volonté *et al.*, 2012). Una prolungata attivazione di P2X7 produce anche morte neuronale eccitotossica (Arbeloa *et al.*, 2012) e danno mielinico. L'attivazione dei recettori TLR da parte dei DAMP gioca un ruolo cruciale nell'insulto ischemico

(Shichita *et al.*, 2012). L'aumentata espressione di TLR-2 e TLR-4 sembra essere coinvolta nel danno e nell'evoluzione del processo infiammatorio sia nei pazienti (Brea *et al.*, 2011) che nei modelli sperimentali (Hua *et al.*, 2007; Hyakkoku *et al.*, 2010; Qiu *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). Paradossalmente, il recettore TLR-4 risulta essere coinvolto nella neuroprotezione mediata dal *preconditioning* ischemico in quanto determina una riprogrammazione del segnale con conseguente soppressione dell'espressione di molecole pro-infiammatorie e aumentata espressione di numerosi mediatori anti-infiammatori (Vartanian *et al.*, 2011). Un altro recettore coinvolto nei meccanismi molecolari che si attivano in seguito ad un evento ischemico è il recettore RAGE. La sua espressione è prevalentemente neuronale e risulta aumentata in seguito ad ischemia cerebrale sia permanente che transitoria nei roditori (Wang *et al.*, 2010) e nell'emisfero ischemico di pazienti con stroke (Hassid *et al.*, 2009).

*Citochine.* Le citochine sono mediatori dell'infiammazione prodotti da leucociti, macrofagi, cellule endoteliali e cellule residenti nel cervello, inclusi neuroni e cellule gliali, in risposta ad una grande varietà di insulti. Esse regolano l'attivazione cellulare, la proliferazione e la differenziazione (Sriram *et al.*, 2007) e, in seguito all'insulto ischemico, sia quelle pro-infiammatorie che quelle anti-infiammatorie, vengono rapidamente espresse nel cervello (Huang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007).

L'induzione precoce di IL-1, TNF e IL-6 è correlata all'estensione del danno ischemico cerebrale in modelli murini e i loro livelli aumentano nel liquido cerebrospinale e nel sangue di pazienti ischemici (Lambertsen *et al.*, 2012). La citochina proinfiammatoria IL-1 rappresenta un mediatore cruciale della neurodegenerazione indotta da un insulto cerebrale traumatico o eccitatorio e dall'ischemia (Olsson *et al.*, 2012). L'ischemia cerebrale focale causata dall'MCAo

nei roditori porta ad una significativa induzione di IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ; la prima è indotta nella microglia mentre la seconda è prevalentemente prodotta da astrociti e microglia/macrofagi, ma anche da cellule endoteliali e neuroni, essendo la sua fonte dipendente dall'evoluzione spazio-temporale del danno (Haqqani *et al.*, 2005; Luheshi *et al.*, 2011; Amantea *et al.*, 2010). L'IL-1 induce l'astrogliosi e il rilascio di citochine e chemochine e porta all'attivazione di MMP-9 negli astrociti (Thornton *et al.*, 2008). Inoltre, l'IL-1 promuove l'espressione endoteliale di ICAM-1 e di VCAM-1 e il rilascio di CXCL1 che porta all'infiltrazione dei neutrofili (Allen *et al.*, 2012). L'insulto cerebrale indotto dall'ischemia focale è caratterizzato, anche, da un significativo e rapido aumento dei livelli di TNF- $\alpha$ . Questo aumento si verifica nei neuroni, soprattutto durante le prime ore dall'insulto e, nella microglia e nelle cellule immunitarie circolanti durante gli stadi più tardivi (Yin *et al.*, 2003). La somministrazione dell'anticorpo monoclonale che neutralizza il TNF- $\alpha$  o di proteine che legano il TNF induce neuroprotezione in modelli sperimentali di ischemia, confermando il ruolo deleterio di tale citochina (Yang *et al.*, 1998). Tuttavia il TNF- $\alpha$  può anche esercitare effetti benefici attraverso l'attivazione del recettore p55 (TNF-RI) (Lambertsen *et al.*, 2009; Pradillo *et al.*, 2005). L'espressione dell'IL-6 aumenta significativamente nella fase acuta dell'ischemia cerebrale e rimane elevata nei neuroni nella microglia della penombra fino a 14 giorni dopo l'insulto (Block *et al.*, 2000). Questa citochina è implicata nel richiamo dei linfociti T nel cervello e contribuisce all'ampliamento della risposta infiammatoria. Topi transgenici che over-esprimono IL-6 risultano più vulnerabili alla neurodegenerazione (Campbell *et al.*, 1993). In aggiunta, nei pazienti, le concentrazioni plasmatiche di IL-6 risultano correlate alla severità del danno e all'esito finale sfavorevole. Anche in questo caso ci

sono dati discordanti, in quanto la somministrazione di IL-6 ricombinante riduce il volume di infarto in ratti e gerbilli (Loddick *et al.*, 1998). La neuroprotezione mediata dall'IL-6 avviene attraverso l'attivazione del suo recettore e l'induzione, a valle, della fosforilazione di STAT-3 (Sakata *et al.*, 2012). Uno studio recente suggerisce che l'IL-6 può aumentare l'efficacia dell'utilizzo di cellule staminali neuronali nello stroke ischemico, rendendo queste cellule meno sensibili allo stress ossidativo e inducendo angiogenesi attraverso l'attivazione di STAT-3 (Sakata *et al.*, 2012). L'IL-10 è una citochina anti-infiammatoria rilasciata dalla microglia attivata e dagli astrociti in risposta all'ischemia cerebrale. Essa sopprime il rilascio di citochine pro-infiammatorie oltre che l'espressione e l'attività dei loro recettori (Strle *et al.*, 2001). Anche il TGF- $\beta$  esercita un ruolo neuroprotettivo nello stroke (Gliem *et al.*, 2012a). I livelli cerebrali di TGF- $\beta$  risultano elevati per almeno una settimana dopo l'insulto ed esso è espresso sia negli astrociti che nella microglia. La sua azione benefica potrebbe essere associata all'inibizione di MCP-1 e MIP-1 $\alpha$  (Pang *et al.*, 2001). Oltre ai suoi effetti anti-infiammatori, il TGF- $\beta$  promuove la formazione della cicatrice gliale (Logan *et al.*, 1994) e presenta effetti anti-apoptotici (Zhu *et al.*, 2002).

*Chemochine.* Le chemochine sono proteine regolatorie coinvolte nella comunicazione cellulare e nel reclutamento durante l'infiammazione. Le principali chemochine associate all'insulto ischemico sono MCP-1, MIP-1 $\alpha$  e IL-8. L'inibizione di queste proteine durante l'ischemia cerebrale è associata ad un miglioramento dell'esito finale (Garau *et al.*, 2005) mentre un aumento della loro espressione porta ad un peggioramento dell'insulto attraverso un aumentato reclutamento di cellule infiammatorie (Chen *et al.*, 2003). I topi che non esprimono MCP-1 o il suo recettore CCR2 mostrano un ridotto volume di infarto insieme ad una minore infiltrazione di

leucociti e ad una ridotta espressione di mediatori dell'infiammazione nel cervello ischemico (Strecker *et al.*, 2011; Schuette-Nuetgen *et al.*, 2012). Al contrario, un'augmentata espressione di MCP-1 porta ad un peggioramento del danno e ad un aumentato influsso di cellule infiammatorie. L'espressione di SDF-1 (CXCL12) risulta aumentata nella penombra ischemica, particolarmente negli astrociti perivascolari dei topi (Hill *et al.*, 2004). Questa chemochina esercita i suoi effetti neuroprotettivi mediante un aumento delle cellule del midollo osseo dirette al cervello ischemico e migliorando il flusso ematico cerebrale locale (Shyu *et al.*, 2008). SDF-1 $\alpha$  è coinvolta anche nella regolazione dell'infiammazione post-ischemica e nella riparazione neurovascolare. Tuttavia, studi recenti hanno dimostrato che il blocco farmacologico di CXCR4 determina neuroprotezione mediante riduzione del danno a carico della barriera emato-encefalica e soppressione della risposta infiammatoria (Huang *et al.*, 2013). Gli effetti deleteri di SDF-1 $\alpha$  potrebbero essere dovuti all'attivazione di CXCR4 nella microglia reattiva con conseguente aumento dell'espressione di citochine pro-infiammatorie nel cervello ischemico (Lipfert *et al.*, 2013). In seguito ad ischemia cerebrale i neuroni rilasciano fractalchina solubile CX3CL1, una chemochina che controlla la migrazione leucocitaria e partecipa all'attivazione della microglia nel tessuto ischemico mediante il legame ai recettori CX3CR1 (Tarozzo *et al.*, 2002). Topi che mancano di questa chemochina presentano danni cerebrali meno severi in seguito a MCAo transitoria o permanente (Cipriani *et al.*, 2011). Sebbene questi studi suggeriscano come la fractalchina abbia effetti deleteri nello stroke, gli stessi risultati non sono stati confermati nell'uomo. In effetti, elevati livelli di questa chemochina nel plasma di pazienti ischemici sono stati correlati ad un



miglior esito finale e a più bassi livelli di marker sistemici dell'inflammation (Donohue *et al.*, 2012).

*Altri mediatori molecolari associati alla neuroinflammation.* Sia nei pazienti ischemici che in modelli animali, i neutrofili, le cellule vascolari e i neuroni mostrano un'aumentata espressione di COX-2, un enzima coinvolto nell'inflammation post-ischemica attraverso la produzione di prostanoidei tossici e superossido (Chakraborti *et al.*, 2010). Topi mancanti dell'enzima sviluppano una ridotta risposta infiammatoria in seguito ad ischemia e il post-trattamento con inibitori della COX-2 riduce il danno a carico della barriera emato-encefalica e l'infiltrazione dei leucociti indotti dall'ischemia cerebrale focale nel ratto (Candelario-Jalil *et al.*, 2007). I neutrofili infiltranti, la microglia attivata e le cellule endoteliali possono rilasciare quantità tossiche di NO attraverso l'enzima iNOS che risulta fortemente attivato in seguito ad insulto ischemico. Immediatamente dopo il danno cerebrale, la produzione endoteliale di NO esercita effetti benefici promuovendo la vasodilatazione mentre in una fase più tardiva l'attivazione della NOS neuronale e l'espressione *de novo* di iNOS contribuiscono al danno tissutale ischemico (Kanwar *et al.*, 2009). Un'eccessiva produzione di NO ha effetti citotossici mediati dall'attivazione di NFκB, dall'inibizione di enzimi implicati nella produzione di ATP, dalla produzione di perossinitrito e dalla stimolazione di altri enzimi pro-infiammatori quali la COX-2 (Greco *et al.*, 2011). Anche le metalloproteasi contribuiscono alla propagazione e alla regolazione delle risposte neuroinfiammatorie nell'ischemia cerebrale (Cunningham *et al.*, 2005). In particolare le gelatinasi MMP-2 e MMP-9 sono coinvolte nella patofisiologia ischemica contribuendo alla distruzione della barriera emato-encefalica e alla trasformazione emorragica. L'attività gelatinolitica aumenta rapidamente dopo

l'insulto, essendo stata individuata nei nuclei dei neuroni già durante le prime fasi dell'insulto e nel citosol dei neuroni e delle cellule gliali nelle fasi più tardive (Amantea *et al.*, 2008). L'inibizione farmacologica delle MMPs riduce il volume di infarto e previene la distruzione della BEE in seguito a MCAo permanente o transitoria nei roditori (Wang *et al.*, 2000). I meccanismi di danno cerebrale coinvolgono la rottura della BEE mediata dalle gelatinasi, l'edema e la trasformazione emorragica. Un recente lavoro ha messo in luce, anche, il ruolo delle MMP e dei loro inibitori endogeni (TIMP) nella regolazione della morte cellulare neuronale attraverso la modulazione dell'eccitotossicità, di enzimi di riparazione del DNA, dell'attività della calpaina, della biodisponibilità di fattori neurotrofici e della produzione di prodotti neurotossici. Le MMP sono state implicate, inoltre, nella trasformazione emorragica e pertanto rappresentano un promettente target per la riduzione delle complicanze emorragiche della terapia trombolitica (Liu *et al.*, 2012).

### **1.3 Dai fallimenti clinici all'esigenza di nuovi approcci di R&S**

Durante gli ultimi trent'anni, la maggior parte dei farmaci neuroprotettivi efficaci nei modelli pre-clinici ha prodotto risultati deludenti in clinica a causa della scarsa efficacia o dell'elevata tossicità nei pazienti (Ginsberg, 2008). I bloccanti dei canali al calcio, i farmaci antiossidanti, gli scavenger dei radicali liberi, gli antagonisti del glutammato e altri agenti neuroprotettori sono stati testati in più di 150 trial clinici, molti dei quali devono il loro fallimento all'impossibilità di somministrare il farmaco entro le 4-6 ore dall'insulto, ovvero nella finestra temporale in cui i bersagli della neuroprotezione vengono attivati (Ginsberg, 2008; paragrafo 1.2). Altri motivi alla

base delle discrepanze fra gli studi sperimentali e quelli clinici sono la durata dell'ischemia, la dose di farmaco somministrata, le specie utilizzate, le differenze di genere, l'età, la comorbilità e il disegno del trial clinico (criteri non corretti di selezione dei pazienti, finestra temporale e dose di somministrazione non paragonabili a quelle utilizzate negli studi pre-clinici, selezione di end-points inadeguati, ecc.) (Guekht, 2013; Feuerstein *et al.*, 2008).

In un recente congresso (*Controversies in Neurology*, Istanbul, 2013) sono stati messi in evidenza i principali limiti degli studi pre-clinici che sono risultati essere:

- a. Impiego di animali sani e giovani, senza condizioni di comorbilità.
- b. Utilizzo dell'anestesia e di un metodo chirurgico (non spontaneo) per l'occlusione vascolare.
- c. Scarso controllo dei parametri fisiologici.
- d. Non sono stati effettuati studi di sopravvivenza a lungo termine per documentare la persistente efficacia del trattamento.
- e. Gli effetti neuroprotettivi dei farmaci sono stati analizzati unicamente su base istopatologica, senza l'analisi dei deficit funzionali.
- f. Il farmaco è stato somministrato prima dell'induzione dell'ischemia o unicamente al momento della riperfusione.
- g. Gli effetti avversi non sono stati considerati.

Al fine di implementare gli approcci di ricerca e sviluppo di nuove terapie per l'ischemia cerebrale, lo STAIR (*Stroke Therapy Academic Industry Roundtable*) ha fornito una serie di raccomandazioni per migliorare la qualità degli studi pre-clinici e clinici (Fisher *et al.*, 2009; Albers *et al.*, 2011). Relativamente agli studi sperimentali, le raccomandazioni dello STAIR sottolineano l'esigenza di considerare fattori come le differenze di specie e di genere, la rilevanza clinica del modello sperimentale, la valutazione della dose-risposta e della finestra temporale di efficacia del farmaco, la

capacità del composto in esame di attraversare la BEE, la randomizzazione, il monitoraggio dei parametri fisiologici e la valutazione di almeno due *end-points*, uno precoce, l'altro tardivo.

Oltre all'implementazione degli approcci sperimentali, è di fondamentale importanza dare maggiore impulso all'identificazione di nuovi target farmacologici. Infatti, gli studi condotti negli ultimi decenni hanno avuto come obiettivo principale la protezione del neurone mentre poca attenzione è stata rivolta all'unità neurovascolare nel suo complesso. Le vie molecolari e cellulari alla base della neurotossicità ischemica sono molteplici e complesse e uno dei motivi del fallimento dei farmaci neuroprotettivi potrebbe essere dovuto proprio alla semplicità del loro meccanismo d'azione, nel senso che questi farmaci modulano unicamente una via molecolare lasciando inalterate le altre che comunque giocano un ruolo determinante nel danno ischemico. A questo bisogna aggiungere che il danno neuronale è fortemente influenzato dai processi infiammatori e immunitari che si sviluppano sia a livello locale che sistemico dopo ischemia (paragrafo 1.2.6). La risposta infiammatoria evolve lentamente (Fig. 1-4), consentendo di ampliare in maniera significativa la finestra temporale per l'intervento farmacologico, sottolineando il potenziale terapeutico dei farmaci antinfiammatori e immunomodulanti.

Studi pre-clinici hanno suggerito come la modulazione dell'espressione e dell'attività delle citochine possa essere un'utile strategia. Sebbene le strategie anti-TNF abbiano mostrato effetti benefici in altre condizioni cliniche come la patologia infiammatoria intestinale, ad oggi non ci sono risultati positivi per quanto riguarda l'ischemia cerebrale, probabilmente a causa del ruolo duale svolto da questa citochina nella patofisiologia ischemica (Shohami *et al.*, 1999). Al contrario, diversi studi hanno

dimostrato che l'inibizione del rilascio o dell'attività dell'IL-1 riduce marcatamente il danno cerebrale ischemico; in uno studio clinico di fase II è stato osservato come l'antagonista del recettore per l'IL-1 sia efficace nel trattamento dei pazienti con ischemia cerebrale e come il farmaco sia ben tollerato. Tuttavia l'iter clinico del farmaco si è interrotto nella fase III (Emseley *et al.*, 2005). Nel tentativo di mitigare la risposta infiammatoria centrale in seguito all'insulto ischemico è stato utilizzato un composto in grado di inibire l'attivazione degli astrociti, ONO-2506 (acido arundico). Tale composto inibisce l'eccessiva produzione astrocitaria di S100B e l'espressione della nitrossido sintasi inducibile, mentre mantiene l'attività astrogliale dei trasportatori del glutammato. Il farmaco è risultato essere ben tollerato (*Investigator's Brochure. Ono Pharmaceuticals*, 2004), per cui uno studio di fase III è stato condotto nel Nord America con 1500 pazienti, con l'obiettivo di testare due differenti dosi di ONO-2506 entro 6 ore dall'inizio dell'insulto ischemico. Lo studio è stato interrotto per mancata efficacia del farmaco, verosimilmente riconducibile al fatto che la risposta degli astrociti all'insulto ischemico non è soltanto deleteria (paragrafo 1.2.6.1). Difatti, la maggior parte dei fallimenti degli studi con gli antinfiammatori sembra essere legata alla natura dualistica della maggior parte dei mediatori coinvolti nella risposta infiammatoria conseguente all'ischemia (Amantea *et al.*, 2013). Se a ciò si aggiunge la limitazione derivante dall'impiego di farmaci attivi su un unico meccanismo ritenuto fondamentale, senza considerare la complessità delle risposte neuropatologiche conseguenti ad ictus cerebrale, è chiaro come gli approcci multi-target dovrebbero offrire maggiore probabilità di successo terapeutico. Un importante esempio di farmaco multi-target che ha raggiunto la fase IV negli studi clinici è

rappresentato dalla minociclina, molecola dotata di effetti anti-infiammatori, anti-apoptotici e antiossidanti (paragrafo 1.4).

Fra le strategie multi-target, è importante menzionare l’ipotermia moderata, risultata efficace in diversi modelli sperimentali di ischemia sia focale che globale (Gunn *et al.*, 2005). La riduzione del metabolismo energetico (5% per grado Celsius, Steen *et al.*, 1983) suggerisce come l’effetto benefico sia sostanzialmente dovuto ad una riduzione dell’esigenza metabolica in condizioni di ridotta perfusione (Erecinska *et al.*, 2003; Yenari *et al.*, 2008). In aggiunta, l’ipotermia sembra esercitare effetti neuroprotettivi attraverso molteplici meccanismi che includono l’inibizione del rilascio di amminoacidi eccitatori, la ridotta formazione di radicali liberi, la limitazione delle depolarizzazioni peri-infarto, la protezione del microcircolo cerebrale e l’inibizione di pathways infiammatori e pro-apoptotici (Burk *et al.*, 2008). Diversi studi clinici hanno testato gli effetti dell’ipotermia moderata (33-34°C) nei pazienti documentando come il trattamento, da solo o in associazione alla trombolisi, sia fattibile e sicuro (Kollmar *et al.*, 2009). È in corso uno studio di fase III, ICTUS2/3, mirato alla valutazione degli effetti benefici dell’ipotermia in combinazione con il trattamento trombolitico (Wu & Grotta, 2013); i risultati sono attesi per il 2016. Una delle limitazioni dell’ipotermia post-ischemica è rappresentata dalla limitata finestra terapeutica, in quanto l’efficacia neuroprotettiva si riduce significativamente se l’intervento è praticato oltre le 6 ore dall’insulto ischemico (Burk *et al.*, 2008).

Nel tentativo di prolungare la finestra terapeutica, negli ultimi anni sono state testate diverse strategie mirate a ridurre l’infiltrazione cerebrale dei leucociti tra cui anticorpi monoclonali per bloccare le interazioni tra neutrofili e cellule endoteliali

(Härtl *et al.*, 1996). Uno studio con UK-279,276 (fattore d'inibizione dei neutrofilii) nello stroke ischemico è stato precocemente interrotto per scarsi risultati (Krams *et al.*, 2003). Un altro approccio è stato quello di utilizzare anticorpi monoclonali per il blocco competitivo dell'adesione dei leucociti a ICAM-1. Nei modelli sperimentali, l'anticorpo murino diretto contro ICAM-1 (enlimomab) è risultato capace di ridurre l'infiltrazione cerebrale dei leucociti e il volume di infarto indotti dall'ischemia (*Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators*, 2001). È stato anche dimostrato che la prevenzione dell'adesione leucocitaria, utilizzando farmaci anti-molecole di adesione, può estendere la finestra terapeutica per la terapia trombolitica e che il simultaneo utilizzo di questi farmaci è in grado di ridurre l'estensione dell'insulto tissutale (Bednar *et al.*, 1998). Nonostante i promettenti risultati negli studi pre-clinici, il primo trial nell'uomo che ha utilizzato un anticorpo monoclonale murino anti-ICAM-1 è risultato fallimentare dimostrando un peggioramento del deficit neurologico, un aumento della mortalità e di reazioni avverse quali infezioni e febbre nei pazienti trattati rispetto al placebo (*Enlimomab acute stroke trial investigators*, 2001). Tale fallimento clinico non è però l'espressione di una mancata efficacia dei farmaci antinfiammatori nell'ictus ischemico, come documentato da studi successivi, *bedside-to-bench*, che hanno dimostrato le ragioni dell'insuccesso dell'enlimomab. In effetti, è stato osservato che la somministrazione dell'anticorpo murino anti-ICAM-1 nei ratti sottoposti ad ischemia induce uno stato infiammatorio con attivazione del complemento, dei granulociti e dell'endotelio, con conseguente aumento del volume di infarto (Furuya *et al.*, 2001). Seppur terapeuticamente negativa, l'esperienza con l'enlimomab sottolinea il ruolo cruciale svolto dall'infiammazione

sistemica, valorizzando quest'ultima come promettente target per arginare l'evoluzione del danno ischemico cerebrale.

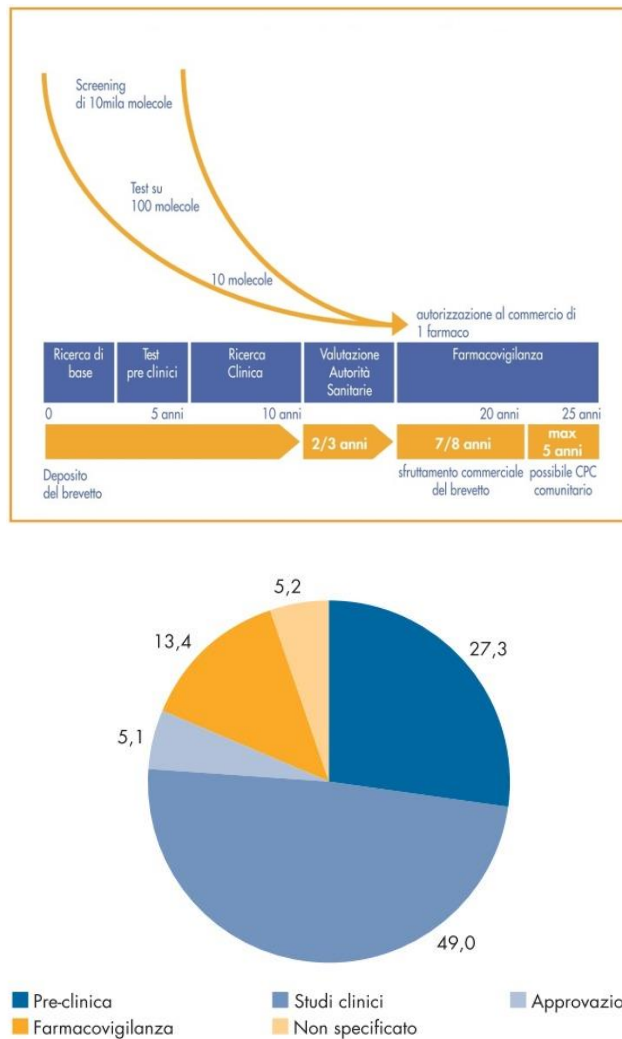
Al fine di evitare il rischio di fallimenti, il farmaco ideale non dovrebbe inibire tutte le funzioni delle cellule infiammatorie in quanto, come già descritto (paragrafo 1.2.6), alcune componenti del processo infiammatorio risultano necessarie per la limitazione del danno ischemico. È il caso, per esempio, dei macrofagi M2 che, in seguito ad ischemia cerebrale, possono migrare nel cervello e promuovere non soltanto la fagocitosi dei detriti cellulari ma anche la riparazione e il rimodellamento del tessuto danneggiato (Hu *et al.*, 2012). Un nuovo approccio terapeutico dovrebbe essere mirato, quindi, all'inibizione dei processi deleteri, promuovendo i meccanismi endogeni di riparazione. Ciò consentirà anche di ridurre il rischio di tossicità, limite principale del trasferimento alla clinica dei farmaci studiati fino ad oggi.

#### **1.4 Il *drug repurposing* come strategia per l'identificazione di nuove terapie**

L'industria farmaceutica sta attraversando negli ultimi anni una forte crisi causata dagli scarsi successi della sperimentazione clinica non giustificati dagli enormi costi degli studi sperimentali, e ulteriormente alimentata dalle nuove regolamentazioni riguardanti la sicurezza dei farmaci, dalla scadenza dei brevetti e dalla crescente competizione dei farmaci generici. L'investimento in ricerca e sviluppo (R&S) continua a crescere ma il numero di nuove entità chimiche approvate non segue lo stesso andamento (Khanna, 2012). Prima dell'approvazione, la caratterizzazione e la validazione di un nuovo farmaco richiedono circa 10-15 anni, durante i quali, oltre alla dimostrazione dell'efficacia, deve essere valutata la sicurezza



del prodotto in esame nei pazienti. Mediamente solo 1 su 5-10 mila molecole arriva con successo alla fine del processo, con costi che possono anche arrivare a superare il miliardo di euro (Tralau-Stewart *et al.*, 2009). La distribuzione degli investimenti per fase mostra che gli studi clinici rappresentano una parte rilevante del totale speso per R&S (il 49,0% del totale, secondo dati Efpia) (Fig. 1-9).



**Figura 1-9: Fasi di sviluppo di un nuovo farmaco.** Tempi e costi per R&S relativi ad ogni fase (% sul totale). Fonte Efpia.

Le ragioni principali dei fallimenti clinici risiedono nell'elevata tossicità del nuovo composto nell'uomo e nella scarsa capacità di confermare nei pazienti l'efficacia osservata nei modelli preclinici. In effetti, soltanto il 50% delle nuove entità molecolari riesce a superare i trial clinici di fase I, mentre il passaggio dalla fase II alla fase III è rilevabile in meno del 25% dei prodotti testati, sottolineando come la tossicità e, in maggior misura, la mancanza di efficacia sono le cause principali dei fallimenti (Thayer, 2012). Ogni anno la FDA approva la commercializzazione di non più di 20-30 nuove entità molecolari ma si calcola che a questo ritmo servirebbero 300 anni per arrivare al numero di farmaci necessari oggi (Adams & Brantner, 2006). Questo scenario drammatico sottolinea l'esigenza di implementare le strategie di R&S di nuovi farmaci al fine di rendere la medicina traslazionale più efficiente, meno costosa e meno rischiosa. Tale obiettivo è alla base di diverse iniziative sorte negli ultimi anni a livello internazionale, tra cui l'istituzione del Centro Nazionale per l'Avanzamento delle Scienze Traslazionali (NCATS) da parte dell'NIH nel Dicembre 2011. Fra le strategie proposte per re-ingegnerizzare le scienze traslazionali, l'NCATS propone nuove strategie di ottimizzazione e validazione dei target che sfruttino anche le più recenti conoscenze del genoma umano, l'utilizzo di chip tissutali per lo screening dei nuovi farmaci, nuovi e più efficaci test tossicologici che consentano di ridurre gli insuccessi (di fase I) legati alla scarsa tollerabilità dei composti nell'uomo. Fra queste promettenti strategie emerge quella del *drug repurposing*, intesa come recupero e/o riposizionamento di un farmaco per nuove indicazioni cliniche. Il *repurposing* consiste nell'identificare nuove proprietà terapeutiche di un farmaco già in commercio o nel trovare nuove indicazioni per molecole che non hanno mai raggiunto l'approvazione clinica. A tal fine, NIH e FDA hanno di recente messo a

disposizione dei ricercatori diversi *database* di molecole non ancora pienamente testate. Al contempo è in atto un intenso dibattito sull'utilità economica, strategica e clinica di mettere a disposizione dei ricercatori tutte le molecole testate negli ultimi decenni dall'industria farmaceutica, ritenute patrimonio della stessa ma non arrivate mai in clinica (Mullard, 2011). Le conoscenze già acquisite sulle proprietà farmacodinamiche, farmacocinetiche e tossicologiche di queste molecole o di farmaci già in commercio rendono il *drug repurposing* una strategia di R&S poco rischiosa, poco costosa e che richiede tempi più brevi per la validazione di nuove terapie. Il *drug repurposing* si basa su due principi fondamentali. Il primo è che una singola molecola spesso agisce su più target. Sfruttando questo vantaggio, il *repurposing* mira all'identificazione di attività secondarie, anche dette *off-target*, del farmaco, al fine di riproporlo con una nuova indicazione in cui il target secondario diventa rilevante (composto noto - nuovo target). Il secondo principio è che i meccanismi implicati in una patologia o in un processo biologico sono spesso coinvolti anche in altri contesti bio-patologici, suggerendo l'esistenza di target identici. Pertanto, il secondo approccio del *repurposing* consiste nel riproporre un farmaco per una nuova indicazione sulla base di un target comune alla patologia originaria per cui il composto viene usato con successo (target noto – nuova indicazione). Gli argomenti a favore del *drug repurposing* sono tanto semplici quanto efficaci. Il primo vantaggio riguarda la sicurezza. Farmaci già noti, che sono stati approvati o che hanno superato gli studi di fase I, ma che non sono stati in grado di soddisfare gli *end points* delle loro indicazioni originarie, possono essere testati con minore rischio e in tempi più brevi per nuove potenziali indicazioni terapeutiche. Ovviamente ciò è possibile qualora essi dimostrino di essere efficaci per le nuove indicazioni e la loro attività sia realmente

vantaggiosa rispetto ai trattamenti già presenti sul mercato. Tale strategia consente anche di ridurre significativamente la spesa di R&S poiché è stato stimato che il costo per rilanciare un farmaco riposizionato è di circa 8,4 milioni di dollari, mentre i costi per lo sviluppo di un nuovo farmaco sono pari a circa 1,2 miliardi di dollari (*Cutting Edge Information*, 2007). Il successo del repurposing è testimoniato dall'elevato numero di farmaci approvati in clinica negli ultimi anni (Tabella 1-4).

**Tabella 1-4:** Esempi di farmaci riposizionati per nuove indicazioni terapeutiche.

<b>Farmaco</b>	<b>Indicazione originale</b>	<b>Nuova indicazione</b>	<b>Anno</b>
Anfetamine	Stimolanti	Ipercinesia nei bambini	1943
Allopurinolo	Sindrome da lisi tumorale	Gotta	1967
Zidovudine	Cancro	HIV/AIDS	1985
Minoxidil	Ipertensione	Alopecia	1988
Bupropione	Depressione	Anti-tabagismo	1997
Sibutramina	Depressione	Obesità	1997
Finasteride	Iperplasia prostatica benigna	Alopecia	1997
Metotrexato	Cancro	Artrite reumatoide	1999
Fluoxetina	Depressione	Disordine disforico mestruale	2000
Atomoxetina	Parkinson	ADHD	2002
Talidomide	Nausea in gravidanza	Mieloma multiplo	2003
Cymbalta	Depressione	Neuropatia diabetica periferica	2004
Topiramato	Epilessia	Emicrania	2004
Paclitaxel	Cancro	Restenosi	2004
Sildenafil	Angina	Disfunzione erettile	2005
Requip	Parkinson	Stanchezza alle gambe	2005
Lumigan	Glaucoma	Ipotricosi semplice	2009
Dapoxetina	Analgesia e depressione	Eiaculazione precoce	2009
Milnacipran	Depressione	Fibromialgia	2009
Fentolamina	Ipertensione	Reversione anestesia dentale	2009
Lidocaina	Anestetico locale	Aritmia	2010
Mifepristone (RU486)	Interruzione di gravidanza	Sindrome di Cushing	2012

#### 1.4.1 L'approccio del *drug repurposing* nell'ischemia cerebrale

Dal successo del trial con l'attivatore tissutale del plasminogeno nella metà degli anni '90, ci sono stati pochi progressi nello sviluppo di nuove terapie per il trattamento acuto dell'ictus ischemico. In effetti, tutti i composti che hanno mostrato efficacia neuroprotettiva nei modelli pre-clinici sono poi falliti nei trial clinici, o per mancanza di efficacia o per la comparsa di effetti collaterali gravi (Ginsberg, 2008); tra questi composti si annoverano gli antagonisti del glutammato (selfotel e aptiganel), gli antagonisti delle molecole di adesione (enlimomab), gli inibitori dell'ossido nitrico sintasi (lubeluzole), i bloccanti del canale per il calcio (nimodipina), gli antagonisti della glicina (gavestinel) e gli scavenger di radicali liberi (trilizad e NXY-059). Studi recenti hanno messo in evidenza il potenziale successo terapeutico nell'ischemia del riposizionamento di farmaci già in uso per altre indicazioni (Tabella 1-5). Un particolare interesse è rivolto, soprattutto, a quei farmaci in grado di apportare dei benefici in termini di protezione vascolare attraverso l'inibizione dei mediatori endogeni del danno vascolare (superossido, endotelina, metalloproteasi della matrice, citochine e caspasi) e la stimolazione di protettori endogeni (ossido nitrico, angiopoietina-1, fattore di crescita dell'endotelio vascolare e superossido dismutasi) (Fagan *et al.*, 2004). Alcuni di questi target possono essere modulati con farmaci riposizionati come le statine, gli antagonisti del recettore per l'angiotensina II, la minociclina e fattori di crescita come l'eritropoietina (Fagan *et al.*, 2005). Oltre a ridurre la pressione sanguigna, l'inibizione del recettore di tipo 1 per l'angiotensina II riduce l'infiammazione, previene l'apoptosi e promuove l'angiogenesi (Fagan *et al.*, 2006; Elewa *et al.*, 2007; Kozac *et al.*, 2008, 2009). Lo studio ACCESS (*Acute Candesartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors*) dimostra che la

somministrazione di candesartan entro i primi 7 giorni dall'insulto ischemico determina una significativa riduzione di eventi vascolari ricorrenti, senza alcuna variazione della pressione sanguigna (Schrader *et al.*, 2003). Nei roditori, una singola dose di candesartan, somministrata al momento della riperfusione, dopo 3 ore di occlusione dell'arteria cerebrale media, ha prodotto un incremento di 5 volte dello stato proangiogenico centrale indotto dall'ischemia, oltre ad un significativo incremento della densità vascolare a sette giorni dall'insulto (Kozak *et al.*, 2009). La citicolina, un precursore per neurotrasmettitori ed elementi strutturali del cervello, determina un lieve, seppur significativo miglioramento dell'outcome nei pazienti ischemici (Warach & Sabounjian, 2000) probabilmente dovuto alla stabilizzazione delle membrane cellulari e alla ridotta produzione di radicali liberi. Circa 3350 pazienti sono stati reclutati nel trial ICTUS che si concluderà nel 2014, nel quale la citicolina viene somministrata con una finestra temporale di 24 ore. Nel trial AXIS-2 (fase IIb) è stato intrapreso un altro importante studio per verificare la sicurezza e l'efficacia del trattamento con G-CSF nell'ischemia cerebrale. La finestra temporale supera le nove ore e sono stati inclusi anche pazienti trattati con rt-PA. Il G-CSF è una glicoproteina che promuove la differenziazione nella linea cellulare dei granulociti ed è stata utilizzata in clinica per contrastare la neutropenia e mobilitare le cellule staminali ematopoietiche dal midollo osseo (Schneider *et al.*, 2005). In modelli sperimentali di ischemia, il G-CSF supera la BEE e riduce la morte neuronale favorendo anche il recupero funzionale dei neuroni a tempi tardivi dopo l'insulto (Schneider *et al.*, 2005; Minnerup *et al.*, 2009). Le statine, indipendentemente dal loro effetto sui livelli di colesterolo, inibiscono il richiamo e l'attivazione di cellule immunocompetenti, come i macrofagi e inibiscono l'espressione di MHC-II sulle

cellule presentanti l'antigene. Questo può portare ad una ridotta differenziazione e attivazione delle cellule Th1 e quindi ad una riduzione della risposta infiammatoria deleteria in seguito ad ischemia cerebrale (Palinski, 2000). Negli ultimi anni numerosi studi sono stati incentrati sul potenziale neuroprotettivo degli antibiotici, trovando un razionale nel successo clinico della minociclina, il cui riposizionamento nell'ischemia cerebrale ha completato l'iter di sperimentazione clinica (fase III, Tabella 1-5).

**Tabella 1-5:** Trial clinici per il riposizionamento di farmaci nell'ictus ischemico

Farmaco	Trial	Fase	Meccanismo
IL-1ra	Studio dell'antagonista del recettore dell'IL-1 in pazienti ischemici	II	Blocco del recettore per IL-1 $\beta$
Citicolina	Ferrer Grupo (Barcellona, Spagna)	III	Precursore della colina
Minociclina	MINOS	III	Anti-infiammatorio/anti-apoptotico
	NeuMAST	IV	
G-CSF	SYGNIS Pharma AG (Heidelberg, Germania)	II/III	Protezione a livello vascolare
Eritropoietina	Stem Cell Therapeutics (Calgary, Canada)	II	Proliferazione delle cellule staminali neuronali
Sildenafil	Fondazione privata	I	Inibizione PD5
Anti-ICAM-1	EAST	III	Inibizione dell'adesione e della migrazione dei leucociti

Un'importante attività esercitata da alcune classi di antibiotici è quella anti-infiammatoria, documentata con i  $\beta$ -lattamici (Wei *et al.*, 2012), i fluorochinoloni (Blasi *et al.*, 2012), le tetracicline (Gordon *et al.*, 2012) e i macrolidi (Corrales-Medina & Musher, 2011). Probabilmente i più importanti effetti secondari di alcuni antibiotici riguardano la neuroprotezione, come nel caso dei  $\beta$ -lattamici, che sono in



grado di minimizzare l'eccitotossicità prodotta dal glutammato (Lau & Tymianski, 2010), la minociclina, una tetraciclina sintetica che agisce da composto neuroprotettivo attraverso meccanismi anti-apoptotici e anti-infiammatori (Plane *et al.*, 2010) o ancora la rapamicina che è un agente antimicotico con proprietà anti-apoptotiche e pro-autofagiche che conferiscono neuroprotezione (Bové *et al.*, 2011). Gli effetti neuroprotettivi delle tetracicline doxiciclina e minociclina sono stati descritti per la prima volta nel 1998 in un modello di ischemia cerebrale globale nei gerbilli. Il trattamento con alte dosi sia di doxiciclina che di minociclina (45 mg/kg 12 ore prima dell'ischemia o 30 minuti dopo l'insulto, seguite da due iniezioni al giorno di 90 mg/kg nei giorni successivi) ha prodotto un aumento della sopravvivenza dei neuroni piramidali CA1 e una ridotta attivazione microgliale. La ridotta attività della microglia è risultata associata ad una ridotta espressione del gene ICE (enzima di conversione dell'IL-1 $\beta$ ), un gene che promuove l'apoptosi e che risulta indotto nella microglia in seguito ad insulto ischemico, e a una riduzione della iNOS (Yrjanheikki *et al.*, 1998). Inoltre, è stato dimostrato che il pre-trattamento con 10 mg/kg di doxiciclina riduce il volume di infarto in un modello di insulto da riperfusione nel ratto (Clark *et al.*, 1997), probabilmente attraverso la riduzione dell'adesione dei leucociti. L'effetto benefico della minociclina sembra invece essere dovuto ad una ridotta attivazione della microglia e della caspasi-3; in aggiunta, la struttura degli astrociti risulta preservata come dimostrato dall'inalterata immunoreattività di GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) (Weng & Kriz, 2007). Gli effetti benefici di un altro agente antinfettivo, la rifampicina (20 mg/kg, singola dose), sono stati descritti in un modello di ischemia cerebrale focale nel topo: la somministrazione del farmaco 30 minuti dopo l'ischemia riduce il numero delle cellule apoptotiche nello striato (Yulug

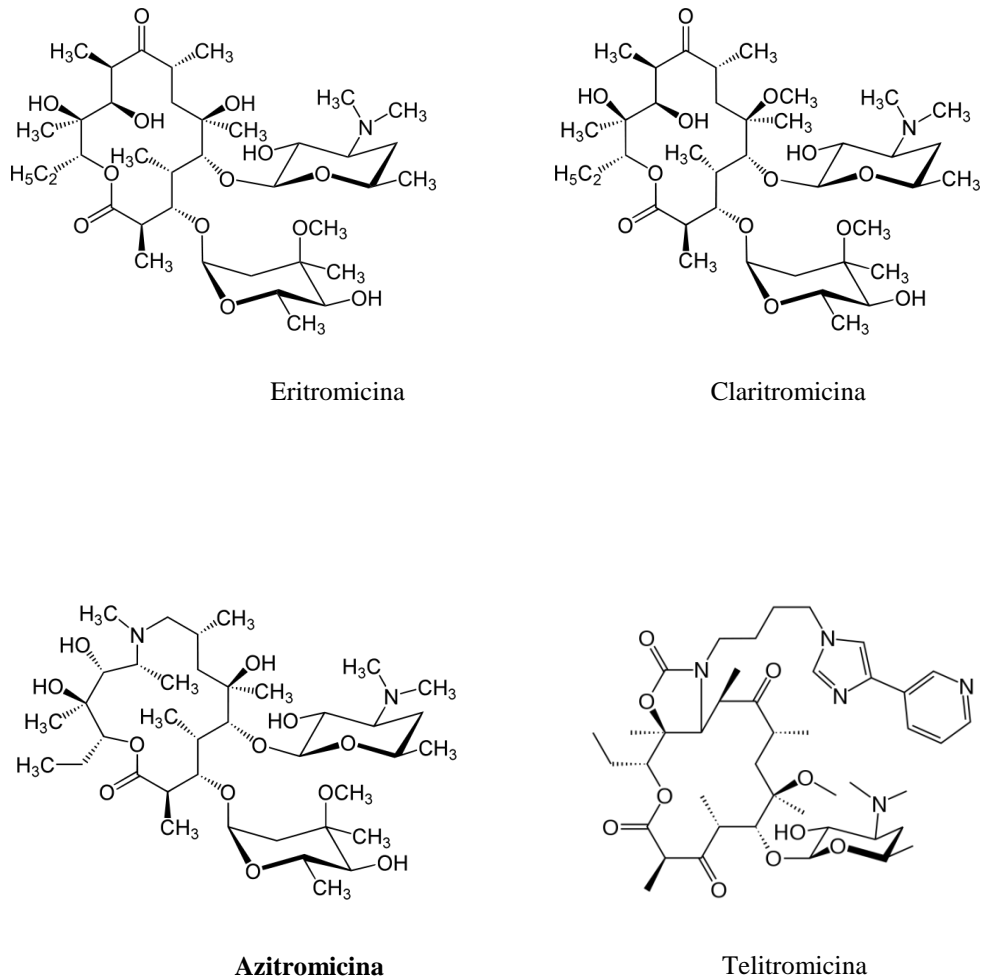
*et al.*, 2004). Queste promettenti osservazioni alimentano l'interesse verso altre classi di antibiotici o singoli composti antibiotici al fine di sfruttare alcune loro caratteristiche, con particolare riferimento all'attività immunomodulatoria, in patologie neuroimmunologiche e neurodegenerative, tra cui l'ischemia cerebrale.

#### 1.4.2 Prospettive per l'impiego degli antibiotici macrolidi nello stroke

I macrolidi sono un gruppo di antibiotici a carattere basico, naturali e semisintetici strettamente correlati. Chimicamente sono caratterizzati da un anello lattonico macrociclico (aglicone) contenente 14, 15 o 16 atomi di carbonio, al quale sono legate una o più molecole di deossizuccheri e deossiaminozuccheri (Fig. 1-10). Il prototipo di questa classe di farmaci è l'eritromicina, ottenuta dallo *Streptomyces erythreus* nel 1952. I macrolidi sono agenti batteriostatici che esplicano la loro maggiore attività a pH alcalino. Il loro spettro d'azione è molto simile e comprende vari cocci, bacilli ed anaerobi sia gram-positivi che gram-negativi, rickettsie, clamydie, mycoplasma pneumoniae, spirochete, micobatteri atipici e toxoplasma gondii, ma non enterobatteri (Bryskier, 1998).

Le indicazioni cliniche riguardano in particolar modo le infezioni delle vie respiratorie, includendo anche il trattamento di sifilide, tetano, gonorrea e difterite. Il meccanismo d'azione dei macrolidi si fonda sulla capacità di inibire la sintesi proteica nei batteri legandosi alla subunità ribosomiale 50S ed inibendo lo stadio di traslocazione, durante il quale una molecola di tRNA neosintetizzata si muove sul ribosoma dal sito accettore (sito A) al sito donatore o peptidilico (sito P), provocando in tal modo l'arresto della riproduzione batterica, (Brisson *et al.*, 1988). I macrolidi

hanno in comune alcune caratteristiche farmacocinetiche, presentano elevata diffusione tissutale con penetrazione ed accumulo intracellulare.



**Figura 1-10: Strutture chimiche di alcuni macrolidi.**

Oltre all'attività antimicrobica, i macrolidi esplicano altri importanti effetti, come l'immunosoppressione e l'immunomodulazione. Per esempio, FK506 è un farmaco immunosoppressivo utilizzato nei trapianti d'organo. Un importante aspetto dell'attività terapeutica degli antibiotici macrolidi riguarda la loro capacità di

concentrarsi nei fagociti. In effetti, questi farmaci presentano proprietà farmacocinetiche cellulari uniche e favorevoli. Le concentrazioni di azitromicina e claritromicina, per esempio, nel fluido epiteliale polmonare tendono ad essere almeno 10 volte superiori a quelle del farmaco nel plasma o nel siero. Queste alte concentrazioni spesso superano la MIC<sub>90</sub> per i comuni patogeni delle vie respiratorie e ciò spiega, almeno in parte, l'efficacia dell'azitromicina e della claritromicina nel trattamento delle infezioni delle basse vie respiratorie (Bearden & Rodvold, 1999). I macrolidi, in modo particolare l'azitromicina, si accumulano nelle cellule infiammatorie a concentrazioni diverse centinaia di volte superiori rispetto a quelle nei fluidi extracellulari (Fieta *et al.*, 1997) permettendo alle cellule fagocitiche di distribuire concentrazioni attive di farmaco nei siti di infezione/infiammazione. La presenza dei macrolidi a concentrazioni così alte nelle cellule e il loro lento efflusso dai leucociti permettono a questi farmaci di alterare alcune funzioni intrinseche di queste cellule. Tuttavia, il meccanismo dell'accumulo intracellulare non è ancora chiaro. Fattori quali ampie differenze interindividuali per quanto riguarda l'*uptake* dei macrolidi, la dipendenza del processo dalla temperatura e dalla vitalità cellulare, fanno pensare ad un processo di trasporto attivo (Vazifeh *et al.*, 1997) con o senza consumo di ATP. Il calcio extracellulare è particolarmente importante in questo processo, dal momento che in sua assenza l'accumulo del farmaco è ridotto. Evidenze indirette suggeriscono un ruolo dell'attività della protein chinasi A nella regolazione del processo di trasporto dei macrolidi (probabilmente mediante un'attività stimolatoria dell'*uptake*) (Hand & Hand, 1995). Sembra che i macrolidi si concentrino soprattutto nel citoplasma delle cellule e nei granuli azurofilari dei neutrofili. L'azitromicina si accumula sia nei fagociti che in cellule non fagocitiche e una percentuale compresa tra

il 50 e il 70% è stata riscontrata nel compartimento lisosomiale, mentre la restante parte è presente nel citosol (Carlier *et al.*, 1994). Anche le cellule epiteliali presentano la capacità di accumulare i macrolidi (azitromicina) ma in misura inferiore rispetto ai neutrofili e ai macrofagi (Pascual *et al.*, 1997). Bermudez *et al.* (1991) hanno dimostrato che le citochine in vitro stimolano l'accumulo dei macrolidi nei macrofagi, suggerendo che nel sito di infiammazione, tali cellule possono accumulare più farmaco rispetto alle condizioni fisiologiche. Tra i macrolidi, l'azitromicina presenta le proprietà farmacocinetiche più vantaggiose, distribuendosi estensivamente in tutti i tessuti (Foulds *et al.*, 1990) e raggiungendo elevate concentrazioni tissutali che si mantengono per un tempo molto superiore a quello osservato per gli altri macrolidi, anche quando le concentrazioni nel sangue si riducono a livelli molto bassi. L'elevata affinità dell'azitromicina per i tessuti è essenzialmente dovuta alla presenza, nella struttura della molecola, di due gruppi amminici terziari basici che le conferiscono proprietà amfifiliche (Gladue *et al.*, 1989). Numerosi studi hanno messo in evidenza che l'efficacia clinica del farmaco si mantiene anche in condizioni di bassi livelli ematici, proprio in relazione al mantenimento delle sue elevate concentrazioni tissutali extravascolari (Retsema *et al.*, 1990). Un'altra importante caratteristica che differenzia l'azitromicina dagli altri antibiotici macrolidi è la sua maggiore stabilità in ambiente acido. A pH 2 si ha una perdita di azitromicina pari al 10% dopo 82 minuti mentre, per esempio, nel caso dell'eritromicina tale perdita si osserva dopo soli 7 secondi (Fiese & Steffen, 1987). Questa stabilità all'ambiente acido fa sì che l'azitromicina venga assorbita meglio degli altri macrolidi e si accumuli più facilmente e a concentrazioni molto più elevate nelle cellule fagocitiche. Diversi studi hanno messo in evidenza come l'azitromicina sia in grado di concentrarsi anche nel tessuto

cerebrale. In topi infettati con *T. gondii* le concentrazioni di azitromicina nel cervello sono risultate estremamente elevate e circa 10 volte superiori a quelle presenti nel siero (Araujo *et al.*, 1991). Le cinetiche di efflusso sono molto diverse tra i macrolidi, molto veloci per eritromicina e claritromicina, ma molto lente per l'azitromicina (Fieta *et al.*, 1997). Queste osservazioni suggeriscono che l'azitromicina può esercitare prolungati effetti anti-infiammatori.

Gli antibiotici macrolidi modulano le funzioni delle cellule infiammatorie, tra cui leucociti, linfociti e macrofagi (Anderson, 1989; Roche *et al.*, 1986). Tra i più importanti effetti dell'interazione dei macrolidi con i fagociti vi sono l'inibizione della produzione di ossidanti e la modulazione della produzione di citochine (Wenisch *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 1999) (Tabella 1-6). È stato osservato come in pazienti affetti da DPB (*diffuse panbronchiolitis*), il trattamento con eritromicina o roxitromicina per 24 mesi riduce i livelli di IL-1 $\beta$ , IL-8 e neutrofili nei fluidi broncoalveolari (Sakito *et al.*, 1996). L'interleuchina-8 è una chemochina che esercita un'importante azione di richiamo nei confronti dei neutrofili. L'eritromicina inibisce il rilascio di questa citochina da parte dei macrofagi e dei leucociti (Schultz *et al.*, 2000). Tale effetto è esplicito anche da altri macrolidi come la claritromicina, che sopprime la produzione di IL-8 in monociti periferici umani stimolati con LPS (Kikuchi *et al.*, 2002). Eritromicina e roxitromicina riducono la produzione di TNF- $\alpha$  e IL-6 in cellule epiteliali umane stimulate con IL-1 $\alpha$ . Un importante effetto sul TNF- $\alpha$  è stato osservato anche con l'azitromicina e tale effetto è risultato associato all'inibizione del richiamo di neutrofili nei polmoni in un modello murino di infezione con *Pseudomonas* (Tsai *et al.*, 2004). I macrolidi hanno mostrato anche la capacità di modificare il rapporto Th1/Th2 nel siero di soggetti affetti da DPB e, quindi, la

produzione di citochine, con una riduzione dei livelli di IL-12 e IFN- $\gamma$  e un aumento di IL-4, IL-5 e IL-3 (Park et al., 2004). Studi più recenti hanno valutato l'effetto dei macrolidi sulla regolazione dei linfociti T da parte delle cellule dendritiche. Da questi studi è emerso come l'azitromicina sia in grado di indurre l'espressione della molecola co-stimolatoria CD80 sulle cellule dendritiche e di aumentare la loro produzione di IL-10 e IL-6 (Sugiyama *et al.*, 2007). Questi dati suggeriscono che i macrolidi potrebbero essere riposizionati per patologie in cui è documentata la rilevanza di tali meccanismi, incluso l'ictus ischemico.

**Tabella 1-6:** Effetti dei macrolidi sul rilascio delle citochine *in vitro*

<b>Citochina</b>	<b>Tipo cellulare</b>	<b>Macrolide</b>	<b>Effetto</b>	<b>Referenze</b>
IL-6	Monociti umani	Azitromicina	Inibizione	Khan et al., (1999)
		Claritromicina		
	Epiteliali bronchiali	Eritromicina	Stimolazione	Bailly et al., (1993)
Eritromicina		Inibizione	Takizawa et al., (1995)	
IL-1	Monociti umani/macrofagi	Azitromicina	Inibizione	Khan et al., (1999)
		Claritromicina		
		Eritromicina		
TNF- $\alpha$	Monociti umani (+LPS)	Azitromicina	Inibizione	Morikawa et al., (1996)
		Eritromicina		Moutard et al., (1999)
IL-8	Epiteliali nasali	Roxitromicina	Inibizione	Suzuki et al., (1997b)
		Eritromicina		
		Claritromicina		
	Eosinofili umani	Eritromicina	Inibizione	Kohyama et al., (1999)
IL-10	Macrofagi	Azitromicina	Induzione	Murphy et al., (2008)

Più in particolare, gli effetti significativi dell'azitromicina sul rilascio di citochine specificatamente coinvolte nell'evoluzione del danno ischemico, quali IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10, insieme alle favorevoli proprietà farmacocinetiche di questo farmaco, ne suggeriscono una potenziale efficacia nell'ischemia cerebrale. I macrolidi (in particolar modo l'azitromicina) sono, inoltre, in grado di ridurre la chemotassi dei neutrofili e la produzione di specie reattive dell'ossigeno da parte della ossidasi NADPH-dipendente (Wenisch *et al.*, 1996). Il trattamento con eritromicina e roxitromicina determina una significativa riduzione dell'espressione della molecola di adesione Mac-1 (CD11b/CD8) ed è associata ad una riduzione del numero di neutrofili nel fluido bronchiale (Lin *et al.*, 2000). Inoltre, alcuni macrolidi, inclusa l'azitromicina, sono in grado di inibire l'adesione dei neutrofili alle cellule epiteliali e di ridurre l'espressione di ICAM-1 (Kawasaki *et al.*, 1998), un mediatore cruciale implicato nell'evoluzione del danno ischemico.



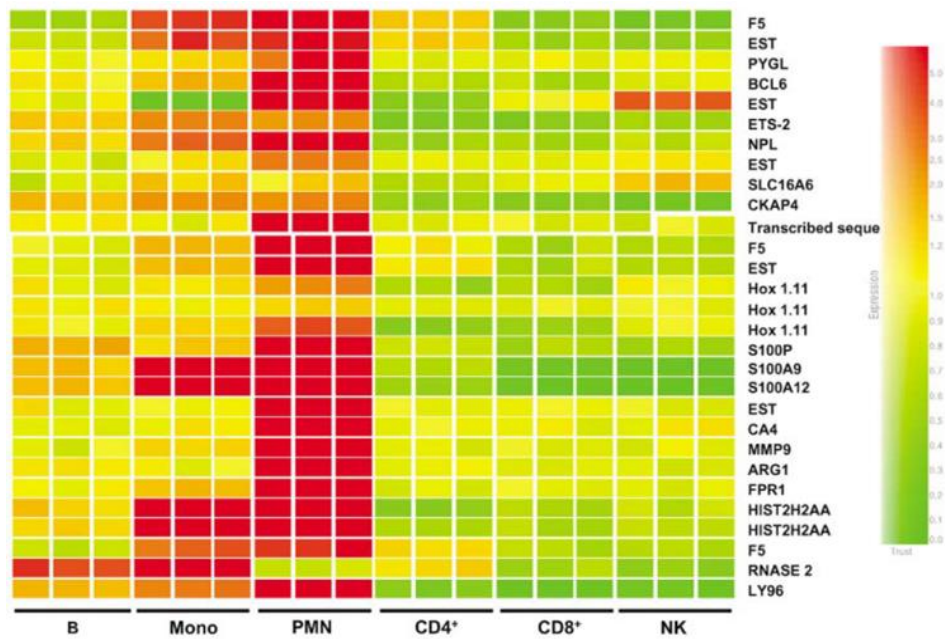
**Tabella 1-7:** Effetti immunomodulatori dei macrolidi

Cellule bersaglio e attività	Referenze
<b>Neutrofili</b>	
Inibizione di:	
Chemotassi	Tsai et al., (2004); Kadota et al., (1993)
Molecole di adesione	Lin et al., (2000); Mukae et al., (1997)
Citochine pro-infiammatorie	Schultz et al., (2000); Tsuchihashi et al., (2002)
Specie reattive dell'ossigeno	Lin et al., (2000); Perry et al., (1992)
Promozione di:	
Apoptosi	Aoshiba et al., 1995; Inamura et al., 2000
<b>Linfociti</b>	
Inibizione di citochine pro-infiammatorie	Asano et al., (2001)
Induzione di:	
Apoptosi	Ishimatsu et al., (2004)
Regolazione da parte delle DC	Sugiyama et al., (2007)
<b>Macrofagi</b>	
Inibizione di citochine pro-infiammatorie	Schultz et al., (2000)
Polarizzazione	Mantovani et al., 2002; Murphy et al., 2008
<b>Cellule endoteliali vascolari</b>	
Inibizione molecole di adesione	Li et al., (2002)

Numerosi studi hanno descritto anche effetti pro-apoptotici sui neutrofili da parte di alcuni macrolidi (eritromicina, roxitromicina e azitromicina) con un meccanismo che è, almeno in parte, cAMP-dipendente (Aoshiba *et al.*, 1995; Inamura *et al.*, 2000). Alcuni macrolidi hanno dimostrato di inibire l'attivazione dei fattori di trascrizione NF- $\kappa$ B e AP-1, regolatori cruciali dell'espressione dell'IL-8. Oltre agli effetti sui neutrofili, alcuni macrolidi svolgono azioni antinfiammatorie mediante la modulazione dell'attività dei macrofagi. Diversi studi hanno dimostrato come

l'azitromicina sia in grado di polarizzare i macrofagi verso il fenotipo benefico M2 determinando una ridotta produzione di IL-12 e IL-6 e un aumento di IL-10. È stata anche osservata una riduzione dei livelli di IL-1 $\beta$ , CCL-2 e TNF- $\alpha$  nei macrofagi alveolari M1 in seguito al trattamento con questo farmaco in soggetti affetti da fibrosi cistica (Meyer *et al.*, 2009). In aggiunta, il profilo delle citochine prodotte dai macrofagi trattati con azitromicina è paragonabile a quello dei macrofagi M2 attivati da IL-4/IL-13. L'induzione di questo fenotipo alternativo è stata anche dimostrata dal fatto che l'azitromicina aumenta la produzione di arginasi e di recettori MR e CD23 specifici degli M2, mentre riduce quella di iNOS e dei recettori CCR7, caratteristici del fenotipo M1 (Murphy *et al.*, 2008).

L'accumulo dell'azitromicina nei PMN e nei macrofagi e la sua capacità di alterarne l'attività e l'espressione di citochine suggerisce una potenziale utilità di questo farmaco nella modulazione del processo infiammatorio post-ischemico. Infatti, mediante studi di microarray è stato osservato che la maggior parte dei geni modulati acutamente nel sangue dei pazienti colpiti da ictus ischemico risiede nei PMN e nei monociti (Fig. 1-11).



**Figura 1-11: Origine cellulare dei geni regolati dallo stroke.** L'analisi è stata effettuata su diversi tipi cellulari inclusi: linfociti B (B), monociti (Mono), PMN, linfociti T CD4<sup>+</sup>, linfociti T CD8<sup>+</sup> e cellule NK.

I principali geni indotti in seguito all'insulto ischemico sono rappresentati dall'anidrasi carbonica 4 (CA4), dall'arginasi I (ARG1), dall'antigene dei linfociti 96 (LY96), dalla metaloproteasi della matrice di tipo 9 (MMP9) e dalla proteina S100 (Brooks *et al.*, 2013) (Tabella 1-8).

**Tabella 1-8:** Principali geni indotti in seguito all'insulto ischemico

<b>Gene</b>	<b>Localizzazione</b>	<b>Attività in seguito ad ischemia</b>
Arginasi I (ARG1)	Rilasciata dai neutrofili durante l'insulto ischemico	Mediatore della risposta infiammatoria post-ischemia; limita la disponibilità dell'arginina per la produzione di NO
Anidasi Carbonica 4 (CA4)	Altamente espressa nei microvasi della BEE	CA4 viene rilasciata dalla BEE in seguito all'insulto ischemico
Antigene 96 dei linfociti (LY96)	Proteina coinvolta nella via di segnale dei recettori toll-like	Mediatore pro-infiammatorio dell'immunità innata che attiva i recettori TLR4
Metalloproteasi della matrice (MMP9)	Rilasciata dai neutrofili durante l'ischemia cerebrale	Implicata nella rottura della BEE attraverso la degradazione della matrice extracellulare
Proteina legante il calcio S100A12	Rilasciata dai granulociti durante l'ischemia cerebrale	Secreta nel sito del danno, amplifica l'immunità innata

Sebbene numerosi studi abbiano dimostrato che gli antibiotici macrolidi esplicano un'importante attività anti-infiammatoria sia in modelli animali di infiammazione (per esempio nella pleurite da carragenina, nella peritonite indotta da zymosan e nell'infiammazione indotta da LPS) che in pazienti affetti da patologie quali la fibrosi cistica, la broncopneumopatia cronica ostruttiva o altre patologie infiammatorie delle vie respiratorie, la rilevanza di tali effetti nelle malattie neurodegenerative, inclusa l'ischemia cerebrale, non è stata ancora studiata.

# CAPITOLO 2

## SCOPO DELLA TESI

L'ictus ischemico rappresenta la seconda causa più comune di morte e la più importante causa di morbidità e disabilità a lungo termine nei paesi industrializzati. Ciò nonostante, l'obiettivo di trattare efficacemente tale patologia nella fase acuta, nei postumi e nell'evitare le recidive non è stato ancora pienamente raggiunto. In effetti, l'unico trattamento farmacologico approvato per pazienti colpiti da ictus ischemico è la trombolisi, utilizzata in meno del 10% dei pazienti a causa della ristretta finestra terapeutica. La comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari alla base dell'insulto ischemico ha portato allo sviluppo di numerosi composti neuroprotettivi mirati al recupero del tessuto cerebrale della penombra ischemica. Tutti questi composti hanno avuto come bersaglio gli eventi che si verificano rapidamente dopo l'inizio dell'ischemia. Ad oggi sono stati condotti più di 1000 studi preclinici mirati all'individuazione di composti neuroprotettivi e più di 100 hanno raggiunto i trial clinici. Tuttavia, la maggior parte di questi farmaci ha prodotto risultati deludenti in clinica a causa della scarsa efficacia o dell'elevata tossicità nei pazienti (Ginsberg *et al.*, 2008). Ciò ha prodotto scetticismo nei riguardi degli approcci puramente basati sul recupero della vitalità neuronale, sottolineando l'esigenza di individuare nuovi target che consentano di prolungare la finestra temporale per l'intervento farmacologico. In effetti, il danno

neuronale è fortemente influenzato dai processi infiammatori e immunitari che evolvono lentamente dopo ischemia (Iadecola & Anrather 2011). Pertanto, il primo obiettivo dello studio è quello di caratterizzare la risposta infiammatoria post-ischemica, sia centrale che periferica, utilizzando un modello di ischemia cerebrale basato sull'occlusione transitoria dell'arteria cerebrale media nei roditori. Tale studio è essenziale per identificare le principali cellule coinvolte nell'infiammazione post-ischemica, ma soprattutto per valutare l'evoluzione spazio-temporale della risposta al fine di individuare i tipi cellulari che più precocemente si attivano e infiltrano il cervello per modulare il danno. A tal proposito, un farmaco ideale per il trattamento dell'ischemia cerebrale non dovrebbe inibire tutte le funzioni delle cellule infiammatorie in quanto alcune componenti del processo infiammatorio risultano necessarie per la limitazione del danno; piuttosto, il trattamento dovrebbe essere mirato all'inibizione dei processi deleteri, promuovendo i meccanismi endogeni di riparazione. A tal fine, il secondo obiettivo di questo lavoro è testare gli effetti protettivi di un farmaco, l'azitromicina, individuato mediante l'approccio del *drug repurposing*. In effetti, attraverso studi di *microarray* è stato osservato che la maggior parte dei geni modulati acutamente nel sangue dei pazienti colpiti da ictus ischemico risiede in cellule coinvolte nel processo infiammatorio, tra cui i PMN e i monociti (Tang *et al.*, 2006; Brooks *et al.*, 2013). L'accumulo dell'azitromicina nei PMN e nei macrofagi e la sua capacità di alterarne le funzioni (Fieta *et al.*, 1997) suggerisce una potenziale utilità di questo farmaco nella modulazione del processo infiammatorio post-ischemico. In questo lavoro, per la prima volta, l'azitromicina viene testata in modelli sperimentali di ischemia cerebrale focale, al fine di valutarne i potenziali effetti benefici sulla riduzione del danno cerebrale.

# CAPITOLO 3

## METODI

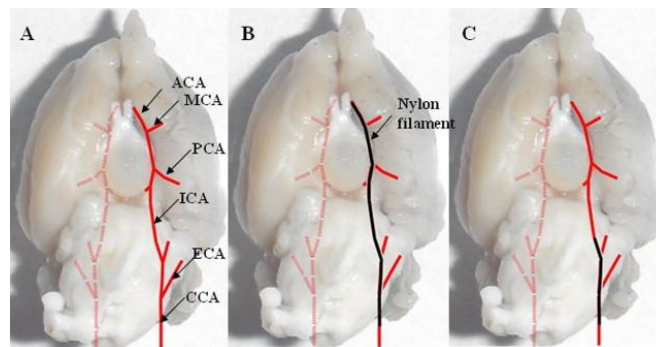
### 3.1 Animali e procedure chirurgiche

La presente attività di ricerca è stata condotta su topi maschi C57BL/6J e ratti maschi Wistar (*Charles River Laboratories*, Calco, Italia) stabulati in condizioni controllate di temperatura (22°C) ed umidità relativa (65%), mantenuti in condizioni d'illuminazione artificiale controllata, con un ciclo luce/buio di 12 ore, con libero accesso a cibo ed acqua. Gli esperimenti condotti sugli animali sono stati effettuati nel pieno rispetto dei protocolli sperimentali del Dipartimento di Farmacia e Scienze della Salute e della Nutrizione (Università della Calabria) e delle direttive della Comunità Europea (86/609/CEE), incluso il D.M. 116/1992 del Ministero della Salute Italiano.

#### 3.1.1 Occlusione dell'arteria cerebrale media

L'ischemia cerebrale è stata indotta mediante l'occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAo) usando la tecnica, relativamente non-invasiva, del filamento intraluminale, come descritto da Longa et al. (1989) con piccole modifiche. I topi (23-26 g) o i ratti (280-320 g) sono stati anestetizzati con isoflurano al 5% in aria durante la fase di induzione, poi mantenuto alla minima concentrazione efficace (1,5-2%)

durante la procedura chirurgica. La temperatura corporea è stata misurata con una sonda rettale e mantenuta a 37°C mediante l'uso di un tappetino riscaldato. Con l'ausilio di uno stereomicroscopio, le arterie carotidi interna ed esterna destre sono state esposte attraverso un'incisione a livello del collo. L'arteria carotide esterna è stata recisa ad una distanza di circa 2 mm dalla biforcazione dell'arteria carotide comune e legata lassamente in prossimità della biforcazione con un filo di seta per sutura. Un filamento di nylon ricoperto di silicone (diametro: 0,37 mm per i ratti e 0,23 mm per i topi, Docol Corporation, Redlands, CA, USA) è stato, quindi, inserito nella carotide esterna e fatto avanzare lentamente nella carotide interna (11 mm nei topi e 18 mm nei ratti dalla biforcazione carotideica), fino ad incontrare una leggera resistenza, indicativa dell'avvenuta occlusione all'origine dell'arteria cerebrale media in corrispondenza del circolo di Willis (Fig. 3-1B).



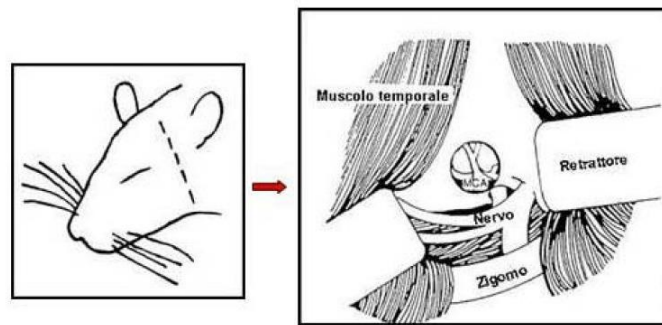
**Figura 3-1: Illustrazione schematica delle principali arterie cerebrali nel ratto.** (A) Arteria cerebrale anteriore (ACA), arteria cerebrale media (MCA), arteria cerebrale posteriore (PCA), arteria carotide interna (ICA), arteria carotide esterna (ECA), arteria carotide comune (CCA). (B) Illustrazione schematica della MCAo con il filamento di nylon (in nero). (C) Illustrazione schematica della chirurgia sham.

Il filo di seta è stato tirato per stringere il nodo attorno al filamento al fine di prevenire il sanguinamento. Per dar luogo alla riperfusione, il filamento è stato rimosso 30 minuti (topi) o 2 ore (ratti) dopo l'MCAo.



Dopo aver richiuso la ferita con punti metallici, la somministrazione dell'anestetico è stata interrotta per consentire il risveglio degli animali, che sono stati poi trasferiti nelle gabbie con libero accesso a cibo e acqua. Gli animali sham sono stati sottoposti alla stessa procedura chirurgica senza occlusione della MCA (Fig. 3-1C).

L'ischemia cerebrale permanente è stata indotta in ratti Wistar come descritto da De Cristòbal *et al.* (2001). Al ratto, anestetizzato con isoflurano, è stata praticata un'incisione verticale di circa 2 cm tra l'orecchio e l'occhio sul lato destro della testa. I lembi di pelle sono stati divaricati per esporre il muscolo temporale destro. Mediante piccole incisioni effettuate con microforbici chirurgiche, il muscolo è stato sollevato e ribaltato, permettendo così l'esposizione dell'osso temporale. Con l'ausilio di un microtrapano, è stata praticata una craniectomia, ossia è stata aperta una piccola finestra nel cranio di circa 2 mm di diametro, in una zona precisa che consente di esporre l'arteria cerebrale media, riconoscibile per la sua struttura anatomica caratteristica (tratto rettilineo preceduto da una biforcazione nella zona superiore) (Fig. 3-2). Dopo l'applicazione di soluzione salina nella zona della craniectomia, per contrastare l'aumento della temperatura provocato dall'utilizzo del microtrapano, la meninge è stata rotta con un ago e la MCA è stata chiusa mediante ligatura con un filo di nylon (9/0) a livello quanto più prossimo alla sua origine dal circolo di Willis (circa 1 mm sopra la scissura rinale ed in prossimità del tratto olfattorio).



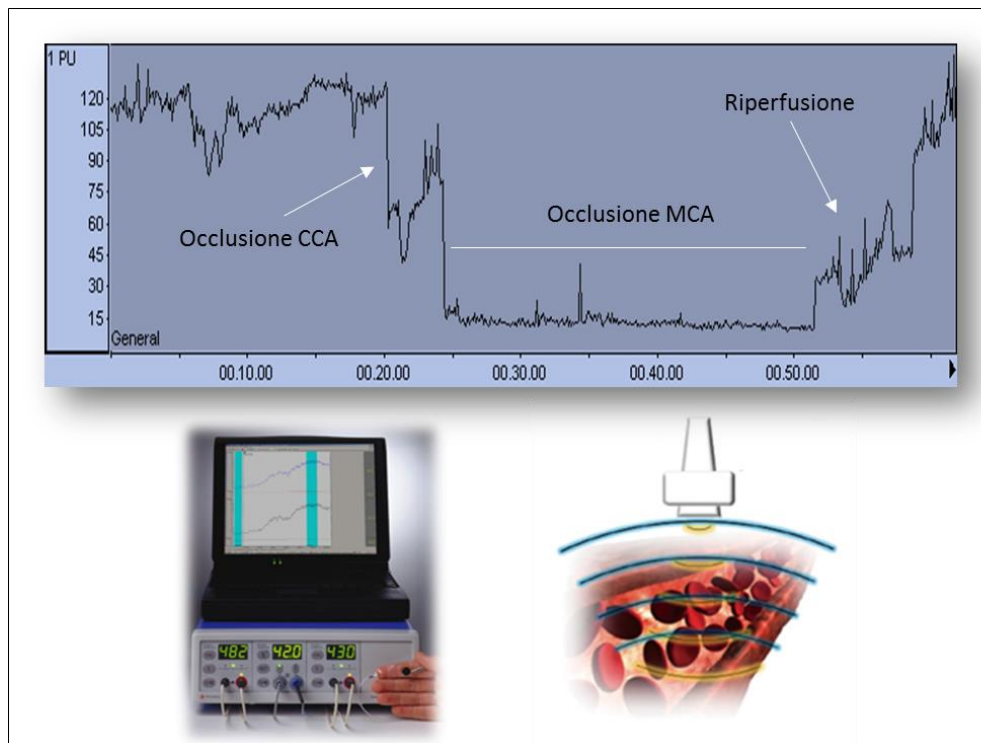
**Figura 3-2: Occlusione distale dell'arteria cerebrale media nel ratto.**

La finestra cranica è stata ricoperta con cellulosa emostatica riassorbibile ed il muscolo temporale riabbassato per poi procedere alla sutura dei lembi di pelle.

### 3.1.2 Monitoraggio del flusso ematico cerebrale mediante Laser-Doppler

Durante la chirurgia il flusso ematico cerebrale (CBF) è stato costantemente monitorato a livello della corteccia cerebrale parietale, corrispondente al territorio irrorato dall'arteria cerebrale media, tramite un Laser-Doppler (Periflux System 5000, Perimed, Stockholm, Sweden) (Fig. 3-3).

Una sonda flessibile a fibre ottiche è stata incollata sull'osso parietale e il flusso ematico regionale è stato monitorato a partire da 20 minuti prima dell'inizio dell'ischemia, fino a 10 minuti dopo la riperfusione nei topi e fino a 10 minuti dopo l'occlusione nei ratti.



**Figura 3-3: Esempio di tracciato relativo alla registrazione del CBF mediante Laser-Doppler.** Per effettuare il monitoraggio del flusso ematico durante la procedura chirurgica è stato utilizzato lo strumento Periflux System 5000.

### 3.1.3 Perfusione intracardiaca

Gli animali sono stati perfusi attraverso il cuore prima con soluzione salina e poi con un fissativo per la preparazione del tessuto cerebrale destinato alle diverse procedure sperimentali (immunofluorescenze, tecnica dell'evans blue, ecc.). Gli animali sono stati anestetizzati con isoflurano al 4% in aria prima dell'apertura della cavità toracica. A tal fine è stata effettuata un'incisione sotto lo sterno ed è stata tagliata la pelle per esporre il diaframma e la cassa toracica. Quest'ultima è stata aperta su entrambi i lati per permettere al tessuto di essere retratto e per consentire l'accesso al cuore ancora pulsante. Un grosso ago è stato inserito nel ventricolo sinistro e fatto avanzare nell'aorta; dopo aver fissato l'ago l'atria destra è stata tagliata per permettere il drenaggio del sangue dal cuore. Con l'ausilio di una pompa

peristaltica una soluzione salina eparinizzata (20-25 ml per i topi, 200-250 ml per i ratti; eparina 4000U/ml) è stata immessa in circolo per eliminare tutto il sangue dai tessuti. Negli esperimenti in cui è richiesta la fissazione del tessuto cerebrale (es. immunofluorescenza), un determinato volume (200 ml nel ratto, 20 ml nel topo) di paraformaldeide al 4% è stato pompato attraverso la circolazione sistemica.

### **3.2   Trattamento farmacologico**

Zitromax® sospensione orale (Pfizer) è stata ricostituita in acqua e somministrata tramite gavage orale alle dosi di 50 o 150 mg/kg. Agli animali controllo è stata somministrata una soluzione di sucrosio (39% in acqua). Zitromax® polvere per soluzione per infusione (Pfizer) è stata ricostituita in soluzione salina (0,9% NaCl) e somministrata alle dosi indicate (0,15 – 150 mg/kg) attraverso la via intraperitoneale. Agli animali controllo è stata somministrata soluzione salina (0,9% NaCl).

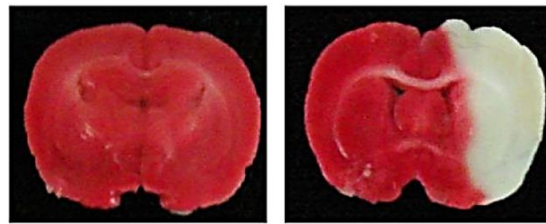
### **3.3   Neuropatologia e quantificazione del danno ischemico**

Per la quantificazione del danno ischemico gli animali sono stati sacrificati a specifici tempi dopo l'induzione dell'ischemia e i cervelli sono stati rapidamente prelevati e congelati.

Nei ratti, il volume di infarto cerebrale è stato valutato mediante la colorazione delle fettine cerebrali con 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC).

Il TTC è utilizzato da più di 50 anni per l'identificazione delle aree di danno tissutale ischemico. Si tratta di un sale solubile in acqua che nel tessuto cerebrale in condizioni

normali viene ridotto dalla succinato deidrogenasi mitocondriale in formazano, un composto insolubile di colore rosso. Nel tessuto ischemico, questi sistemi enzimatici mitocondriali risultano compromessi e, di conseguenza, le aree infartuate non si colorano (Fig. 3-4).



**Figura 3-4: Colorazione con TTC di sezioni cerebrali di ratto.** L'immagine sulla sinistra rappresenta una fettina coronale cerebrale di ratto sottoposto a procedura sham, mentre l'immagine sulla destra è rappresentativa della colorazione che si ottiene in ratti sottoposti a 24 ore di MCAo.

I cervelli sono stati tagliati in 8 sezioni coronali consecutive (Osborne *et al.*, 1987) (Fig. 3-5), ad intervalli di 2 mm dal lobo frontale utilizzando un calco per il cervello di ratto (Harvard Apparatus, Massachusetts, USA). Le fettine sono state incubate in una soluzione di TTC al 2% in salina, per 15 minuti a 37°C. Le sezioni cerebrali sono state quindi rimosse dalla soluzione e fissate con paraformaldeide al 4%.

**Livello 1: Bregma = 3,20 mm**



**Livello 2: Bregma = 1,20 mm**



**Livello 3: Bregma = -0,26 mm**



**Livello 4: Bregma = -0,80 mm**



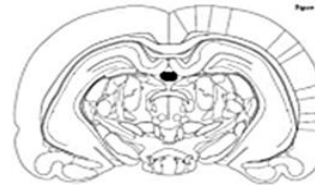
**Livello 5: Bregma = -1,80 mm**



**Livello 6: Bregma = -3,14 mm**



**Livello 7: Bregma = -4,80 mm**



**Livello 8: Bregma = -6,30 mm**



**Figura 3-5: Definizione delle otto fettine coronali secondo Osborne *et al* (1987).** Le figure sono riprodotte dall'atlante stereotassico di Paxinos & Watson (1998) con la distanza dal bregma definita ad ogni livello.

L'impiego di sali di tetrazolio come indicatori di enzimi respiratori mitocondriali è considerato un metodo riproducibile nella valutazione del danno ischemico nell'intervallo compreso tra 2,5 e 36 ore dopo l'induzione dell'ischemia. A tempi più tardivi l'intensa attivazione microgliale e l'infiltrazione dei leucociti, in cui i mitocondri sono perfettamente funzionali, potrebbero mascherare la presenza di un

infarto tissutale (Liszczak *et al.*, 1984). Pertanto, per valutare il volume di infarto 2, 3 o 7 giorni dopo l'MCAo, i cervelli sono stati prelevati e immediatamente congelati in isopentano a -20 °C. I cervelli sono stati successivamente tagliati al criostato per ottenere sezioni coronali di 20 µm a intervalli di 2 mm (per i ratti) o di 0,5 mm (per i topi) dal bulbo olfattorio fino al cervelletto. Le sezioni sono state montate su vetrini Superfrost-plus e colorate con cresil violetto. A tal fine, i vetrini sono stati immersi in etanolo assoluto a -80°C per 15 minuti e successivamente in soluzioni acquose di etanolo al 100, 90, 70, 50%, ciascuno per un minuto e alla fine in acqua distillata per un minuto.

Le sezioni sono state quindi immerse in una soluzione allo 0,5% (in tampone acetato 0,1M) di cresil violetto (C1791, Sigma-Aldrich, Milano) per 10 minuti e successivamente lavate in acqua distillata. Le immagini delle sezioni colorate con TTC o con cresil violetto sono state digitalizzate mediante uno scanner e analizzate utilizzando un software per le analisi di immagini (ImageJ).

Il volume di infarto (mm<sup>3</sup>) è stato calcolato sommando le aree ischemiche su ciascuna fettina (aree di colore bianco) e moltiplicando per lo spessore tra due fettine. Il volume dell'edema è stato calcolato sottraendo dal volume dell'emisfero ischemico quello dell'emisfero controlaterale (non ischemico).

### **3.4 Valutazione del deficit neurologico**

Al fine di valutare la variazione dello stato neurocomportamentale dei topi e dei ratti sottoposti a occlusione dell'arteria cerebrale media è stato utilizzato il metodo (modificato) di Bederson. La scala originale a 4 punti sviluppata da Bederson *et al.*

(1986b) è stata modificata ed ampliata fino a 6 punti (Tabella 3-1 ) assegnando agli animali un valore “score” da 0 a 5 correlato alla severità del danno cerebrale indotto da MCAo.

**Tabella 3-1:** Scala di valutazione del deficit funzionale in animali con MCAo

<b>Scala di valutazione neurologica</b>	<b>Deficit funzionali osservati</b>
Grado 0	Nessun deficit osservabile
Grado 1	Ridotta capacità di estensione della zampa controlaterale
Grado 2	Ridotta resistenza ad una spinta laterale
Grado 3	Movimento rotatorio spontaneo
Grado 4	Nessun movimento spontaneo
Grado 5	Morte

### **3.5 Valutazione della permeabilità della BEE mediante Evans Blue**

Per la valutazione della rottura della barriera emato-encefalica è stata utilizzata la tecnica dell’Evans Blue, un colorante che si lega con alta affinità all’albumina sierica, consentendone di quantificare la fuoriuscita dai vasi (Manaenko *et al.*, 2011). L’Evans Blue (E2129, Sigma-Aldrich, Milano) (4% in salina) è stato somministrato i.p. (8 ml/Kg) due ore prima del sacrificio. Quindi, gli animali sono stati anestetizzati con isoflurano e sono stati perfusi attraverso il cuore con 50 ml di PBS, 0.1M a temperatura ambiente. I cervelli sono stati rapidamente prelevati, divisi in emisfero destro ed emisfero sinistro e immediatamente pesati. Ciascun emisfero è stato immerso in 400 µl di formammide (47671, Sigma-Aldrich, Milano) e incubato a 50°C



per 48 ore per l'estrazione del colorante. Dopo rimozione del tessuto, è stato misurato il volume di formammide residuo e a ogni provetta sono stati aggiunti 500 µl di formammide pura (per ottenere un volume sufficiente per l'analisi allo spettrofotometro). La colorazione è stata misurata allo spettrofotometro a 620 nm e quantificata tramite una curva standard ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di Evans Blue (0,1, 0,3, 1 e 10 µg/ml) in formammide. I risultati sono stati espressi come µg di Evans blue / g di tessuto.

### **3.6 Immunofluorescenza**

Per la caratterizzazione delle risposte cellulari in seguito ad ischemia cerebrale è stata utilizzata l'analisi immunoistochimica con specifici anticorpi per i diversi tipi cellulari coinvolti nella risposta infiammatoria, sia locale che sistemica. Gli animali sono stati perfusi attraverso il cuore con salina (0.9 % di NaCl) seguita da paraformaldeide al 4 % in tampone fosfato (PB 0,1 M pH 7,4).

Successivamente, i cervelli sono stati rapidamente prelevati e post-fissati in paraformaldeide al 4% per 2 h. Dopo tre lavaggi in PB, i cervelli sono stati crioprotetti in una soluzione di saccarosio al 30 % in PB a 4 C° per due giorni e successivamente congelati. Utilizzando un criostato, da ogni cervello sono state ottenute sezioni coronali di 40 µm, a livello delle regioni cerebrali irrorate dall'MCA.

Dopo due lavaggi in PB, le sezioni sono state incubate per un'ora con una soluzione che blocca il legame aspecifico (5% normal goat serum, 0.3% Triton X-100 in PB).

Per gli studi di colocalizzazione, le sezioni sono state incubate con i seguenti anticorpi primari per 24 ore a 4°C: rat anti mouse CD11b per microglia/macrofagi (diluizione

1:200; AbD Serotec), rabbit anti-GFAP (anti-gliial fibrillary acidic protein; diluizione 1:200; Millipore) marker specifico per gli astrociti, rabbit anti-NeuN (anti-neuronal nuclei; diluizione 1:200; Chemicon International, Temecula, CA) specifico per i neuroni, rat anti mouse Ly-6B.2 (diluizione 1:200; AbD Serotec) per i neutrofilii, rabbit anti-Iba1 (diluizione 1:500; Wako) per microglia/macrofagi, hamster anti mouse CD3 (diluizione 1:200; AbD Serotec) per i linfociti T. Gli anticorpi primari sono stati preparati in una soluzione contenente PB/Triton-X100 0,3%. Dopo tre lavaggi con PB, le sezioni sono state incubate per 2 h a temperatura ambiente con una soluzione contenente gli anticorpi secondari coniugati con i fluorocromi AlexaFluor 488 o AlexaFluor 594.

Infine i nuclei sono stati marcati con DAPI (diluizione 1:500; Sigma-Aldrich, Milan, Italy). Il DAPI è un colorante fluorescente che lega fortemente le regioni ricche in A-T del DNA. Tutte le sezioni sono state coperte con vetrino utilizzando un gel di montaggio acquoso (Fluoromount, Sigma) per proteggere la fluorescenza e conservate al buio a 4°C.

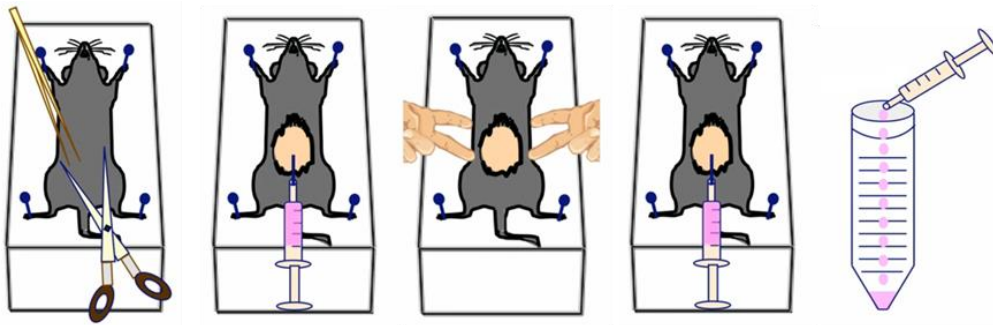
L'acquisizione delle immagini è stata effettuata mediante un microscopio a fluorescenza (Leica DMI6000B) dotato di una telecamera digitale ad alta risoluzione (Leica DFC350FX) e software specifico (LAS AF6000).

### **3.7 Analisi citofluorimetrica**

I topi sono stati anestetizzati con isoflurano per i prelievi dei campioni di sangue e per i lavaggi peritoneali. Il sangue è stato prelevato dal seno venoso retro-orbitale utilizzando una siringa eparinizzata e i leucociti sono stati isolati mediante

separazione su gradiente di densità Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare-Amersham). Il sangue è stato diluito 1:2 con PBS e stratificato sul gradiente di densità Ficoll. Dopo la centrifuga, l'anello contenente i monociti è stato raccolto, trasferito in una nuova provetta e lavato con PBS contenente 1% di siero; il pellet di neutrofili ed eritrociti è stato mescolato con destrano ad una concentrazione finale dell'1% ed incubato per 20 minuti a temperatura ambiente. Dopo un'incubazione a 37°C per un'ora, il surnatante, contenente i leucociti, è stato recuperato e gli eritrociti rimanenti sono stati lisati in NH<sub>4</sub>Cl allo 0,8% per 5 minuti. Il surnatante è stato quindi centrifugato (300×g) a 4°C per 5 minuti e il pellet, contenente i leucociti, è stato risospeso in 600 µl di buffer (0,02% NaN<sub>3</sub>, 1% FBS, PBS 0,1M, pH 7,4).

Per il prelievo delle cellule peritoneali è stata tagliata la pelliccia che ricopre l'addome per esporre il peritoneo. Con una siringa di 27G sono stati iniettati nel peritoneo 5 ml di PBS freddo (con FCS al 3%) facendo attenzione a non danneggiare gli organi interni. Dopo l'iniezione, il fluido peritoneale è stato agitato per recuperare il maggior numero di cellule nella soluzione di PBS. Successivamente, la sospensione cellulare è stata recuperata dalla cavità peritoneale con una siringa (con ago di 25G) e trasferita in tubi da 15 ml. La sospensione è stata, quindi, centrifugata a 400×g per 10 minuti a 4°C. Il surnatante è stato allontanato mentre il pellet è stato risospeso in DMEM/F12-10 freddo.



**Figura 3-6: Illustrazione schematica delle principali fasi del prelievo delle cellule peritoneali.** Dopo aver tagliato la pelliccia dell'animale a livello dell'addome si procede all'iniezione della soluzione nella cavità peritoneale. Si massaggia delicatamente il peritoneo e si procede al recupero della sospensione cellulare che viene versata in un tubo di raccolta per le analisi successive.

Per ottenere le sospensioni cellulari dalle milze, il tessuto è stato prelevato, tagliato a cubetti e digerito con una soluzione contenente 0,1 mg/ml di DNasi I (Roche) e 1 mg/ml di collagenasi D (Roche) in HBSS per 30 minuti a 37°C. La lisi degli eritrociti è stata effettuata con una soluzione 1× di BD Pharm Lyse (BD Biosciences). Le cellule sono state lavate e contate prima della colorazione per l'analisi citofluorimetrica.

I cervelli sono stati rapidamente isolati, rimuovendo il bulbo olfattorio e il cervelletto e dividendoli in emisferi ischemici e non ischemici, per poi procedere alla dissociazione meccanica. Le sospensioni cerebrali sono state pellettate e incubate in un buffer di separazione (RPMI con 20 U/ml di collagenasi II e 25 U/ml di DNasi I) a 37 °C per 45 minuti. Le cellule sono state lavate due volte con RPMI e risospese in un volume finale di 10 ml. Per separare le cellule dai detriti cellulari sono stati usati gradienti di Percoll (Amersham Pharmacia, NJ, USA). I tubi sono stati centrifugati a 600×g a temperatura ambiente per 30 minuti. Successivamente sono stati eliminati lo strato superiore e quello localizzato all'interfaccia dei due gradienti utilizzati e che

conteneva i detriti cellulari. Gli strati rimanenti sono stati diluiti con RPMI e le cellule sono state pellettate. Le cellule sono state poi contate con trypan blue.

Per tutti gli esperimenti, le cellule sono state sottoposte a varie fasi di incubazione per la marcatura prima dell'analisi citofluorimetrica utilizzando i seguenti anticorpi: rat anti-mouse CD11b-PE (Caltag, Burlingame, CA); rat anti-mouse Gr-1-FITC (Immunokontakt, Abingdon, UK); F4/80-APC (eBioscience).

### **3.8 Analisi statistica**

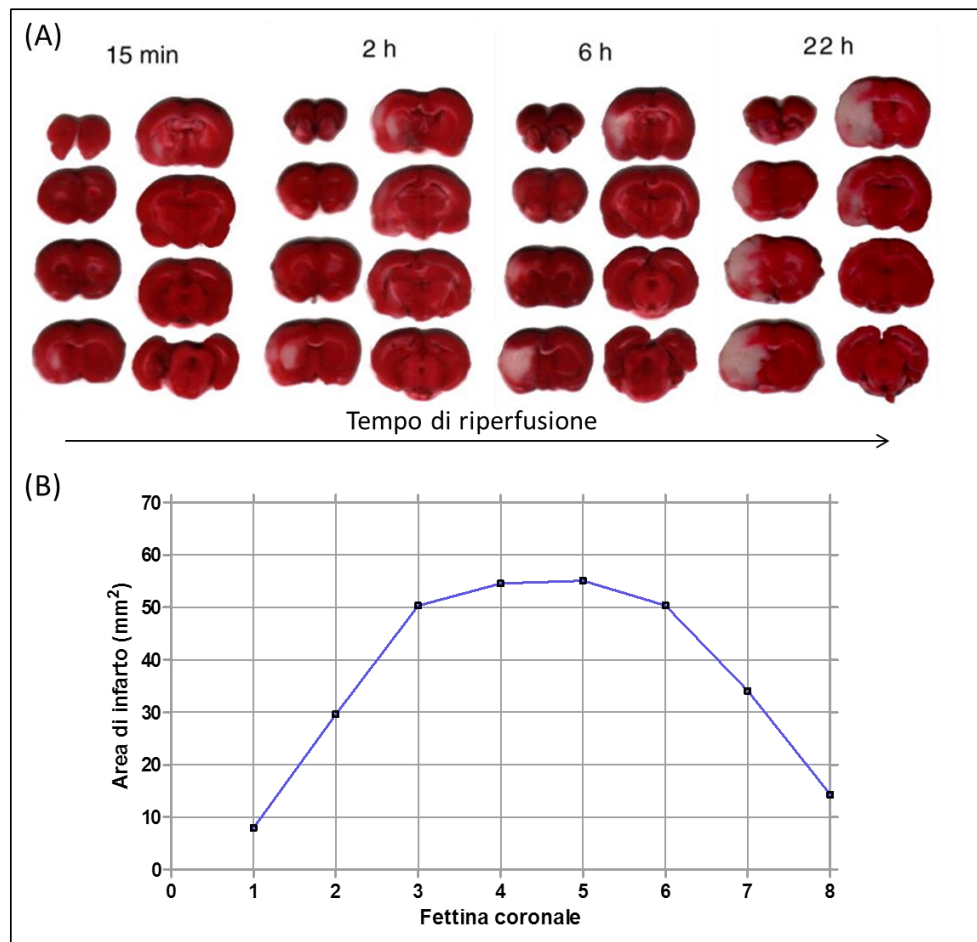
I dati sono stati espressi come media  $\pm$  S.E.M. e sottoposti ad analisi statistica come riportato nelle leggende delle figure. Sono stati considerati statisticamente significativi i valori di P inferiori a 0,05.

# **CAPITOLO 4**

## **RISULTATI**

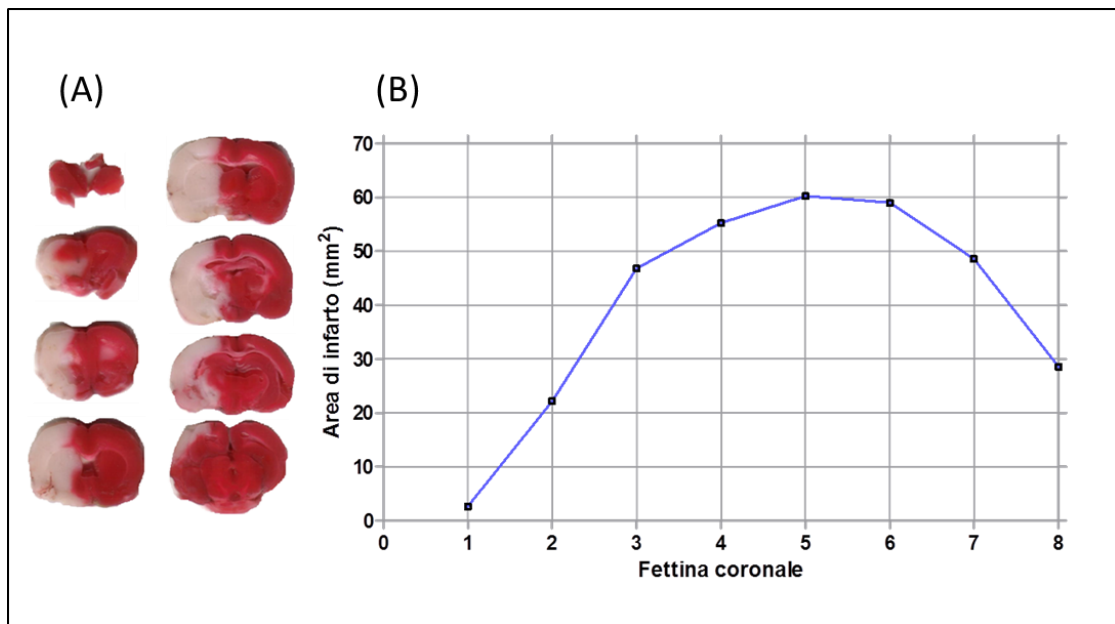
### **4.1 Analisi del danno cerebrale indotto da MCAo nei roditori**

Il danno cerebrale indotto, nei ratti, da 2 ore di occlusione dell'arteria cerebrale media è stato valutato a diversi tempi di riperfusione (15 min, 2, 6 e 22 ore). Dai risultati è emerso come dopo 15 minuti di riperfusione tale danno è limitato ad una piccola porzione dello striato mentre a tempi di riperfusione più prolungati si estende progressivamente alla corteccia parietale, per poi interessare tutto lo striato e la corteccia fronto-parietale dopo 22 ore di riperfusione (Fig. 4-1).



**Figura 4-1: Quantificazione del danno cerebrale indotto da MCAo transitoria nel ratto.** (A) Sezioni cerebrali rappresentative colorate con TTC a diversi tempi di ripercuzione (15 minuti, 2 - 6 e 22 ore) e (B) valori corrispondenti delle aree di infarto in ratti sottoposti a 2 ore di MCAo seguite da 22 ore di ripercuzione.

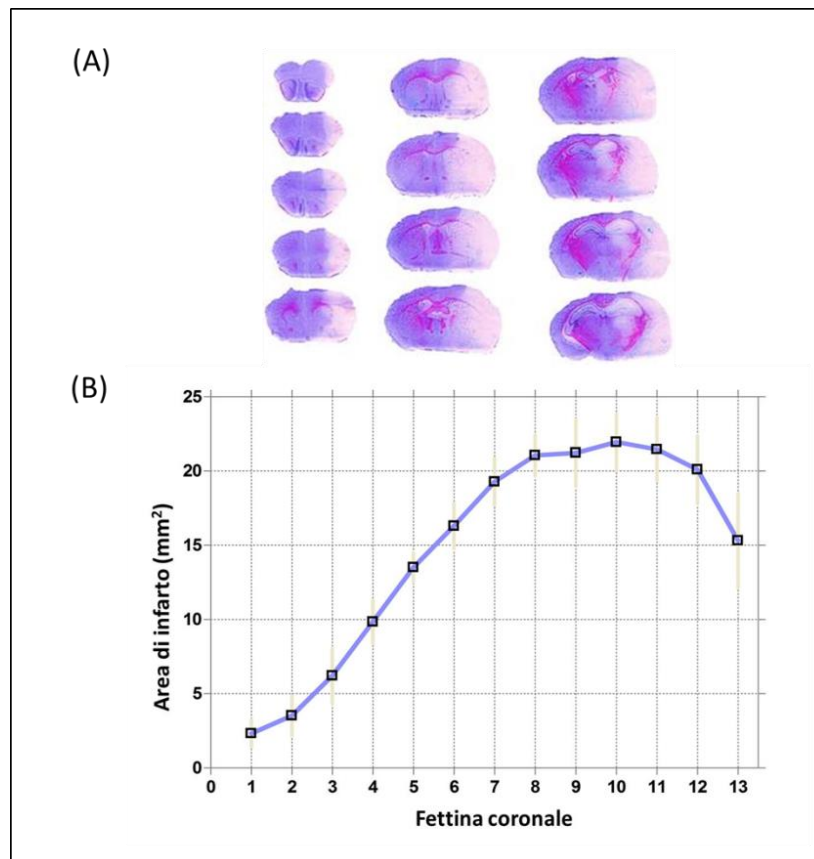
L'occlusione permanente (24 ore) dell'arteria cerebrale media produce un danno paragonabile a quello osservato in seguito all'occlusione transitoria (2 ore) del vaso seguita da 22 ore di ripercuzione (Fig. 4-2).



**Figura 4-2: Quantificazione del danno cerebrale indotto da MCAo permanente nel ratto.** (A) Sezioni cerebrali rappresentative colorate con TTC e (B) valori corrispondenti delle aree di infarto in ratti sottoposti a 24 ore di MCAo permanente.

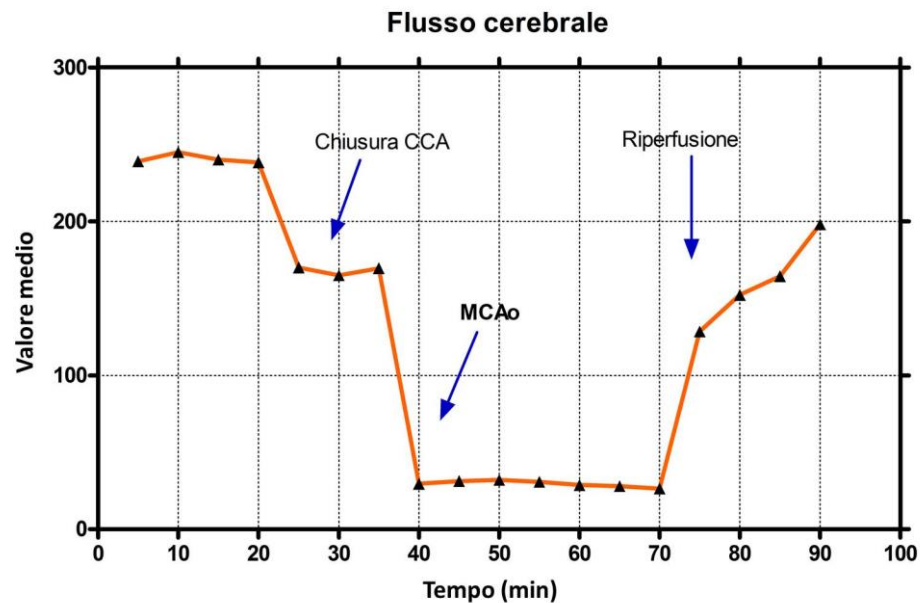
Nei topo, il danno cerebrale prodotto da 30 minuti di MCAo e 48 ore di riperfusione interessa le aree cerebrali irrorate dall'arteria cerebrale media, quali lo striato e la corteccia frontoparietale (Fig. 4-3A). La lesione, corrispondente all'area bianca in seguito a colorazione delle fettine cerebrali con cresil violetto, ha un volume di circa  $90 \text{ mm}^3$  mentre l'edema è pari a circa  $35,12 \text{ mm}^3$ .





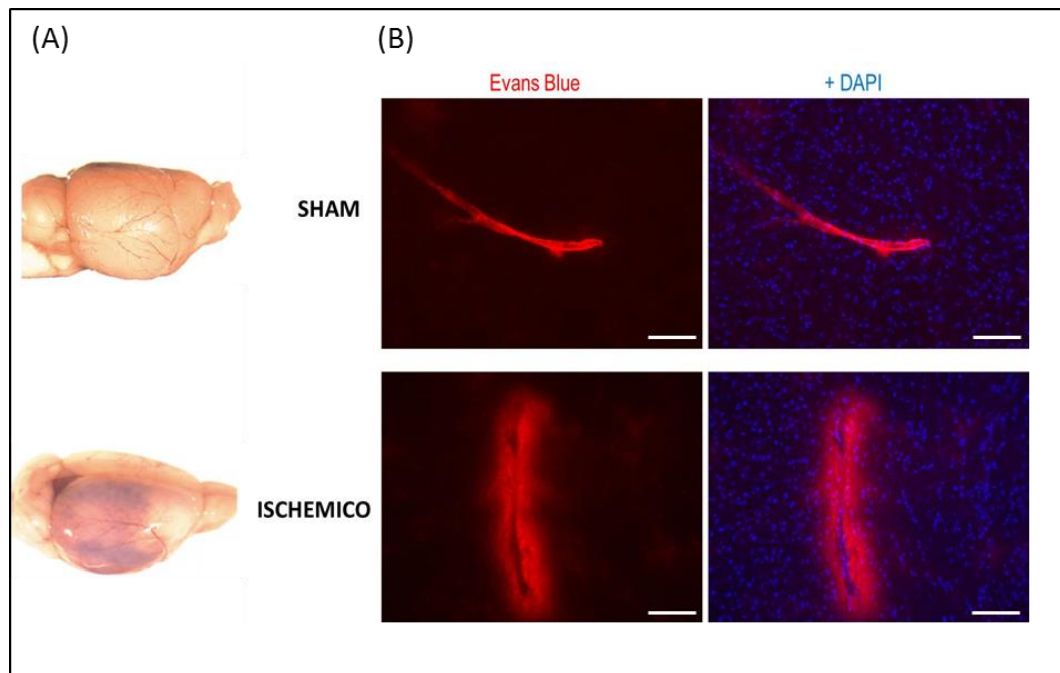
**Figura 4-3: Quantificazione del danno cerebrale indotto da MCAo transitoria nel topo.** (A) Sezioni cerebrali rappresentative colorate con cresil violetto e (B) valori corrispondenti delle aree di infarto in topi sottoposti a 30 minuti di MCAo seguiti da 48 ore di riperfusione.

La corretta occlusione dell'arteria cerebrale media è stata valutata mediante monitoraggio del flusso ematico cerebrale con Laser-Doppler, utilizzando una sonda posizionata a livello dell'osso parietale, ovvero in corrispondenza della corteccia irrorata dalla MCA. Il corretto inserimento del filamento di nylon fino all'origine della MCA determina una drastica riduzione del flusso ematico (Fig. 4-4). In tutti gli esperimenti effettuati sono stati presi in esame soltanto gli animali che hanno mostrato una riduzione del flusso ematico cerebrale di almeno il 70% rispetto ai valori basali e un recupero del flusso pari al 70% al momento della riperfusione.



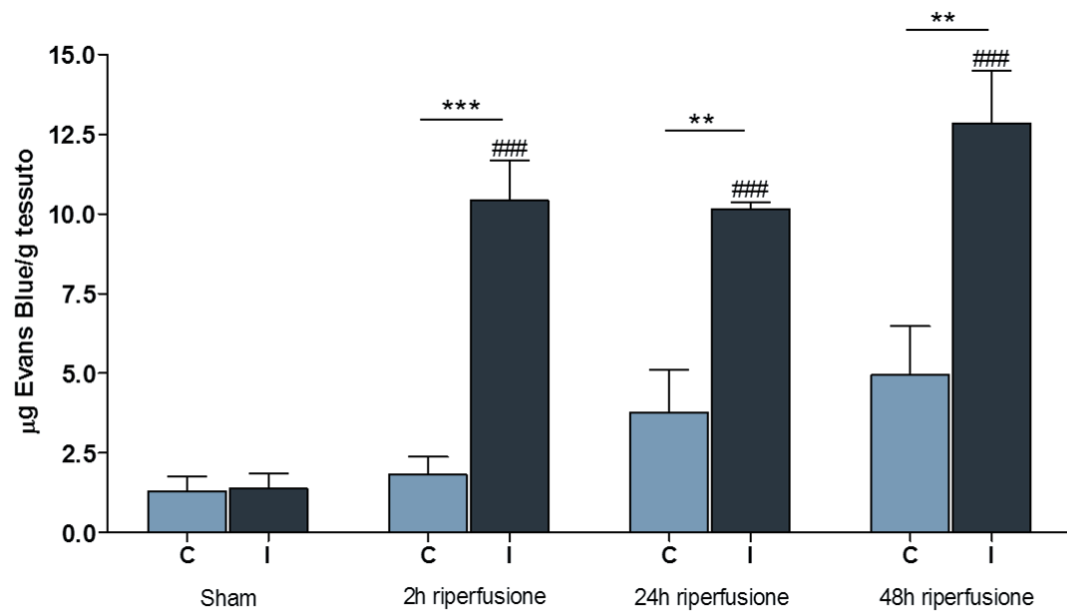
**Figura 4-4: Monitoraggio del flusso ematico cerebrale.** Per confermare l'avvenuta occlusione della MCA, il flusso ematico cerebrale regionale (rCBF) è stato monitorato mediante flussimetria laser Doppler prima, durante e dopo l'MCAo. Durante l'MCAo il valore di rCBF subisce una riduzione di circa l'80% rispetto al valore basale. CCA indica l'arteria carotide comune.

Per valutare il danno alla BEE prodotto da MCAo nei topi è stata utilizzata la tecnica della permeabilità all'Evans Blue che consente di identificare le aree di apertura della barriera valutando il trasferimento del colorante dai vasi al parenchima cerebrale. La colorazione è risultata assente nei cervelli di animali sham, tranne che per una piccola quantità presente nello stroma del plesso coroideo, area in cui è assente la barriera emato-encefalica. Dopo 24 ore di riperfusione è evidente come il danno alla BEE interessi il territorio irrorato dalla MCA (zona blu in Fig. 4-5A). L'analisi al microscopio confocale delle sezioni cerebrali ha confermato come negli animali ischemici (30 min MCAo + 24h di riperfusione) vi sia una fuoriuscita di Evans Blue dai vasi (Fig. 4-5B), a livello della corteccia parietale e dello striato mediale (dati non mostrati). Negli animali sham, la fluorescenza, indicativa della presenza di Evans Blue, è limitata alle aree interne ai vasi (Fig. 4-5B).



**Figura 4-5: Valutazione del danno alla BEE causato da MCAo nei topi.** (A) Immagini rappresentative di cervelli di topo in cui si osserva, dopo 30 min di MCAo seguiti da 24h di ri-perfusione, la fuoriuscita di Evans Blue dai vasi; (B) Analisi al microscopio confocale della fuoriuscita dell'Evans Blue dai vasi. Il colorante è stato somministrato due ore prima del sacrificio dell'animale. L'Evans Blue (in rosso) fuoriesce dai vasi danneggiati, mentre rimane all'interno dei vasi in animali sham. Scala = 150  $\mu$ m.

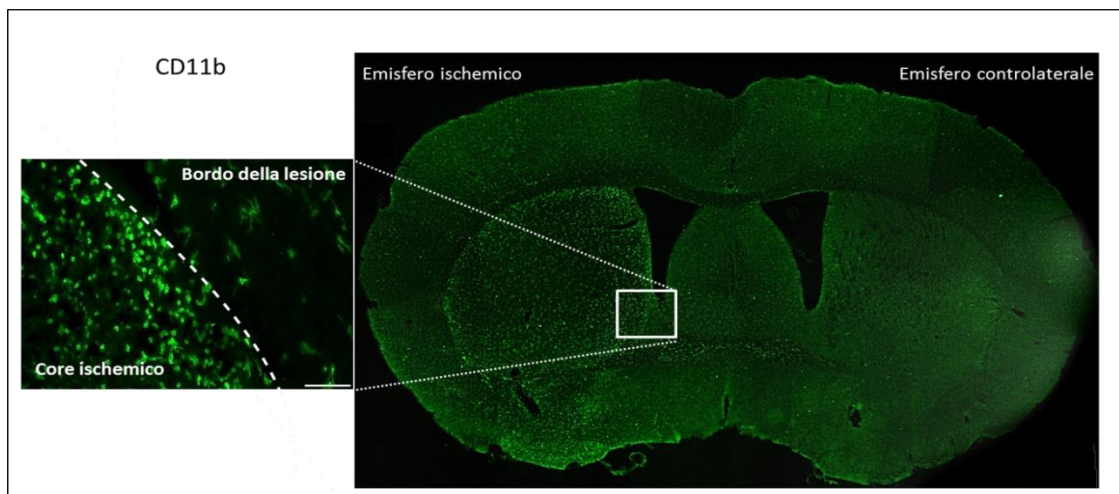
L'analisi quantitativa, mediante spettrofotometria, ha rivelato come la rottura della barriera emato-encefalica rappresenti un evento precoce dopo l'insulto ischemico. Infatti, già a due ore dall'inizio dell'insulto si è osservata una quantità significativamente alta di colorante nel tessuto cerebrale dell'emisfero ischemico se paragonata a quella presente nello stesso emisfero degli animali sham ( $10,45 \pm 2,5 \mu\text{g/g}$ ,  $P < 0,001$  vs. sham; Fig. 4-6). Dopo 24 h di ri-perfusione la quantità di Evans Blue presente nell'emisfero ischemico è risultata paragonabile a quella misurata alle 2 h ( $10,15 \pm 1,2 \mu\text{g/g}$ ,  $P < 0,001$  vs. sham; Fig. 4-6). La penetrazione tissutale di EB è risultata massima dopo 48 h dall'inizio della ri-perfusione ( $12,84 \pm 1,8 \mu\text{g/g}$ ,  $P < 0,001$  vs. sham; Fig. 4-6).



**Figura 4-6: Analisi della permeabilità della BEE dopo MCAo.** Extravasazione dell'Evans Blue nell'emisfero ipsilaterale (I, ischemico) e controlaterale (C, non ischemico) a differenti tempi dopo MCAo transitoria nei topi. I dati sono mostrati come medie  $\pm$  S.E.M. I valori sono stati espressi come  $\mu\text{g}$  di colorante per g di tessuto cerebrale (\*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  vs controlaterale; ###  $P < 0,001$  vs Sham ipsilaterale; ANOVA a due vie seguita dal post test di Bonferroni;  $n=4$  per ogni gruppo sperimentale).

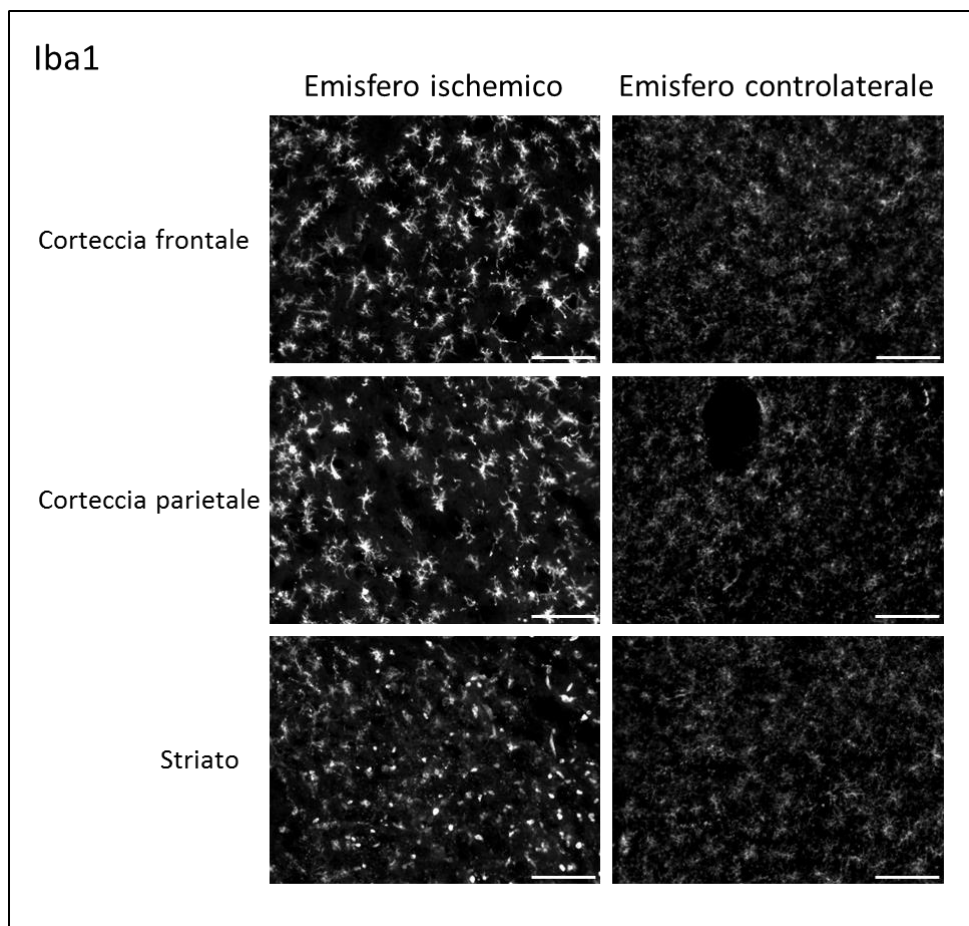
## 4.2 Caratterizzazione della risposta neuroinfiammatoria in seguito ad ischemia cerebrale focale transitoria

L'analisi spatio-temporale delle risposte cellulari cerebrali in seguito all'occlusione dell'arteria cerebrale media è stata condotta mediante esperimenti di immunofluorescenza. Le cellule microgliali sono le prime a rispondere all'insulto tissutale ischemico nel cervello mostrando segni di attivazione entro pochi minuti dall'inizio dell'ischemia. Lo stato di attivazione di queste cellule è stato studiato a diversi tempi di riperfusione utilizzando un anticorpo anti-CD11b, marker costitutivo della microglia. Nelle aree non interessate dall'ischemia e nell'emisfero controlaterale la fluorescenza di CD11b ha rivelato sottili ramificazioni e piccoli corpi cellulari, tipici delle cellule microgliali in uno stato quiescente, mentre dopo 48 ore di riperfusione, la microglia è apparsa fortemente attivata (Fig. 4-7).



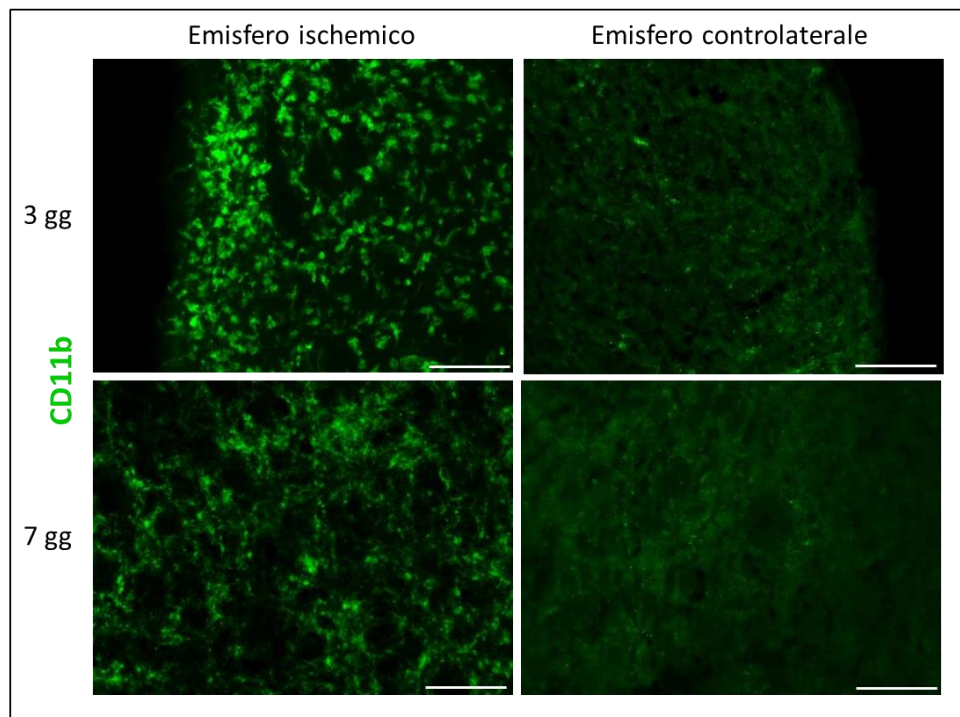
**Figura 4-7: Attivazione della microglia nell'emisfero ischemico.** Immunofluorescenza di CD11b nel cervello di topo sottoposto a 30 minuti di MCAo seguiti da 48 ore di riperfusione. Nell'emisfero controlaterale, la microglia continua a mantenere uno stato quiescente. L'ingrandimento mostra come nel core ischemico, le cellule CD11b positive sono prevalentemente globulari mentre al margine della lesione presentano una forma più irregolare e ramificazioni.

L'immunoreattività di CD11b è risultata associata ad una diversa morfologia in relazione alla localizzazione cellulare nell'area lesionata. Sono state identificate due principali aree, in particolare il bordo della lesione in cui le cellule microgliali presentavano un soma cellulare più grande e le tipiche ramificazioni, e la regione del core ischemico in cui le cellule presentavano una forma ameboide con soma ipertrofico (Fig. 4-7, 4-8), tipica delle cellule microgliali in uno stato attivato, in cui esercitano la loro attività fagocitica.



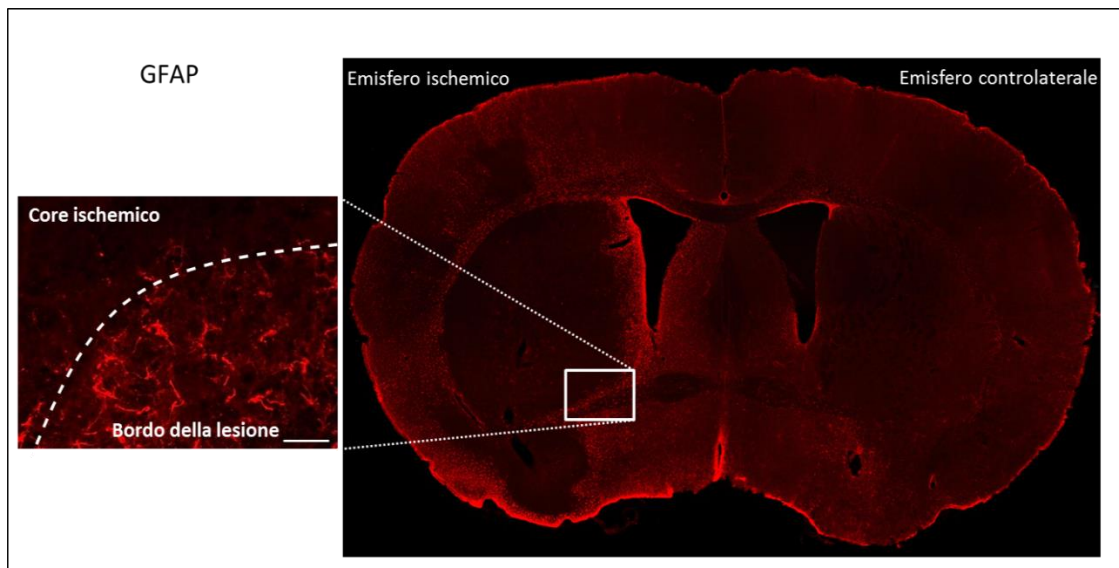
**Figura 4-8: Espressione di Iba1 48h dopo tMCAo nel topo.** Nel core ischemico, le cellule Iba1 positive sono prevalentemente globulari mentre al margine della lesione presentano una forma più irregolare e ramificazioni. Scala = 150  $\mu$ m.

Lo stato di attivazione delle cellule microgliali perdura nel tempo, mantenendo la morfologia ameboide e l'attività fagocitica sia a 3 che a 7 giorni dall'induzione dell'insulto ischemico (Fig. 4-9). Tuttavia, a 7 giorni di riperfusione, parte delle cellule microgliali inizia ad assumere una morfologia aberrante, tipica delle cellule che vanno incontro a morte.



**Figura 4-9:** Caratterizzazione dell'espressione di CD11b a tempi tardivi rispetto all'insulto ischemico. Dalle immagini è possibile osservare che l'attivazione delle cellule microgliali si mantiene sia a 3 che a 7 giorni di riperfusione in topi sottoposti a 30 min di MCAo. Scala = 150  $\mu$ m.

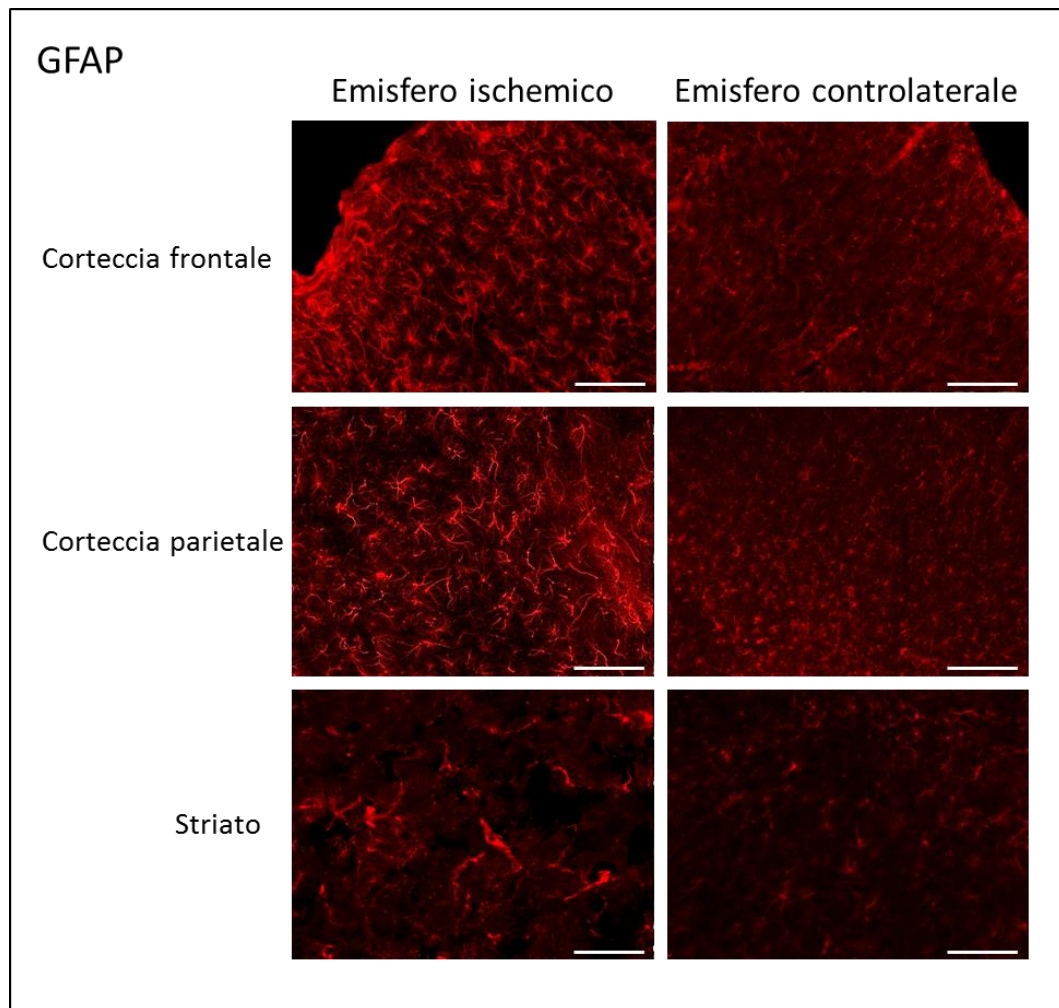
A differenza delle cellule microgliali, la cui attivazione post-ischemica è limitata al core e al margine della lesione, gli astrociti sono attivati nelle aree della penombra e peri-ischemiche (Fig. 4-10).



**Figura 4-10: Attivazione delle cellule astrocitarie nell'emisfero ischemico.** Immunofluorescenza di GFAP nel cervello di topo sottoposto a 30 minuti di MCAo seguiti da 48 ore di riperfusione. Nell'emisfero controlaterale. L'ingrandimento mostra come gli astrociti attivati sono presenti nelle aree peri-ischemiche mentre sono assenti nel core ischemico. Scala = 150  $\mu$ m.

L'analisi dello stato di attivazione di queste cellule, in seguito ad ischemia cerebrale transitoria, è stata effettuata mediante studi di immunofluorescenza, utilizzando il marker GFAP. A 48 ore di riperfusione il core ischemico è risultato già completamente privo di fluorescenza per il marker GFAP (Fig. 4-10). Gli astrociti dello striato laterale, infatti, assumono morfologie aberranti probabilmente legate ad un danno cellulare indotto dalla MCAo. Nella regione peri-ischemica, invece, è stata osservata un'intensa espressione di GFAP se paragonata con l'emisfero controlaterale (Fig. 4-11).

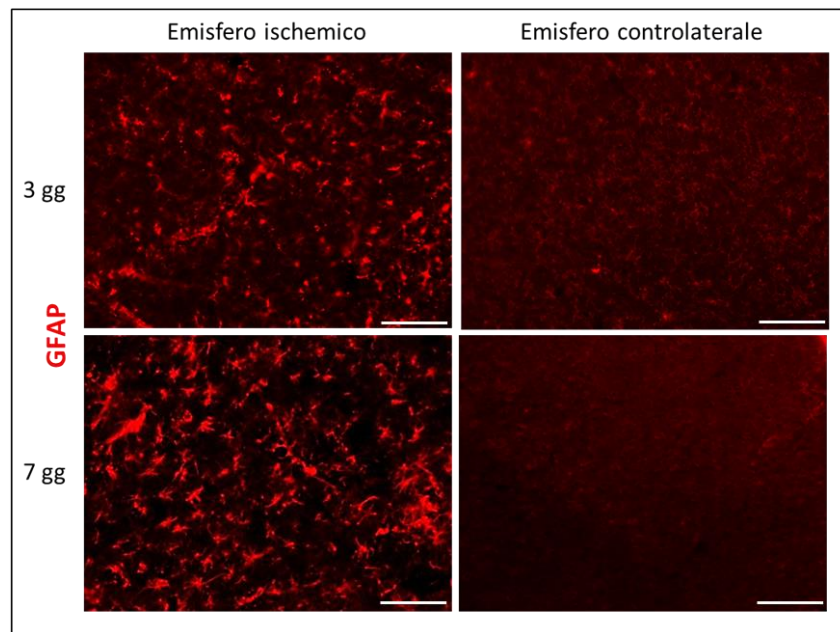




**Figura 4-11: Caratterizzazione morfologica e spaziale dell'espressione di GFAP in seguito ad insulto ischemico nel topo.** Le cellule astrogliali attivate sono presenti nelle aree peri-ischemiche mentre nel core ischemico sono evidenti cellule GFAP-positive con morfologia aberrante dopo 48 ore di ri-perfusione in topi sottoposti a 30 minuti di MCAo. Scala = 150  $\mu$ m.

Rispetto agli astrociti dell'emisfero controlaterale, quelli presenti nelle aree delimitanti la lesione ischemica (sia a 3 che a 7 giorni, Fig. 4-12), hanno mostrato un corpo cellulare più grande e una elevata espressione di GFAP. A 3 giorni di ri-perfusione, le immagini di immunofluorescenza hanno rivelato una più elevata concentrazione di cellule astrocitarie attorno al core della lesione. È risultata evidente una sostenuta proliferazione di cellule astrocitarie e la loro migrazione verso la zona di delimitazione del core ischemico. Tale bordo di astrociti è risultato più marcato e

ben definito ai 7 giorni di riperfusione, quando si è osservata la formazione della cosiddetta “cicatrice gliale” (Fig. 4-10). Questa struttura costituisce una barriera tra l’area danneggiata irreversibilmente e la zona peri-ischemica, prevenendo l’infiltrazione di cellule infiammatorie e stimolando la rivascolarizzazione.



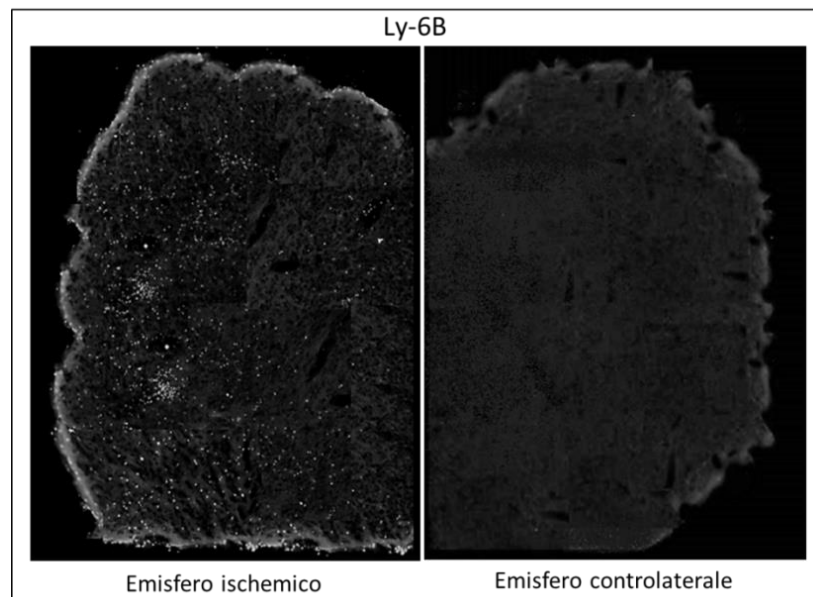
**Figura 4-12: Caratterizzazione dell’espressione di GFAP a tempi tardivi rispetto all’insulto ischemico.** L’astrogliosi è un fenomeno indotto dall’ischemia cerebrale e tale risposta si mantiene sia a 3 che a 7 giorni dall’insulto ischemico. Gli astrociti (in rosso) sono stati marcati con GFAP. Scala = 150  $\mu$ m.

### **4.3    Analisi spazio-temporale della risposta infiammatoria sistemica indotta dall'ischemia cerebrale**

Il cervello risponde all'insulto ischemico sia con un processo infiammatorio acuto, caratterizzato dalla rapida attivazione di cellule residenti (microglia e astrociti), sia mediante una risposta infiammatoria sistemica che porta all'infiltrazione di diversi tipi di cellule infiammatorie circolanti (macrofagi, neutrofili, cellule dendritiche e altre cellule) nel parenchima cerebrale.

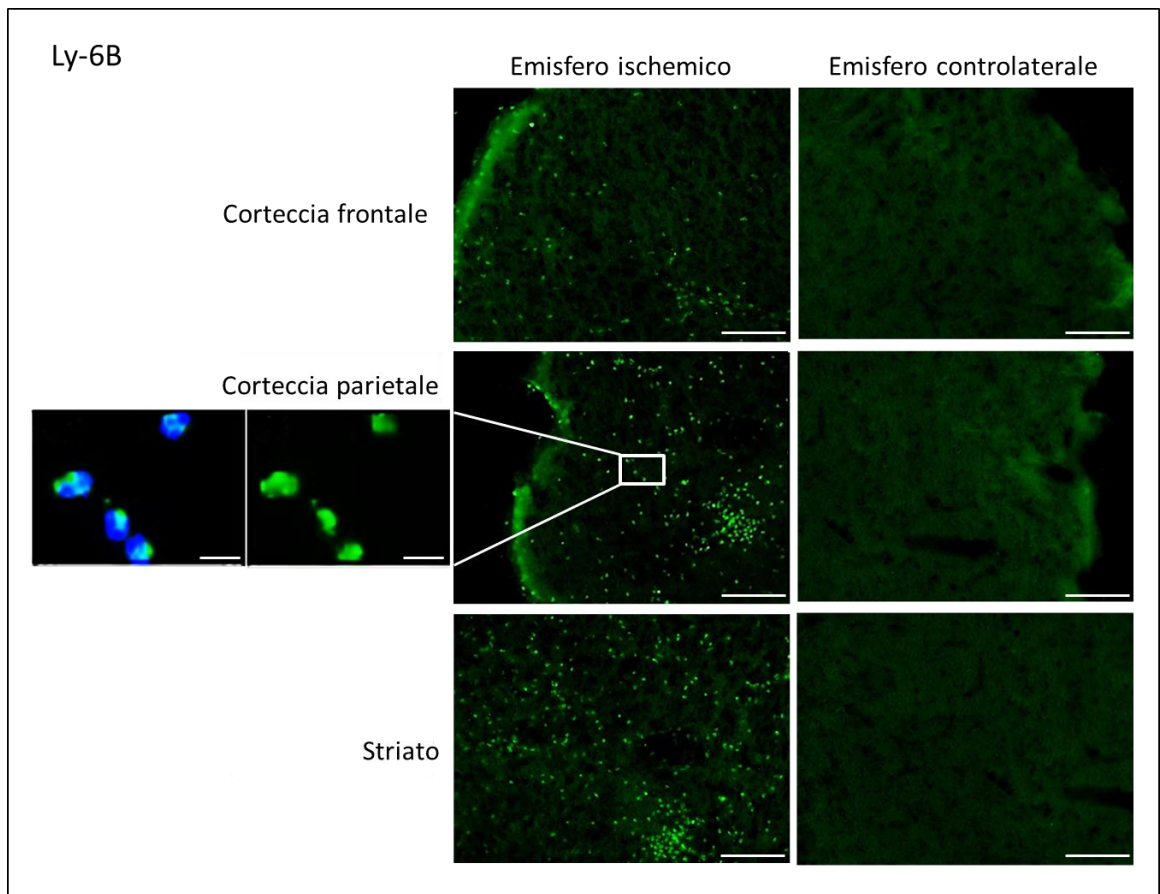
#### **4.3.1    Caratterizzazione della risposta dei neutrofili**

Dei vari tipi di leucociti, i neutrofili sono tra i primi a infiltrare il parenchima cerebrale in seguito ad ischemia. L'andamento temporale dell'infiltrazione dei neutrofili nel parenchima cerebrale in seguito ad MCAo è stato studiato, mediante immunofluorescenza, a diversi tempi di riperfusione (24 e 48 ore, 3 e 7 giorni) utilizzando un anticorpo anti-Ly-6B, antigene espresso dai neutrofili. Il picco di infiltrazione dei neutrofili è stato osservato alle 48 ore di riperfusione (Fig. 4-13 e 4-14).



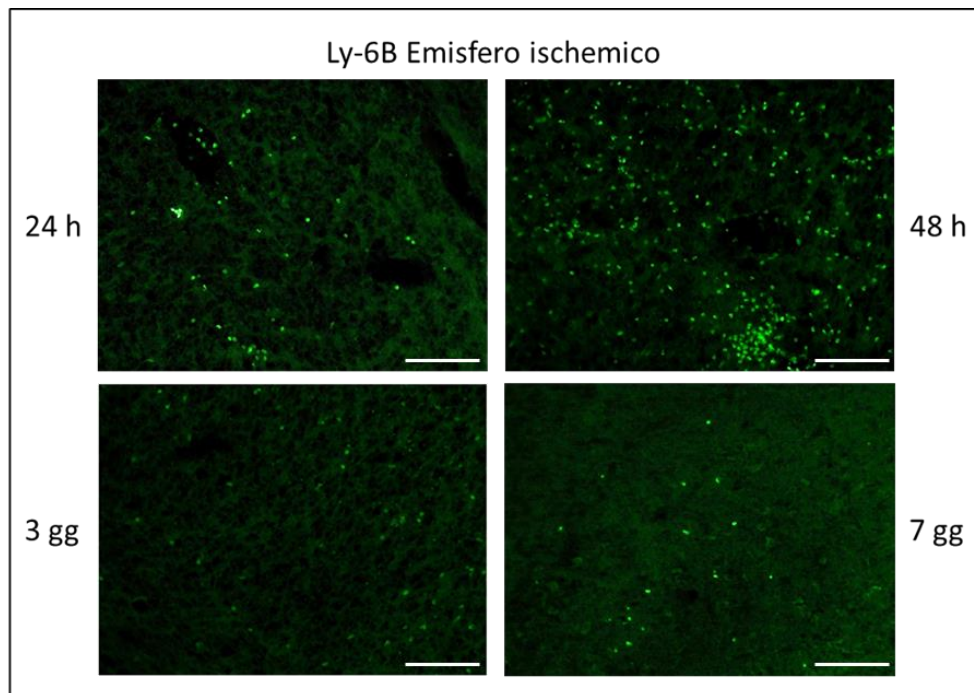
**Figura 4-13: Immagine rappresentativa dell'infiltrazione dei neutrofilii nell'emisfero ischemico.** Mediante immunofluorescenza con il marker Ly-6B è risultata evidente una massiccia infiltrazione di neutrofilii nell'emisfero ischemico di topi sottoposti a 30 minuti di MCAo seguiti da 48 h di riperfusione, mentre nell'emisfero controlaterale non sono stati identificati neutrofilii.

Dopo 24 ore dall'inizio dell'insulto ischemico, sono stati identificati numerosi neutrofilii, come cellule isolate o come aggregati a livello dei vasi sanguigni, attaccati alle pareti dei vasi e a vari stadi di diapedesi nella regione del core ischemico (Fig. 4-15). Dopo 48 ore di riperfusione, sono stati osservati numerosi aggregati cellulari e, a differenza di quanto osservato alle 24 ore, i neutrofilii sono risultati distribuiti in aree ischemiche non adiacenti ai vasi, inclusi lo striato dell'emisfero ischemico e le regioni della penombra e peri-ischemiche. Il picco dell'infiltrazione di queste cellule è risultato evidente agli stessi tempi in cui è stato osservato il picco di rottura della barriera emato-encefalica (Fig. 4-6).



**Figura 4-14: Analisi della distribuzione dei neutrofili nell'emisfero ischemico in topi sottoposti a 30 minuti di MCAo seguiti da 48 ore di ri-perfusione.** La caratterizzazione è stata effettuata mediante immunofluorescenza con il marker Ly-6B (in verde; in blu sono rappresentati i nuclei marcati con il DAPI). Scala = 150 µm e 20 µm per ingrandimenti.

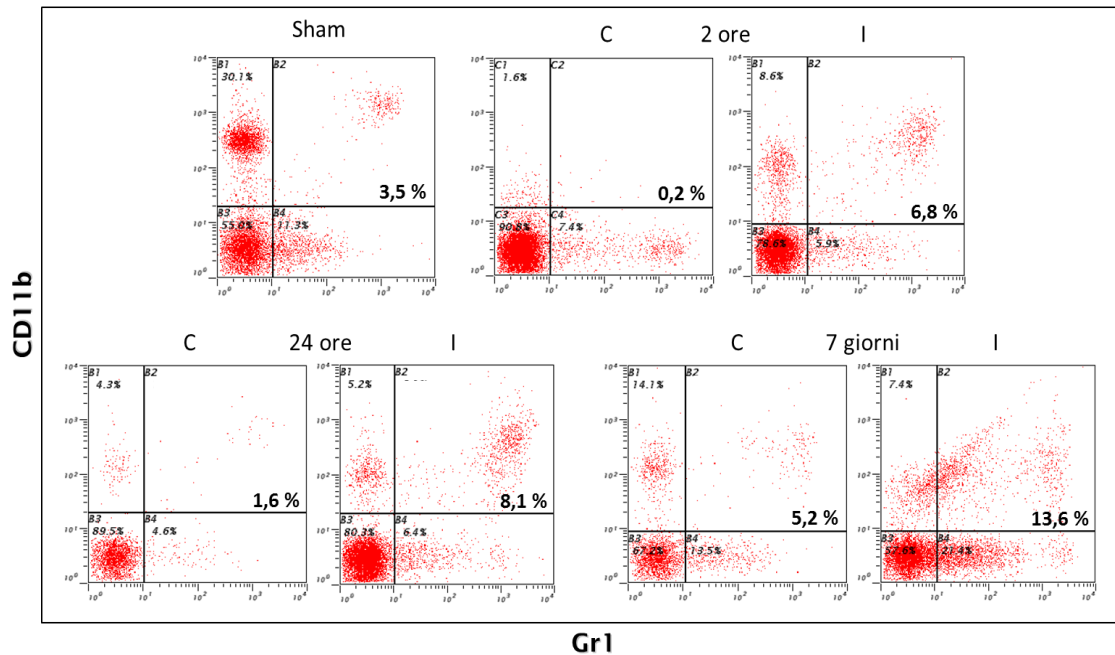
A 3 e a 7 giorni dall'insulto ischemico il numero di neutrofili nell'emisfero ischemico si è mantenuto elevato, sebbene si sia osservata una diversa distribuzione di queste cellule. In effetti, il numero di neutrofili è apparso inferiore nello striato ischemico e nelle altre aree del core mentre nelle aree peri-ischemiche e, in misura minore, in tutte le altre regioni dell'emisfero ischemico si è osservata una considerevole presenza di queste cellule (Fig. 4-15).



**Figura 4-15: Caratterizzazione spazio-temporale dell'infiltrazione dei neutrofilo nell'emisfero.** La caratterizzazione è stata effettuata mediante immunofluorescenza con il marker Ly-6B dopo 24h, 48h, 3 e 7 giorni di riperfusione in topi sottoposti a 30 minuti di MCAo. Scala = 150  $\mu$ m.

Per quantificare la risposta dei neutrofilo all'ischemia focale transitoria sono state effettuate analisi di citofluorimetria, caratterizzando sia l'infiltrazione di queste cellule nel tessuto cerebrale sia la loro evoluzione temporale a livello periferico (nel sangue e nella milza), a differenti tempi di riperfusione (2 e 24 ore, 7 giorni) dopo 30 minuti di occlusione dell'arteria cerebrale media nei topi. Tra i gruppi di animali sham non è apparsa alcuna differenza significativa nella percentuale delle cellule  $Gr1^+/CD11b^+$  (dato non mostrato). L'andamento temporale dell'infiltrazione dei neutrofilo nel cervello ischemico è stato valutato a partire da tempi molto precoci (2 ore di riperfusione) ed è stato osservato un incremento di queste cellule nell'emisfero ischemico se paragonato all'emisfero controlaterale o agli animali sham. L'infiltrazione dei neutrofilo, cellule che normalmente non sono residenti nel SNC, è stata seguita utilizzando i marker CD11b e Gr1. La figura 4-16 mostra i plot

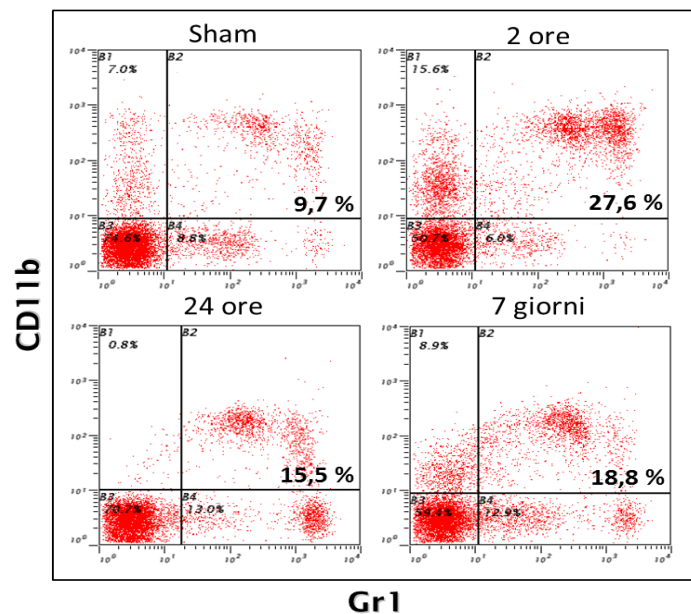
rappresentativi dell'analisi citofluorimetrica delle popolazioni di neutrofilo dopo 30 minuti di MCAo e ai tempi di ri-perfusione indicati.



**Figura 4-16: Plots rappresentativi dell'analisi citofluorimetrica dell'infiltrazione dei neutrofilo nel parenchima cerebrale.** I neutrofilo appaiono nel quadrante in alto a destra (CD11b<sup>+</sup>, Gr1<sup>+</sup>). I plots rappresentano pool di due animali ad ogni tempo di ri-perfusione (2 e 24 h, 7 gg e dopo chirurgia sham).

I neutrofilo sono rappresentati nel quadrante in alto a destra e indicati dal doppio staining positivo per CD11b e Gr1. Dall'analisi degli animali sham è emerso che pochi neutrofilo sono normalmente presenti nel SNC (circa il 3%), tenendo anche in considerazione il fatto che gli animali non sono stati perfusi, per cui una piccola percentuale deriva anche dai neutrofilo presenti nei vasi cerebrali. In seguito all'induzione dell'MCAo, comunque, è stato osservato un massiccio aumento del numero di neutrofilo ai diversi tempi di ri-perfusione e tale infiltrazione si è mantenuta alta fino a 7 giorni dopo l'insulto ischemico. Dall'analisi citofluorimetrica condotta su campioni di sangue è emerso un incremento significativo del numero di neutrofilo in

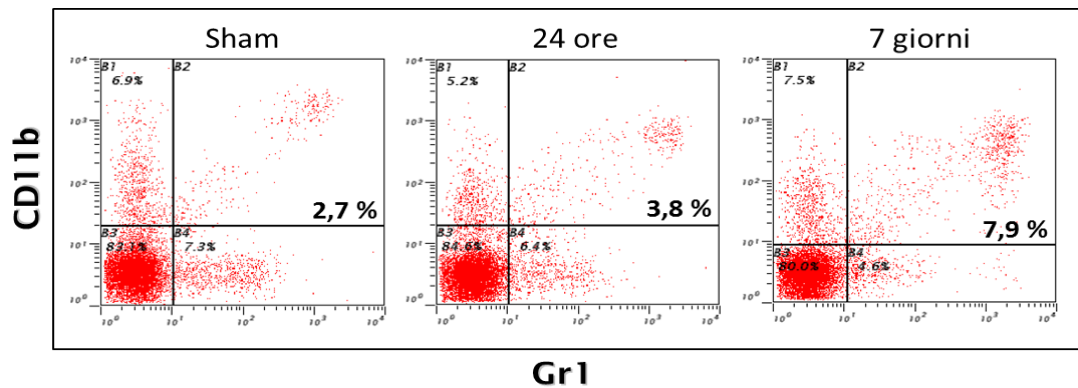
animali sottoposti a 30 minuti di MCAo seguite da 2 ore di riperfusione se paragonato al numero di cellule presenti nel sangue di animali sham (Fig. 4-17). A tempi più tardivi (24 ore e 7 giorni), pur mantenendosi elevato il numero di neutrofili in circolo rispetto agli animali sham, si è osservata una tendenza alla riduzione del numero di queste cellule nel sangue e tale riduzione è, probabilmente, associata all'infiltrazione di queste cellule nel tessuto cerebrale, il cui picco è risultato evidente dopo 48 ore di riperfusione (Fig. 4-15).



**Figura 4-17:** Plots di citofluorimetria rappresentativi dell'evoluzione temporale del numero di neutrofili nel sangue in seguito a 30 minuti di MCAo nei topi. I neutrofili appaiono nel quadrante in alto a destra (CD11b<sup>+</sup>, Gr1<sup>+</sup>). I plots rappresentano pool di due animali ad ogni tempo di riperfusione (2 e 24 h, 7 gg e dopo chirurgia sham).

Analogamente, dalle analisi citofluorimetriche effettuate sulla milza è emerso un incremento del numero dei neutrofili sia a 24 ore che a 7 giorni rispetto al numero osservato negli animali sham (Fig. 4-18).

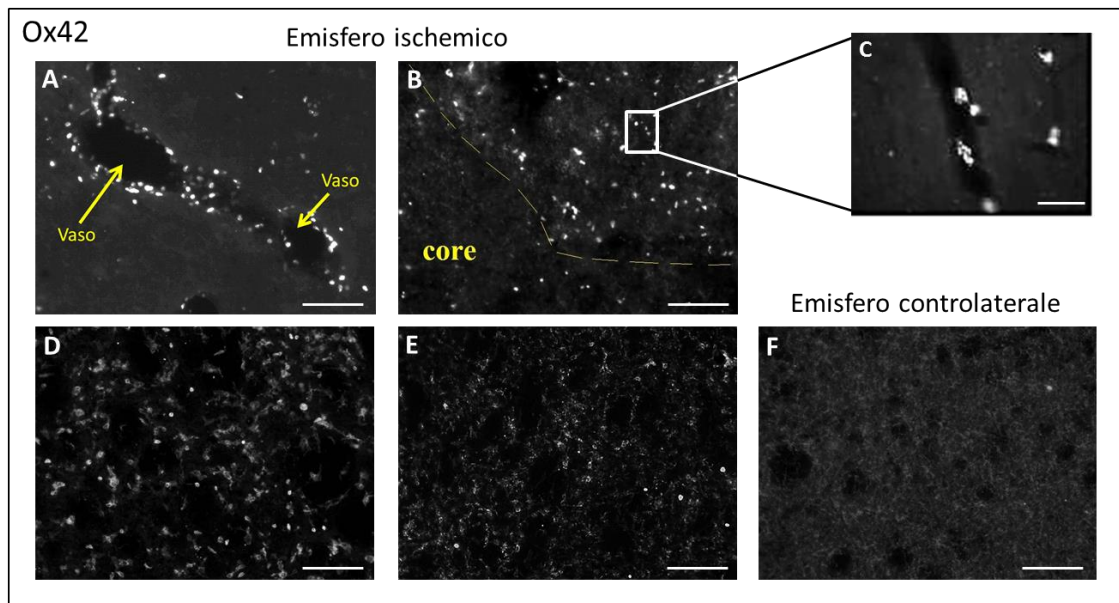




**Figura 4-18: Plots di citofluorimetria rappresentativi dell'incremento temporale del numero di neutrofili nella milza in seguito a 30 minuti di MCAo nei topi.** I neutrofili appaiono nel quadrante in alto a destra (CD11b<sup>+</sup>, Gr1<sup>+</sup>). I plots rappresentano pool di due animali ad ogni tempo di ripercussione (24 h, 7 gg e dopo chirurgia sham).

#### 4.3.2 Caratterizzazione della risposta dei macrofagi

I macrofagi, assieme ai neutrofili, sono risultati essere i tipi cellulari maggiormente presenti nell'emisfero ischemico in seguito all'insulto. L'infiltrazione dei macrofagi nel cervello dei topi sottoposti a ischemia cerebrale transitoria è risultata evidente già dopo 24 di ripercussione per raggiungere poi il picco a 48 ore dall'inizio dell'ischemia (Fig. 4-19).

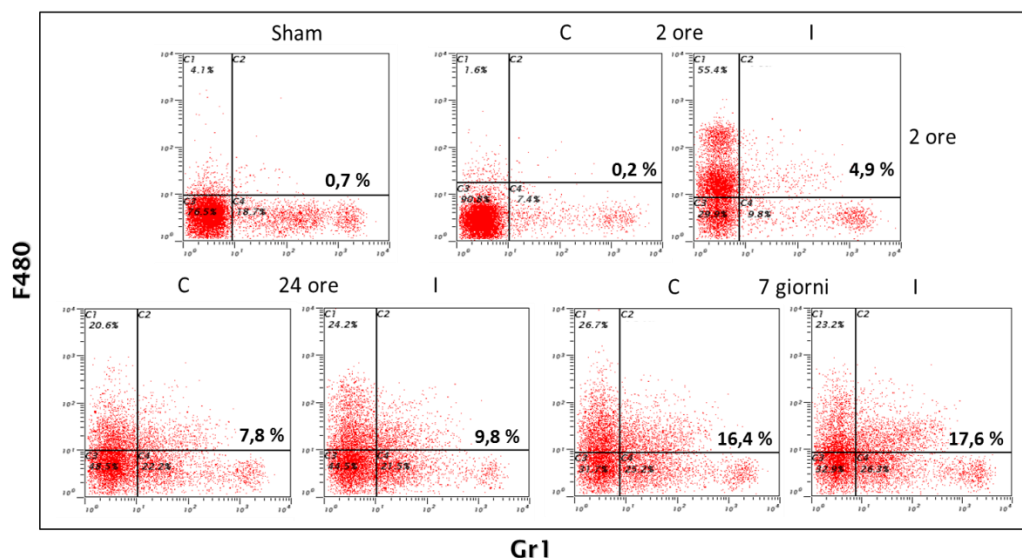


**Figura 4-19: Infiltrazione cerebrale dei macrofagi dopo 48 ore di riperfusione.** Le immagini di immunofluorescenza mostrano l'espressione di cellule Ox42-positive nell'area limitrofa al core ischemico (A,B). Queste cellule fuoriescono dai vasi sanguigni e vanno a infiltrare il parenchima cerebrale (C). Il numero dei macrofagi nell'emisfero ischemico si riduce dopo 3 (D) e 7 giorni (E) dall'inizio della riperfusione. Nessun macrofago è stato osservato nell'emisfero controlaterale non ischemico (F). Scala = 150  $\mu\text{m}$  e 20  $\mu\text{m}$  per ingrandimento.

Nel core ischemico il numero di macrofagi presenti è risultato considerevolmente inferiore rispetto a quello evidenziato ai margini del tessuto lesso e nelle regioni peri-ischemiche. L'emisfero controlaterale è risultato completamente privo di macrofagi infiltranti. Esiste un problema intrinseco con l'identificazione cellulare dei macrofagi in seguito ad ischemia cerebrale. La microglia, i "macrofagi" residenti del cervello, è attivata dall'insulto ischemico e diventa indistinguibile dai macrofagi infiltranti per quanto riguarda l'espressione di marker immunocitochimici. Tuttavia, dalla nostra analisi, è risultato evidente come un numero considerevolmente elevato di cellule CD11b<sup>+</sup> fuoriesca dai vasi sanguigni, suggerendo inequivocabilmente che si tratta di macrofagi provenienti dal versante sistemico (Fig. 4-19A). Dopo 3 e 7 giorni di

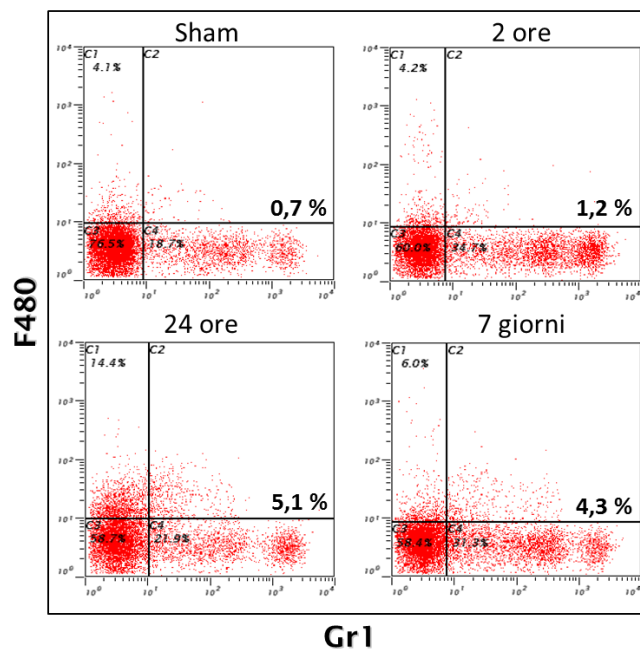
riperfusioni i macrofagi presenti nel tessuto lesa sono risultati considerevolmente di numero inferiore rispetto alle 48h (Fig. 4-19D,E).

La risposta dei macrofagi all'insulto ischemico è stata caratterizzata, anche, mediante analisi di citofluorimetria. In particolare, è stata analizzata l'entità dell'infiltrazione dei macrofagi deleteri M1 nel parenchima cerebrale a differenti tempi di riperfusioni (2 e 24 ore, 7 giorni) dopo 30 minuti di occlusione dell'arteria cerebrale media nei topi. Negli animali sham non è apparsa alcuna differenza significativa nella percentuale delle cellule (dato non mostrato). La figura 4-20 mostra i plot rappresentativi dell'analisi citofluorimetria delle popolazioni di macrofagi M1 dopo 30 minuti di MCAo e ai tempi di riperfusioni indicati. I macrofagi sono rappresentati nel quadrante in alto a destra e indicati dal doppio staining positivo per F4/80 e Gr1. Dall'analisi degli animali sham è emersa una percentuale molto bassa di macrofagi, dovuta probabilmente alla presenza di queste cellule nei vasi sanguigni, dal momento che gli animali non sono stati perfusi prima del prelievo dei campioni.



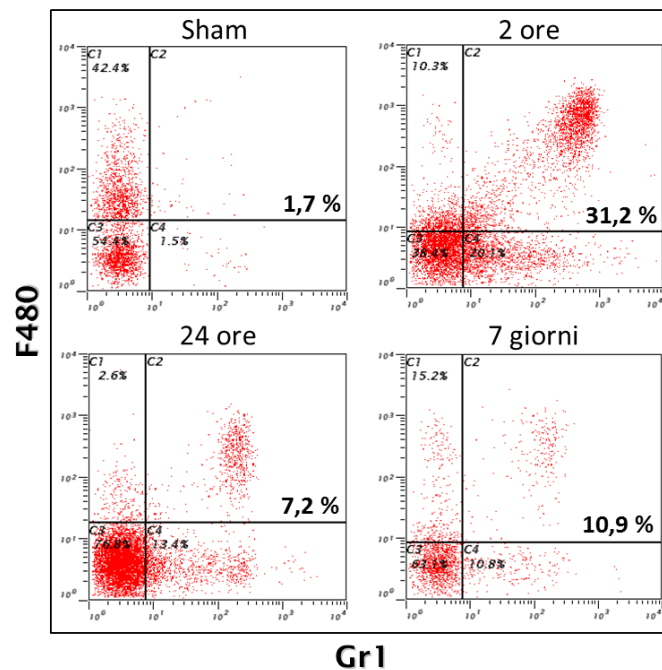
**Figura 4-20: Plots di citofluorimetria rappresentativi dell'incremento temporale del numero di macrofagi nel cervello in seguito a 30 minuti di MCAo nei topi.** I macrofagi (fenotipo M1) sono stati selezionati in base all'espressione di F4/80 e di Gr1 e appaiono nel quadrante in alto a destra. I plots rappresentano pool di due animali ad ogni tempo di riperfusioni (2 e 24 h, 7 gg e dopo chirurgia sham).

In seguito all'induzione dell'MCAo è stato osservato un significativo incremento del numero di macrofagi nell'emisfero ischemico dopo 2 ore di riperfusione, se paragonato all'emisfero controlaterale o agli animali sham. A tempi più tardivi (24 ore e 7 giorni) il numero di macrofagi è continuato ad aumentare nell'emisfero ischemico sebbene sia stato osservato che anche l'emisfero controlaterale è interessato da una notevole presenza di queste cellule. L'analisi citofluorimetrica per i macrofagi M1 è stata effettuata anche su campioni sangue (Fig. 4-21). Come è possibile osservare dai plot negli animali sham il numero di queste cellule nel sangue è risultato essere molto basso (circa l'1%). Negli animali ischemici il numero di macrofagi nel sangue aumenta lievemente dopo 2 ore di riperfusione e in maniera più significativa alle 24 ore, per poi ridursi a partire dai 7 giorni di riperfusione.



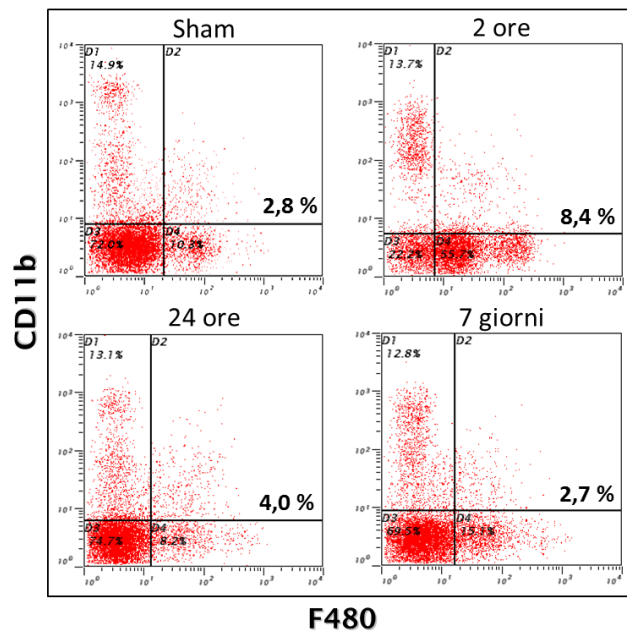
**Figura 4-21: Plots di citofluorimetria rappresentativi dell'evoluzione temporale del numero di macrofagi M1 nel sangue in seguito a 30 minuti di MCAo nei topi.** I macrofagi appaiono nel quadrante in alto a destra (F4/80<sup>+</sup>, Gr1<sup>+</sup>). I plots rappresentano pool di due animali ad ogni tempo di riperfusione (2 e 24 h, 7 gg e dopo chirurgia sham).

È stata anche caratterizzata la risposta dei macrofagi peritoneali all'insulto ischemico cerebrale (Fig. 4-22) ed è stato osservato un massiccio incremento di queste cellule (circa il 31%) nel peritoneo di animali sottoposti a 30 minuti di MCAo seguiti da 2 ore di riperfusion se paragonato al numero di cellule negli animali sham (circa il 2%). A tempi più tardivi (24 ore e 7 giorni) e in seguito alla mobilitazione di queste cellule verso il sito del danno è stato osservato un decremento dei macrofagi M1 nel peritoneo.



**Figura 4-22:** Plots di citofluorimetria rappresentativi dell'evoluzione temporale del numero di macrofagi M1 peritoneali in seguito a 30 minuti di MCAo nei topi. I macrofagi appaiono nel quadrante in alto a destra (F4/80<sup>+</sup>, Gr1<sup>+</sup>). I plots rappresentano pool di due animali ad ogni tempo di riperfusion (2 e 24 h, 7 gg e dopo chirurgia sham).

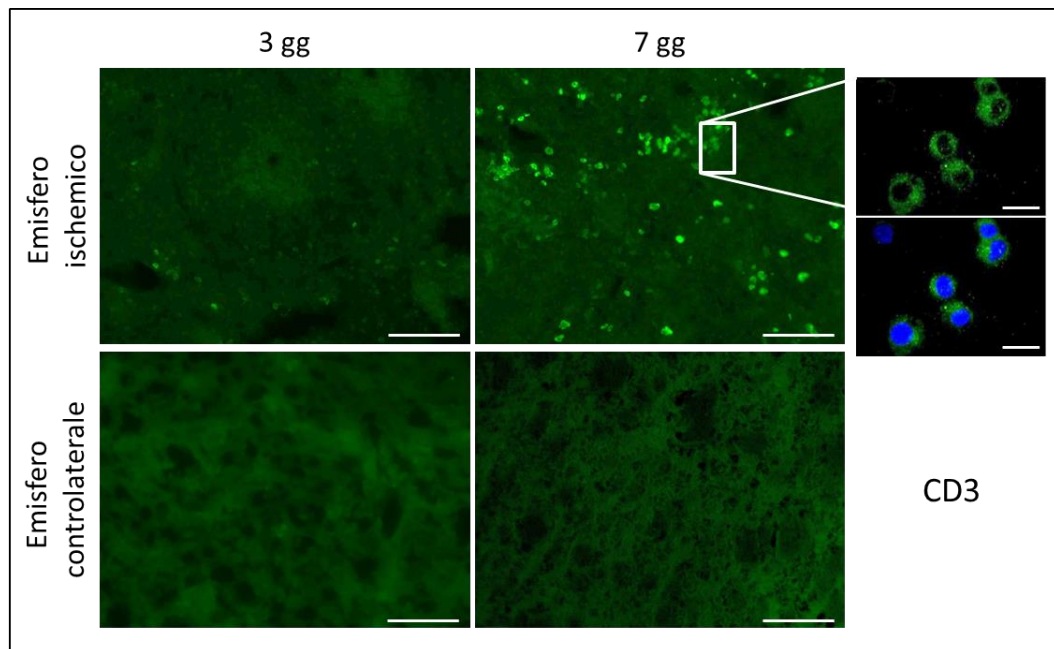
Nella milza, le modificazioni temporali del numero di macrofagi M1 sono risultate simili a quelle osservate nel peritoneo (Fig. 4-23).



**Figura 4-23: Plots di citofluorimetria rappresentativi dell'andamento temporale del numero di macrofagi M1 nella milza in seguito a 30 minuti di MCAo nei topi.** I macrofagi appaiono nel quadrante in alto a destra (F4/80<sup>+</sup>, Gr1<sup>+</sup>). I plots rappresentano pool di due animali ad ogni tempo di riperfusione (2 e 24 h, 7 gg e dopo chirurgia sham).

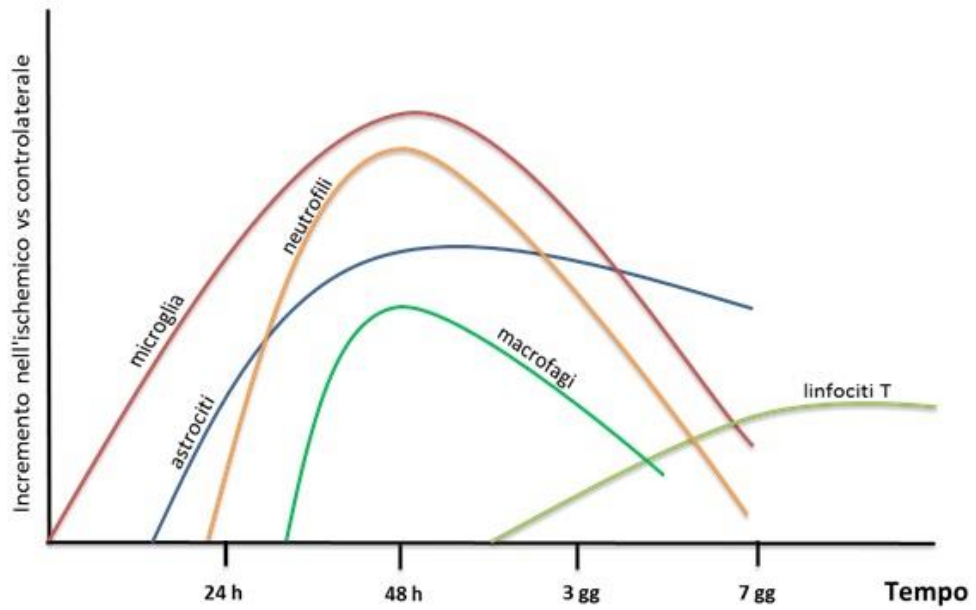
#### 4.3.3 Caratterizzazione della risposta dei linfociti T

In aggiunta ai neutrofili e ai macrofagi, un numero significativo di linfociti T è stato identificato, mediante immunofluorescenza, nella regione di infarto cerebrale (Fig. 4-24). A 3 giorni dall'inizio dell'ischemia cerebrale è stato osservato un numero significativo di linfociti T CD3<sup>+</sup> nell'emisfero ischemico, in prossimità della lesione. Queste cellule sono risultate ancora più abbondanti dopo 7 giorni di riperfusione. La loro localizzazione è risultata essere prevalentemente ai bordi del core ischemico, spesso vicino a vasi sanguigni.



**Figura 4-24: Caratterizzazione dell'infiltrazione dei linfociti T nel cervello ischemico.** Mediante immunofluorescenza con l'anticorpo anti-CD3, i linfociti T sono stati identificati nell'area limitrofa al core ischemico dopo 3 e 7 giorni di riperfusione. Nessun linfocita T è stato osservato nell'emisfero controlaterale non ischemico. Scala = 150  $\mu$ m e 20  $\mu$ m per ingrandimenti.

Nel loro insieme questi hanno documentato come ogni specifica risposta cellulare si attivi con un'intensità e una distribuzione (core vs penombra) strettamente dipendente dalla durata dell'insulto (Fig. 4-25). L'attivazione precoce (dopo poche ore dall'insulto) della microglia e degli astrociti cerebrali è rapidamente seguita dall'infiltrazione massiccia di neutrofili, il cui picco è rilevabile a 48h di riperfusione. I macrofagi infiltrano l'emisfero ischemico più tardi e in minor numero rispetto ai neutrofili, ma il loro picco è similmente riscontrabile dopo 48h di riperfusione. Altri tipi cellulari provenienti dal versante sistemico, quali i linfociti T, sono rilevabili nel cervello ischemico solo alcuni giorni dopo l'insulto.

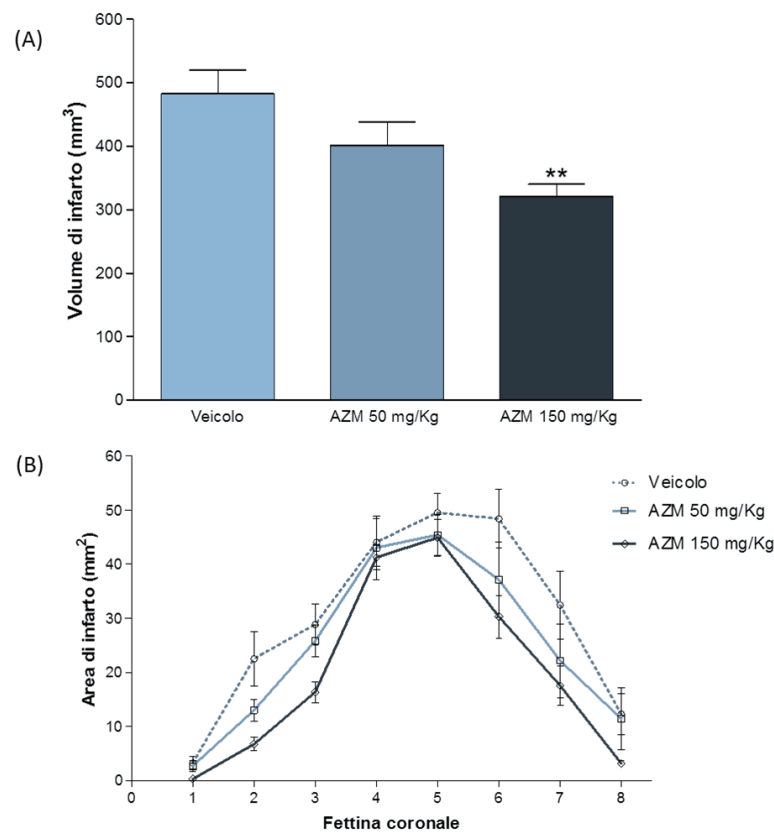


**Figura 4-25:** Rappresentazione schematica dell'attivazione/reclutamento delle cellule coinvolte nell'infiammazione post-ischemica.



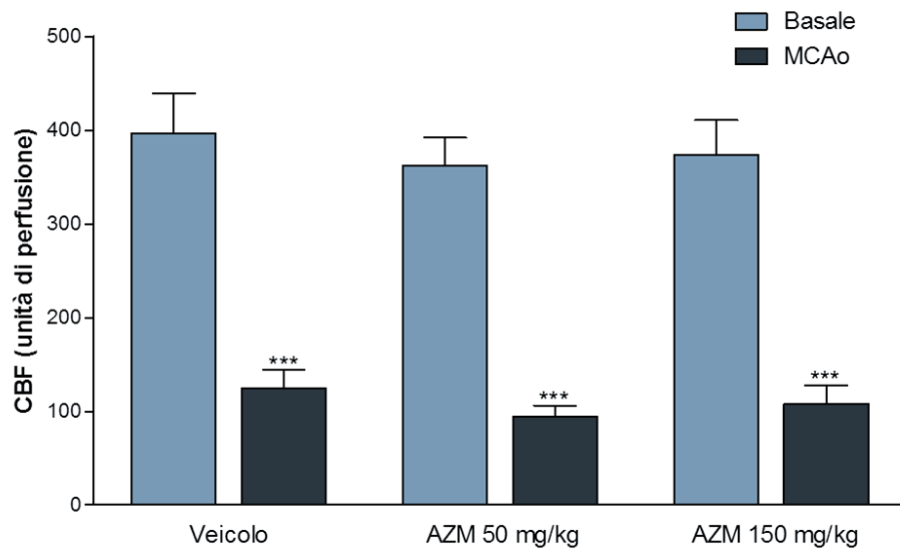
#### 4.4 Effetti del pre-trattamento orale con azitromicina sul danno cerebrale indotto da MCAo nei ratti.

La somministrazione orale acuta di azitromicina ad una dose di 150 mg/Kg, 15 minuti prima dell'induzione dell'MCAo transitoria determina una significativa riduzione del volume di infarto cerebrale (Fig. 4-26A) e dell'area (Fig. 4-26B) se paragonati con il veicolo. La somministrazione di dosi più basse di azitromicina (50 mg/kg, 15 min prima dell'MCAo) produce volumi di infarto paragonabili a quelli osservati negli animali trattati con il solo veicolo.



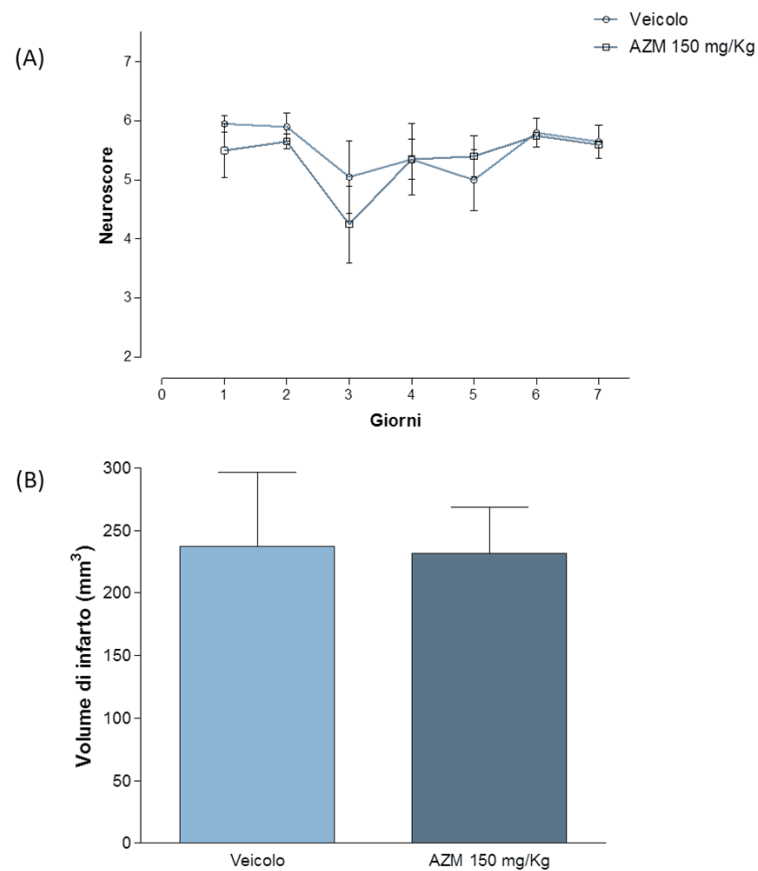
**Figura 4-26: Effetto dell'azitromicina, somministrata per os 15 minuti prima della MCAo transitoria nei ratti.** Il volume di infarto cerebrale (A) e l'area (B) sono stati misurati dopo 2h MCAo seguita da 22h di riperfusione in ratti pretrattati con AZM (50 o 150 mg/kg) o veicolo (n=6 ratti per gruppo sperimentale). \*\*P<0,01 vs veicolo (ANOVA seguita dal post-hoc test di Dunnett).

La neuroprotezione non è dovuta a modificazioni del flusso sanguigno da parte del farmaco (Fig. 4-27). Infatti, la riduzione del flusso ematico cerebrale risulta paragonabile tra gli animali trattati col solo veicolo (69%) e quelli trattati con azitromicina 150 mg/kg (70%) o azitromicina 50 mg/kg (73%).



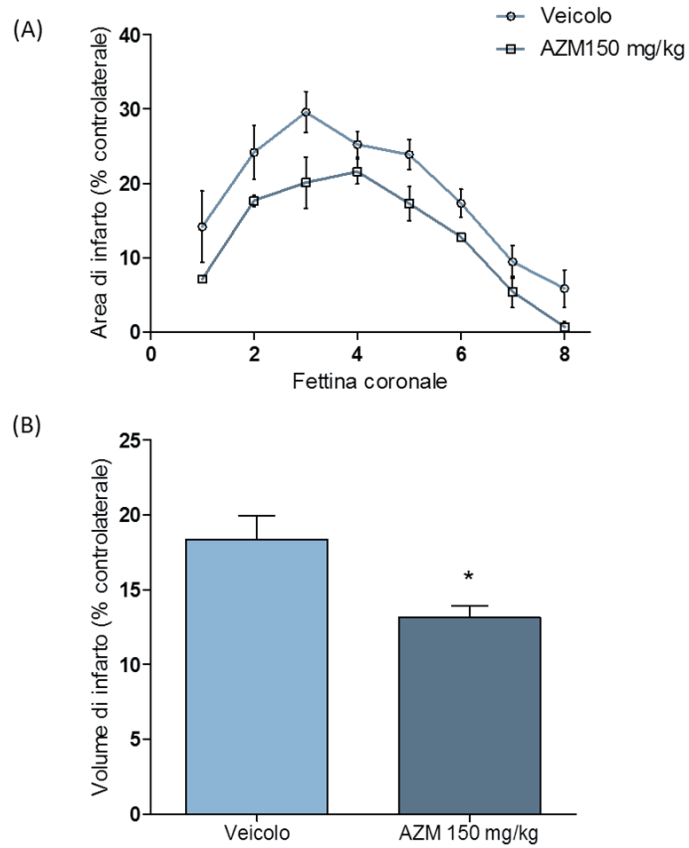
**Figura 4-27: Monitoraggio del flusso ematico cerebrale nei ratti.** Il trattamento con azitromicina non influenza la riduzione del flusso ematico cerebrale (CBF) indotta dall'MCAo. \*\*\* $P < 0,001$  vs basale corrispondente (ANOVA seguita dal Bonferroni post-test).

Sebbene negli animali trattati con azitromicina si osservi una tendenziale riduzione del deficit neurologico durante i primi 3 giorni dopo l'insulto ischemico, questo effetto benefico non si mantiene nei giorni successivi (Fig. 4-28A), come confermato anche dalla perdita di effetto sul volume di infarto a 7 giorni dall'induzione di MCAo (Fig. 4-28B).



**Figura 4-28: Effetti a lungo termine della somministrazione orale di azitromicina.** Neuroscore (A) e volume di infarto cerebrale (B) dei ratti sottoposti a 2 ore di MCAo seguite da 7 giorni di riperfusione e trattati con azitromicina (150 mg/kg) o veicolo, per os, 15 minuti prima dell'induzione dell'ischemia.

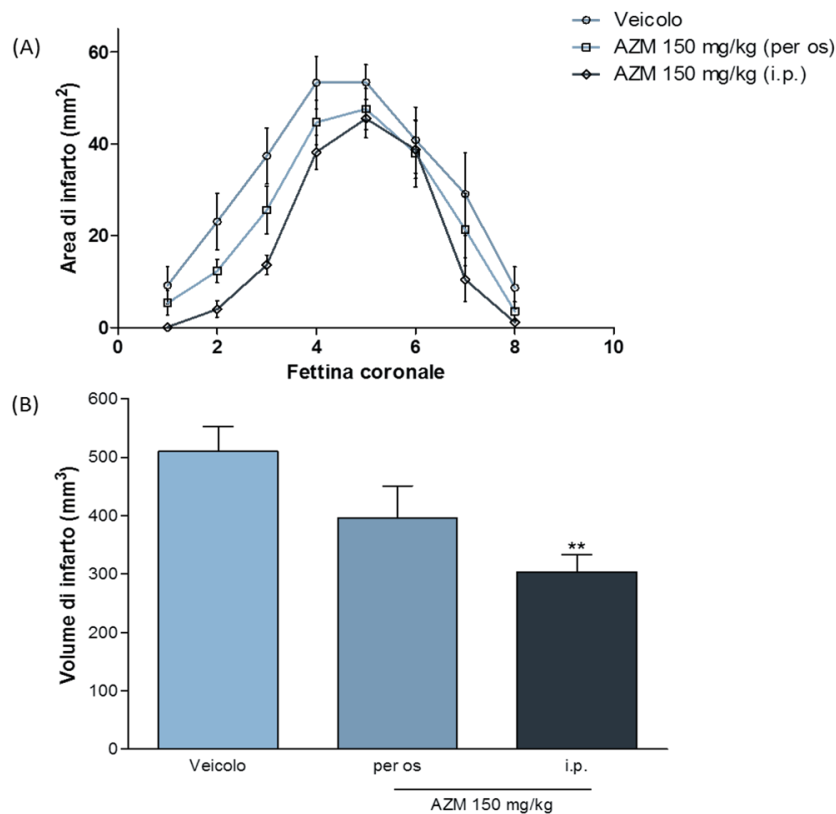
L'effetto protettivo del pretrattamento con azitromicina è stato valutato anche in un modello di ischemia cerebrale permanente. La somministrazione orale di 150 mg/kg di AZM, 30 minuti prima della MCAo permanente produce una significativa riduzione del danno cerebrale ischemico (Fig. 4-29) valutato 24 ore dopo l'insulto mediante colorazione delle fettine cerebrali con TTC.



**Figura 4-29: Effetto dell'azitromicina somministrata per os 30 minuti prima della MCAo permanente nei ratti.** L'area di infarto cerebrale (A) e il volume (B) sono stati misurati 24 ore dopo l'occlusione dell'arteria cerebrale media nei ratti pretrattati con AZM (150 mg/kg, n=3) o veicolo (n=5). \*P<0,05 vs veicolo (t test di Student).

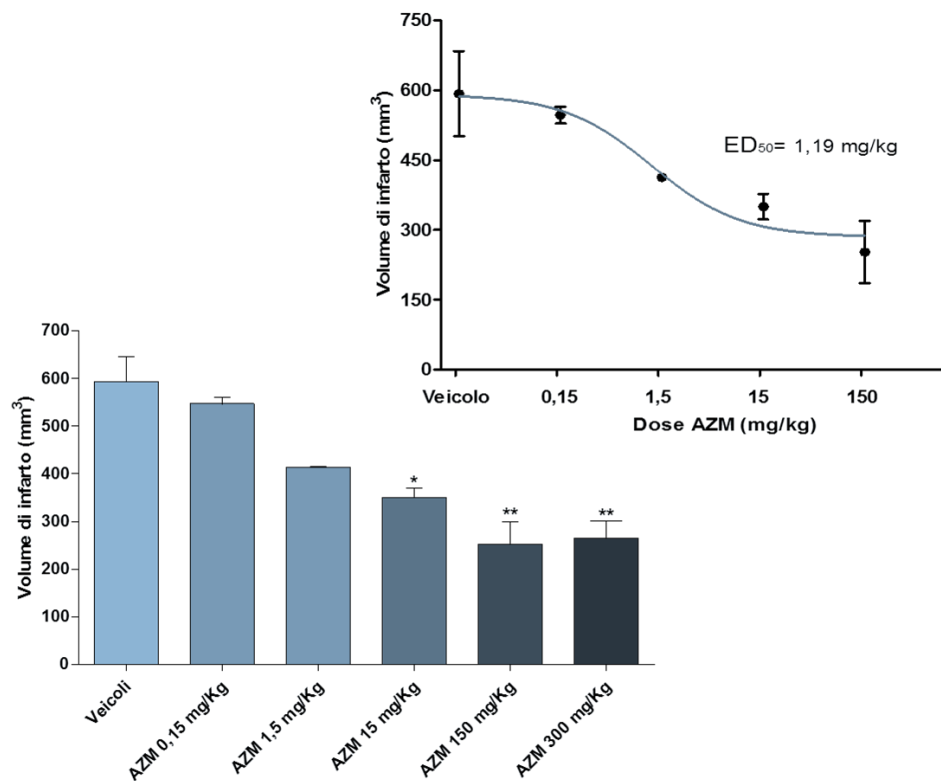
#### 4.5 Effetti del post-trattamento con azitromicina sul danno cerebrale indotto da MCAo nei ratti.

Mediante l'utilizzo di un modello di ischemia cerebrale transitoria, è stato valutato l'effetto dell'azitromicina, somministrata al momento della riperfusione, sul danno cerebrale ischemico. Come mostrato in Figura 4-30, la somministrazione orale di azitromicina (150 mg/kg), 5 minuti prima l'inizio della riperfusione produce solo una minima, ma non significativa riduzione del volume di infarto in ratti sottoposti a 2 ore di MCAo seguite da 22 ore di riperfusione.



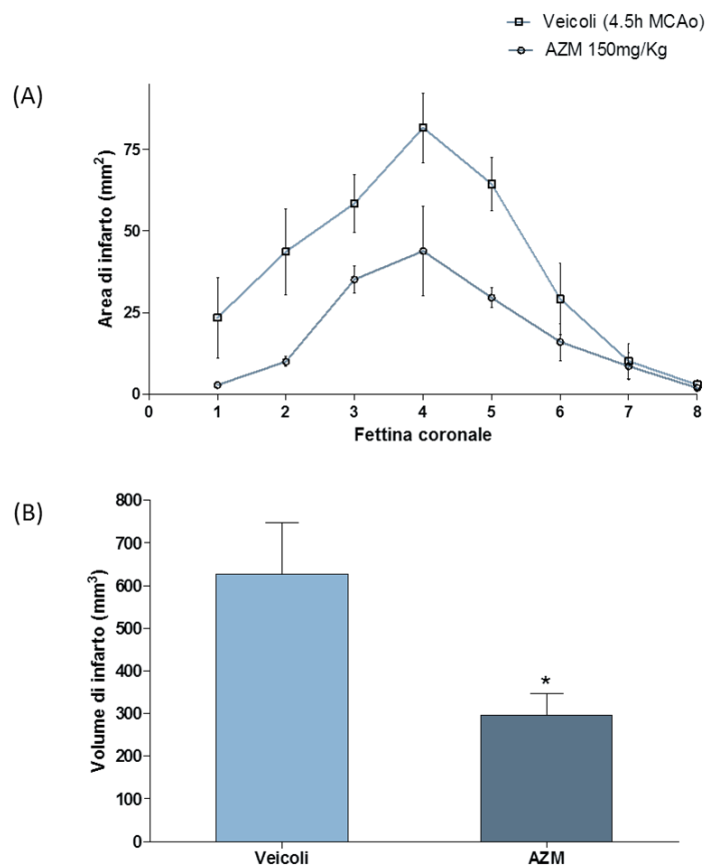
**Figura 4-30: Effetto dell'azitromicina somministrata per os o i.p. al momento della riperfusione.** Il volume di infarto cerebrale è stato misurato dopo 22 ore di riperfusione in ratti sottoposti a MCAo transitoria (2h) pretrattati con AZM (150 mg/kg) o veicolo (n=6 ratti per gruppo sperimentale). \*\*P<0,01 vs veicolo (ANOVA seguita dal post-hoc test di Dunnett).

Al contrario, la somministrazione sistemica (i.p.) del farmaco (0,15-300 mg/kg), immediatamente al momento della riperfusione (2 ore dopo MCAo) produce una riduzione dose-dipendente ( $ED_{50} = 1,19$  mg/kg;  $IC_{95\%} = 0,24 - 5,87$ ) del danno ischemico cerebrale (Fig. 4-31) misurato 22 ore dopo la riperfusione.



**Figura 4-31: Effetto neuroprotettivo dell'azitromicina somministrata i.p. al momento della riperfusione in ratti sottoposti ad MCAo transitoria (2h).** Riduzione del volume di infarto (A) e curva dose-risposta dell'azitromicina (0,15-300 mg/kg, i.p.) in ratti sottoposti a 2 ore di MCAo seguite da 22h di riperfusione (n=5 ratti per gruppo sperimentale). \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$  vs veicolo (ANOVA seguita dal test di Dunnett).

Le conclusioni di due importanti studi (ECASS III e SITS-ISTR) pubblicati di recente su *New England Journal of Medicine* e su *Lancet* hanno mostrato come sia possibile ampliare a 4,5 ore la finestra terapeutica del trattamento trombolitico endovenoso con t-PA (alteplase). Sulla base di questo nuovo scenario terapeutico è stato valutato l'ampliamento della finestra terapeutica dell'azitromicina nell'ottica di un suo utilizzo clinico in concomitanza con la trombolisi.



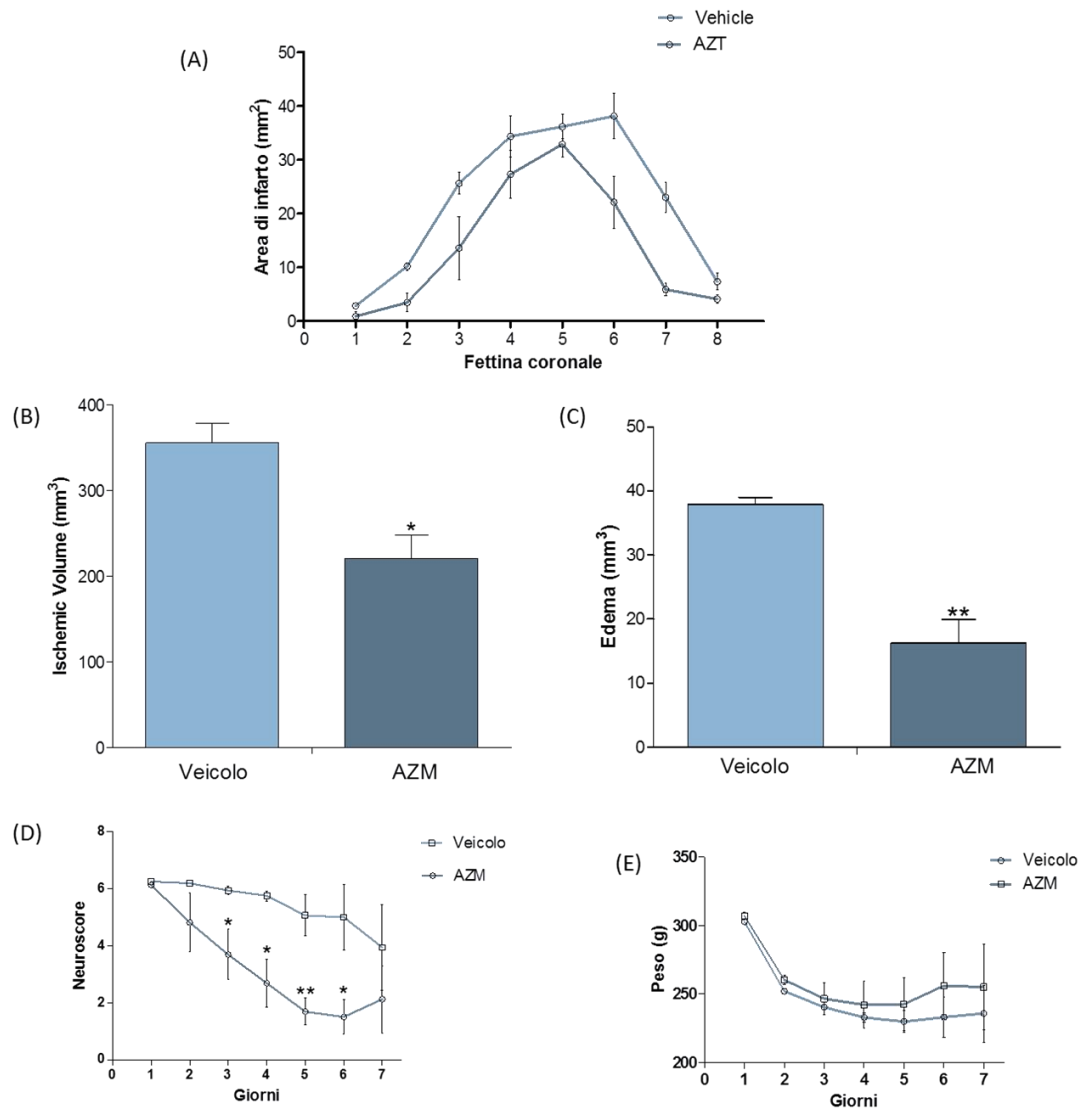
**Figura 4-32: Effetto neuroprotettivo dell'azitromicina somministrata i.p. al momento della riperfusione in ratti sottoposti ad MCAo transitoria (4,5h).** Riduzione dell'area di infarto (A) e del volume (B) in ratti sottoposti a 4,5 ore di MCAo seguite da 19,5 ore di riperfusione (n=5 ratti per gruppo sperimentale). \*P<0,05 vs veicolo (t test di Student).

Come è possibile osservare dai grafici (Fig. 4-32), la somministrazione sistemica di azitromicina (150 mg/kg, i.p.) dopo 4,5 ore di occlusione della MCA nei ratti continua a produrre una significativa riduzione del danno cerebrale ischemico.

La neuroprotezione indotta dall'azitromicina è stata valutata anche a tempi più tardivi ed è emerso come l'effetto protettivo del farmaco sia *long-lasting*. In effetti dai risultati emerge come in ratti sottoposti a 2h di MCAo seguite da 7 giorni di riperfusione, la somministrazione sistemica di azitromicina (150 mg/kg, i.p. 2 ore dopo l'inizio della riperfusione) produce una riduzione significativa dell'area di infarto cerebrale, del volume e dell'edema (Fig. 4-33 A, B e C).

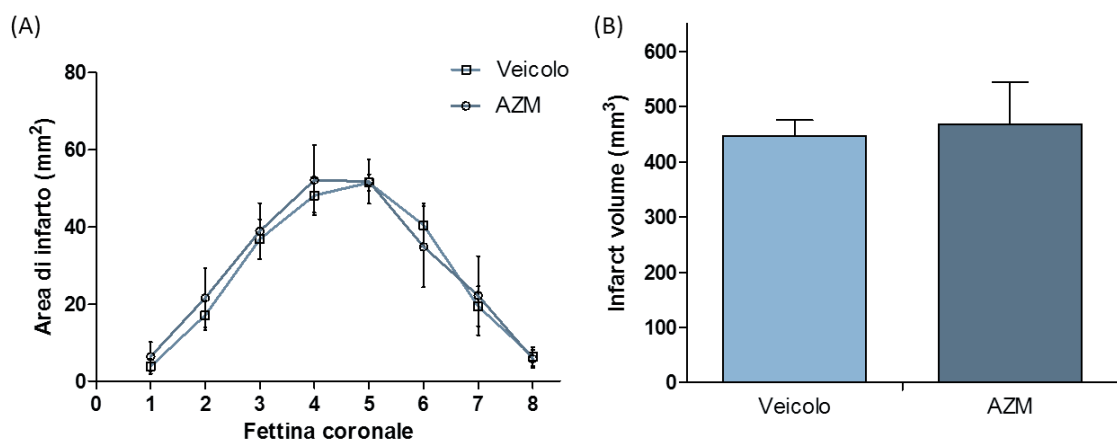
Gli animali trattati con azitromicina mostrano un significativo recupero del deficit neurologico (Fig. 4-33D) non accompagnato da differenze di peso rispetto agli animali veicolo (Fig. 4-33E).





**Figura 4-33: Valutazione dell' effetto neuroprotettivo dell'azitromicina dopo sette giorni di reperfusion nel ratto.** Riduzione dell'area di infarto (A), del volume (B) e dell'edema (C) in ratti sottoposti a 2 ore di MCAo seguite da 7 giorni di reperfusion (n=5 ratti per gruppo sperimentale). L'azitromicina è stata somministrata i.p., due ore dopo l'inizio della reperfusion alla dose di 150 mg/kg. Valutazione del deficit neurologico (D) e del peso corporeo (E) dopo 7 giorni dall'insulto ischemico. \*P<0,05 e \*\*P<0,01 vs veicolo (t test di Student).

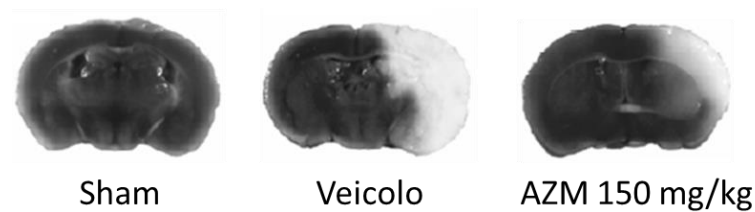
Gli effetti dell'azitromicina sono stati caratterizzati anche in un modello di ischemia cerebrale permanente nei ratti. I risultati ottenuti indicano come il trattamento con il farmaco (azitromicina, 150 mg/kg, i.p., 2 ore dopo MCAo) non produce neuroprotezione in ratti sottoposti ad MCAo permanente (Fig. 4-34).



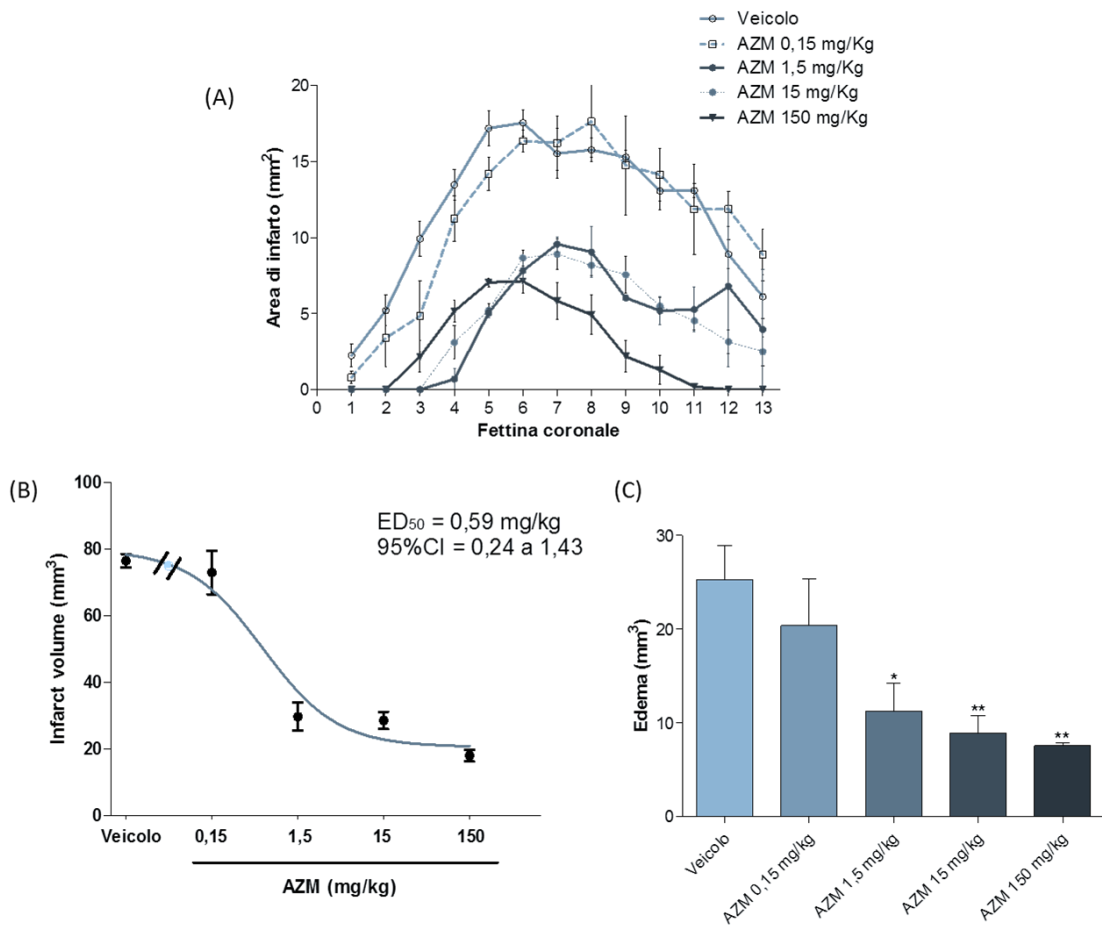
**Figura 4-34: Effetto dell'azitromicina somministrata i.p. 2h dopo MCAo permanente.** L'area di infarto cerebrale (A) e il volume (B) sono stati misurati dopo 24 ore di ischemia in ratti trattati con AZM (150 mg/kg) o veicolo (n=6 ratti per gruppo sperimentale).

#### 4.6 Effetti del trattamento con azitromicina sul danno cerebrale indotto da MCAo nei topi.

L'effetto neuroprotettivo dell'azitromicina è stato dimostrato anche in topi sottoposti ad occlusione transitoria (30 minuti) dell'arteria cerebrale media (Fig. 4-35). La somministrazione sistemica del farmaco (1,5-150 mg/kg, i.p.) immediatamente prima della ri-perfusione produce una riduzione dose-dipendente ( $ED_{50} = 0,59$  mg/kg;  $IC_{95\%} = 0,24-1,43$ ) del danno ischemico cerebrale (Fig. 4-36) misurato 48 ore dopo la ri-perfusione.



**Figura 4-35: Immagini rappresentative della riduzione del danno cerebrale in topi trattati con AZM.** Le sezioni coronali cerebrali di topo sono state colorate con cresil violetto in topi sham (prima immagine) o sottoposti a 30 minuti di MCAo seguite da 48 ore di ri-perfusione senza e con trattamento con azitromicina (rispettivamente seconda e terza immagine).

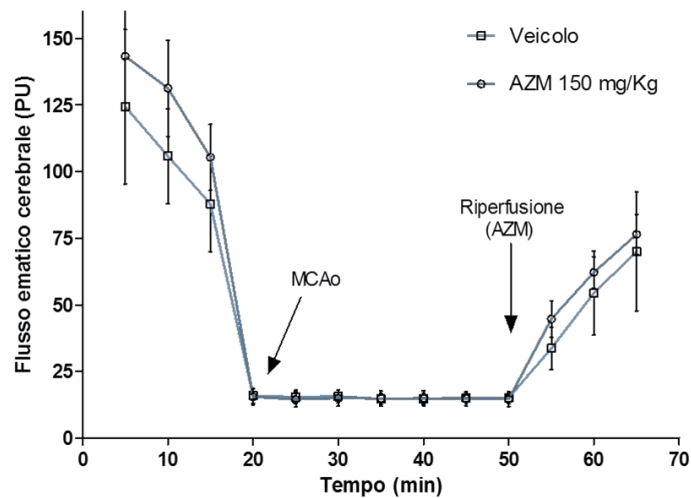


**Figura 4-36: Effetto dell'azitromicina somministrata i.p. al momento della riperfusione in topi sottoposti ad MCAo transitoria (30 min).** L'area di infarto cerebrale (A), il volume (B) e l'edema (C) sono stati misurati dopo 48 ore di riperfusione nei topi trattati con AZM (150 mg/kg) o veicolo. \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01 e \*P<0,05 vs veicolo (ANOVA seguita dal test di Dunnett).

Negli animali trattati con la dose di azitromicina pari a 0,15 mg/kg il volume di infarto misurato dopo 48 ore di riperfusione è risultato paragonabile a quello degli animali controllo. Al contrario, le dosi di AZM pari a 1,5 e 15 mg/kg hanno prodotto una riduzione del volume di infarto pari a circa il 60% rispetto a quello misurato negli animali controllo. La dose di AZM pari a 150 mg/kg è risultata essere la più efficace (dosi più alte di AZM non riducono ulteriormente il volume di infarto; dati non mostrati) con una riduzione del danno cerebrale pari a circa il 75% rispetto al volume

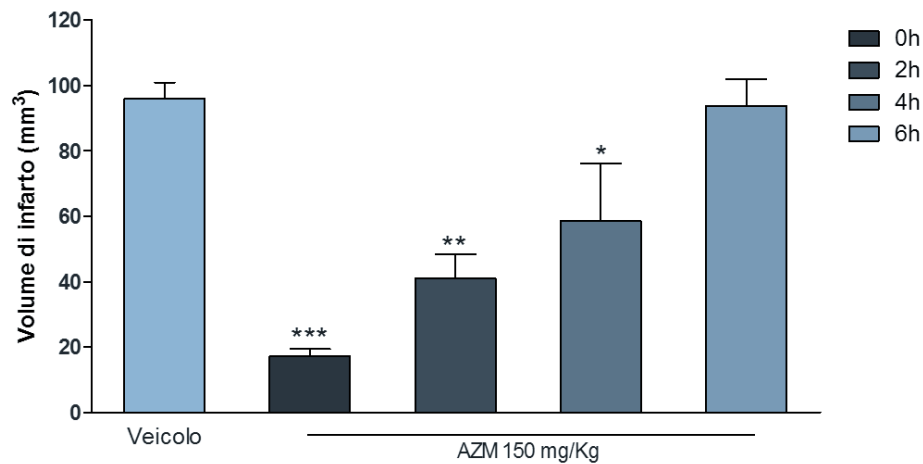
di infarto misurato a 48 ore di ri-perfusione negli animali in cui è stato somministrato il solo veicolo.

Per escludere la possibilità che la neuroprotezione da azitromicina sia associata ad una alterazione della perfusione ematica cerebrale, è stato monitorato il flusso ematico cerebrale e non è stata osservata alcuna variazione tra gli animali trattati con AZM e quelli a cui è stato somministrato il solo veicolo (Fig. 4-37).



**Figura 4-37: Monitoraggio del flusso ematico cerebrale nel ratto.** Il trattamento con azitromicina non influenza la riduzione del flusso ematico cerebrale (CBF) indotta dall'MCAo transitoria nei topi.

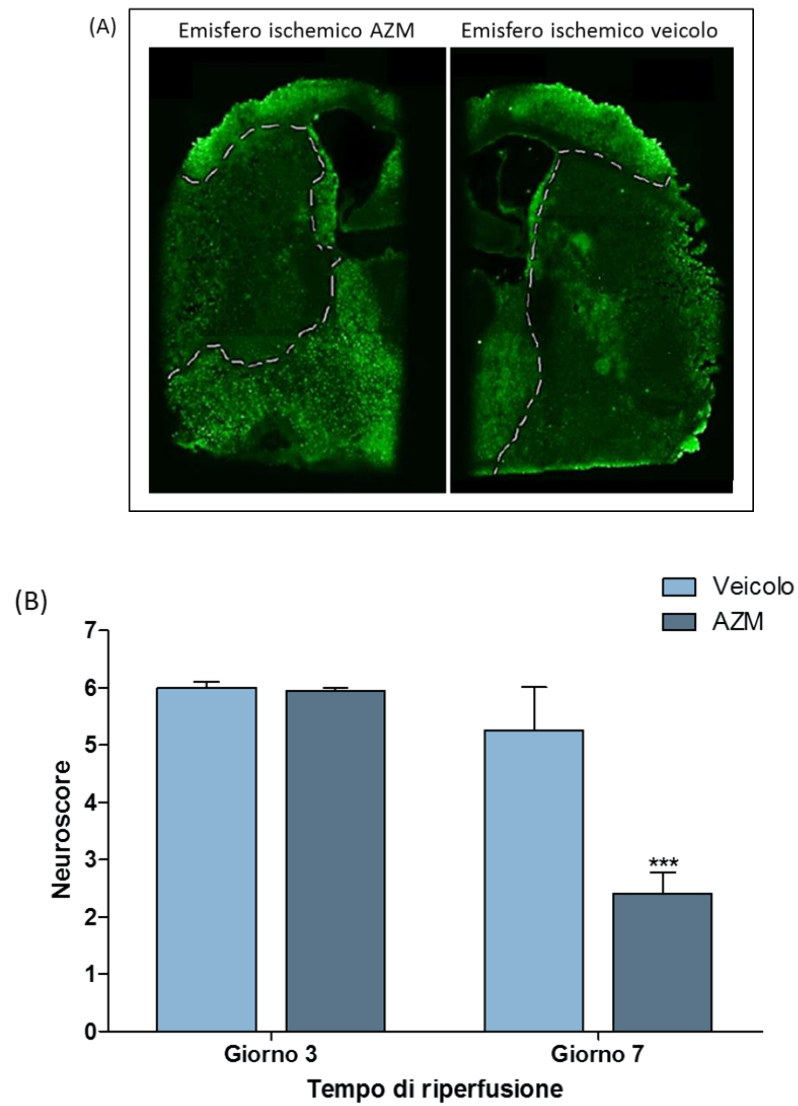
L'efficacia neuroprotettiva dell'azitromicina e la sua potenziale utilità clinica sono ulteriormente avvalorate dall'evidenza che il farmaco è in grado di ridurre in maniera significativa il volume di infarto cerebrale con una finestra temporale estesa (Fig. 4-38).



**Figura 4-38: Finestra temporale dell'azitromicina in topi sottoposti a MCAo transitoria.** La somministrazione di azitromicina (150 mg/kg, i.p.) al momento della riperfusione (0h) determina una significativa riduzione del volume di infarto; tale effetto protettivo si mantiene anche quando il farmaco viene somministrato entro 6 ore dall'inizio della riperfusione.

Nel modello di MCAo transitoria nei topi, la somministrazione di azitromicina (150 mg/kg, i.p.) al momento della riperfusione determina una significativa riduzione del volume di infarto; tale effetto protettivo si mantiene anche quando il farmaco viene somministrato dopo 2 o 4 ore dall'inizio della riperfusione per poi annullarsi soltanto quando la somministrazione viene effettuata dopo 6 ore di riperfusione.

Per determinare se, anche nei topi, l'effetto neuroprotettivo dell'azitromicina persista nel tempo, sono stati valutati la morte neuronale mediante immunofluorescenza e il deficit neurologico 7 giorni dopo l'induzione della MCAo. Nei topi trattati con azitromicina (150 mg/kg, i.p.) è stata osservata una significativa riduzione dell'estensione del danno cerebrale valutata mediante immunofluorescenza con NeuN dopo 7 giorni di riperfusione, rispetto agli animali controllo (Fig. 4-39A). La neuroprotezione è risultata associata ad una significativa riduzione del deficit neurologico a sette giorni dall'ischemia se paragonato a quello degli animali controllo (Fig. 4-39B).



**Figura 4-39: Valutazione dell'effetto neuroprotettivo dell'azitromicina dopo 7 giorni di riperfusione.** (A) L'estensione del danno ischemico cerebrale è stata valutata mediante tecnica di immunofluorescenza con NeuN in topi sottoposti a 30 minuti di MCAo seguiti da 7 giorni di riperfusione. (B) Dopo 3 e 7 giorni di riperfusione è stato valutato anche il deficit neurologico. \*\*\* $P < 0,001$  vs il corrispondente score degli animali veicolo (t test di Student).

# CAPITOLO 5

## DISCUSSIONE

Nel presente studio abbiamo caratterizzato le proprietà neuroprotettive di un antibiotico macrolide, l'azitromicina, in modelli sperimentali di ischemia cerebrale focale. La dimostrazione dell'efficacia dell'azitromicina conferma la validità dell'approccio del drug repurposing per l'identificazione di nuove terapie per l'ictus ischemico (Bagetta *et al.*, 2011). Il razionale della scelta del farmaco si basa sulla sua capacità, dimostrata in altri modelli sperimentali, di modulare meccanismi cruciali coinvolti nella patofisiologia dell'ischemia cerebrale. Difatti, dall'analisi della risposta infiammatoria conseguente all'insulto ischemico nei roditori è emerso come l'attivazione precoce della microglia residente e la rapida infiltrazione cerebrale dei macrofagi e dei neutrofili possano rappresentare utili target terapeutici. Ciò è ulteriormente corroborato da recenti studi di *microarray* che hanno documentato come la maggior parte dei geni modulati acutamente nel sangue dei pazienti colpiti da ictus ischemico risiede proprio nei PMN e nei monociti (Tang *et al.*, 2006). L'azitromicina è capace di accumularsi in queste cellule e di modularne l'attivazione e le funzioni in numerose patologie infiammatorie sistemiche (Carlier *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2009). Nei nostri modelli di ischemia cerebrale focale abbiamo dimostrato che l'azitromicina riduce in maniera significativa il danno cerebrale e il deficit neurologico, confermando la sua azione neuroprotettiva (Bagetta *et al.*, 2011).



L'effetto si osserva a dosi di farmaco inferiori a quelle normalmente utilizzate per ottenere l'effetto antibatterico e con una finestra temporale molto estesa. Ciò sottolinea il potenziale terapeutico dell'azitromicina nei pazienti colpiti da ictus ischemico e pone le basi per la validazione dell'efficacia del farmaco in studi clinici.

Il primo obiettivo dello studio è stato quello di caratterizzare la risposta infiammatoria post-ischemica, sia centrale che periferica, mettendola in relazione con l'evoluzione del danno cerebrale. A tal fine abbiamo utilizzato un modello di ischemia cerebrale basato sull'occlusione transitoria dell'arteria cerebrale media nel topo che produce un danno ischemico focale a livello dello striato e della corteccia frontoparietale. Tale insulto è associato ad un danno significativo a carico della BEE evidente nell'emisfero ischemico già dopo due ore di ri-perfusione. Studi precedenti hanno documentato come entro due ore dall'inizio dell'ischemia la lamina basale endoteliale cominci a dissolversi (Hamann *et al.*, 1995) portando ad un aumento della permeabilità della BEE. In accordo con la letteratura (Belayev *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1999), abbiamo inoltre documentato che il picco di rottura della barriera avviene dopo 48 ore di ri-perfusione nei topi sottoposti a 30 minuti di MCAo.

L'analisi spazio-temporale della risposta infiammatoria in seguito all'occlusione dell'arteria cerebrale media è stata condotta mediante esperimenti di immunofluorescenza. In accordo con i dati riportati in letteratura le cellule microgliali sono risultate essere le prime a rispondere all'insulto tissutale ischemico nel cervello mostrando segni di attivazione entro pochi minuti dall'inizio dell'ischemia (Aloisi, 2001; Schilling *et al.*, 2003). Nelle aree non interessate dall'ischemia e nell'emisfero controlaterale la microglia presenta sottili ramificazioni e piccoli corpi cellulari, tipici dello stato quiescente. Dopo 48 ore di ri-perfusione, la microglia è apparsa fortemente

attivata nell'emisfero ischemico presentando modificazioni morfologiche caratterizzate da rigonfiamento cellulare e accorciamento e ispessimento dei processi, fino ad assumere un fenotipo fagocitico ameboide. A questi tempi, abbiamo infatti osservato come alcune di queste cellule siano in una fase di fagocitosi dei neutrofili. Questi dati sono confermati dagli studi di Denes e colleghi (2007) nei quali è stata osservata un'intensa fagocitosi dei neutrofili da parte della microglia presente nel core ischemico già 48 ore dopo l'insulto ischemico. Abbiamo inoltre identificato due principali aree: il margine della lesione in cui le cellule microgliali presentano un soma cellulare più grande e le tipiche ramificazioni, e la regione del core ischemico in cui le cellule presentano una forma ameboide con soma ipertrofico. Questa caratteristica localizzazione della microglia attivata dall'insulto ischemico è in accordo con quanto descritto in altri modelli di ischemia cerebrale (Nowicka *et al.*, 2008). Zhang e colleghi (1997b) hanno descritto, in un modello di MCAo transitoria, il profilo temporale della risposta microgliale all'insulto ischemico. In accordo con quanto osservato nel nostro studio, essi hanno rilevato la presenza di cellule microgliali con morfologia ameboide prevalentemente nel core ischemico, mentre una microglia attivata e ramificata era presente nelle regioni attorno al core. L'attivazione precoce della microglia porta alla produzione di numerosi mediatori pro-infiammatori, inclusi IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , specie reattive di ossigeno e azoto e proteasi come le MMP che amplificano il danno tissutale (del Zoppo *et al.*, 2007); tuttavia, la microglia contribuisce anche alla risoluzione dell'infiammazione mediante il rilascio di IL-10 e TGF- $\beta$  e, nella fase più tardiva del processo riparativo, tramite la produzione di fattori di crescita (IGF-1) e l'attività fagocitica (Ransohoff & Cardona, 2010). Nel nostro modello abbiamo osservato come lo stato di attivazione delle cellule microgliali si

mantenga sia a 3 che a 7 giorni dall'induzione dell'insulto ischemico. Tuttavia, dopo 7 giorni di riperfusione, parte delle cellule microgliali inizia ad assumere una morfologia aberrante, tipica delle cellule che vanno incontro a morte. La degenerazione della microglia a tempi tardivi è stata riportata anche da altri studi in modelli di MCAo permanente nel topo (Tanaka *et al.*, 2003).

L'astrogliosi reattiva è una componente chiave della risposta cellulare all'insulto cerebrale ischemico (Ridet *et al.*, 1997). Pochi minuti dopo ischemia, i neuroni e le cellule gliali iniziano a rilasciare mediatori pro-infiammatori, citochine e ROS che portano all'attivazione degli astrociti con conseguente alterazione dell'espressione molecolare e ipertrofia cellulare, seguite da proliferazione e formazione della cicatrice gliale (Tuttolomondo *et al.*, 2008; Sofroniew, 2009). A differenza delle cellule microgliali, la cui attivazione è risultata limitata al core e al margine della lesione, gli astrociti sono apparsi attivati a 48 ore di riperfusione in aree più estese, incluse la penombra e le regioni peri-ischemiche. Nelle regioni di core ischemico come lo striato laterale gli astrociti hanno mostrato morfologie aberranti probabilmente legate ad un danno cellulare indotto dalla MCAo. Nella regione peri-ischemica, invece, è stata osservata una più intensa espressione di GFAP se paragonata con l'emisfero controlaterale. Le nostre osservazioni sono in accordo con quanto riportato da altri autori che hanno utilizzato modelli sperimentali simili al nostro. In seguito ad MCAo transitoria è stato osservato, infatti, che gli astrociti GFAP-positivi sono praticamente assenti nel core della lesione ischemica, mentre un elevato numero di astrociti reattivi è presente in regioni periferiche e tale stato di attivazione si mantiene fino a 7 giorni di riperfusione (Chen *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1995c). Rispetto agli astrociti dell'emisfero controlaterale, quelli presenti nelle aree

delimitanti la lesione ischemica (sia a 3 che a 7 giorni di ri-perfusione), hanno mostrato un corpo cellulare più grande e con una elevata espressione di GFAP. A 3 giorni di ri-perfusione, le immagini di immunofluorescenza hanno rivelato una più elevata concentrazione di cellule astrocitarie attorno al core della lesione. È risultata evidente una sostenuta proliferazione di cellule astrocitarie e la loro migrazione verso la zona di delimitazione del core ischemico. Tale “bordo” di astrociti è risultato più marcato e ben definito dopo 7 giorni di ri-perfusione, quando si è osservata la formazione della “cicatrice gliale”. La gliosi reattiva è stata descritta in vari modelli di danno a carico del SNC ed è stata da sempre considerata un evento deleterio dal momento che induce la formazione dell’edema, l’inibizione della rigenerazione assonale, la produzione di mediatori pro-infiammatori come il fattore di necrosi tumorale (TNF)- $\alpha$  e l’IL-1 e, entro poche ore dall’evento ischemico, la produzione di IL-1 $\beta$  e MMP che contribuiscono alla rottura della BEE (Dvorianchikova *et al.*, 2009). Tuttavia, nuove evidenze suggeriscono che le risposte degli astrociti all’insulto ischemico possono essere coinvolte anche nella neuroprotezione e nella riparazione del tessuto mediante il recupero del glutammato extracellulare, la riparazione della BEE e la sintesi di fattori neurotrofici (del Zoppo, 2009; Shen *et al.*, 2010); inoltre la cicatrice gliale tra l’area danneggiata irreversibilmente e la zona peri-ischemica, è di fondamentale importanza nel prevenire l’infiltrazione di cellule infiammatorie e nella stimolazione della rivascolarizzazione (Herrmann *et al.*, 2008).

La risposta infiammatoria al danno cerebrale ischemico, oltre ad attivare le cellule gliali residenti, induce il reclutamento di cellule ematiche, inclusi macrofagi, neutrofili, cellule dendritiche e linfociti T, come dimostrato sia in modelli animali sia in pazienti ischemici (Kamel & Iadecola, 2012). Nel nostro modello di ischemia

focale transitoria abbiamo osservato come dei vari tipi di leucociti, i neutrofili sono tra i primi a infiltrare il parenchima. Abbiamo osservato la presenza di numerose cellule nell'emisfero ischemico già dopo 24 ore dall'insulto; esse sono apparse come aggregati cellulari o come cellule isolate ma prevalentemente localizzate a livello dei vasi sanguigni, attaccati alle pareti e a vari stadi di diapedesi nella regione del core ischemico. Questo accumulo di neutrofili nei vasi, prima della loro massiccia fuoriuscita nel parenchima cerebrale è stato descritto anche in un modello di MCAo permanente (Garcia *et al.*, 1994). Il picco di infiltrazione di neutrofili lo abbiamo osservato dopo 48 ore di ri-perfusione, tempo al quale queste cellule sono apparse distribuite in numerose aree dell'emisfero ischemico, inclusi lo striato e le regioni della penombra e peri-ischemiche. È interessante notare come il picco di infiltrazione di neutrofili corrisponda al picco di apertura della BEE. L'importanza dell'infiltrazione dei neutrofili durante l'ischemia cerebrale è stata documentata in diverse specie. L'accumulo cerebrale di queste cellule è stato correlato allo sviluppo del danno cerebrale in modelli sperimentali di ischemia nei roditori (Atochin *et al.*, 2000) e alla gravità del danno tissutale e all'esito finale sfavorevole nei pazienti ischemici (Buck *et al.*, 2008). A tempi più tardivi (3 e 7 giorni) abbiamo osservato una tendenziale riduzione del numero di neutrofili nell'emisfero ischemico. I neutrofili vengono rapidamente mobilizzati dal midollo osseo ed entrano nella circolazione sistemica in risposta all'insulto ischemico (Hedrich & Bullock, 2004). In accordo con questa nota risposta all'insulto, abbiamo osservato, mediante analisi citofluorimetrica un incremento significativo (2 ore dopo l'insulto) del numero di neutrofili nel sangue e nella milza in topi sottoposti a ischemia transitoria rispetto agli animali sham. A tempi più tardivi (24 ore e 7 giorni), pur mantenendosi elevato il numero di neutrofili

in circolo rispetto agli animali sham, abbiamo osservato una tendenza alla riduzione del numero di queste cellule nel sangue e tale riduzione è, probabilmente, associata all'infiltrazione di queste cellule nel tessuto cerebrale.

In aggiunta ai neutrofili, i macrofagi sono risultati essere le cellule maggiormente presenti nell'emisfero ischemico. L'infiltrazione dei macrofagi è risultata evidente già dopo 24 ore di ri-perfusione per raggiungere il picco a 48 ore dall'inizio dell'ischemia. Nel core ischemico il numero di macrofagi presenti è risultato considerevolmente inferiore rispetto a quello evidenziato ai margini del tessuto lesa e nelle regioni peri-ischemiche. L'emisfero controlaterale è risultato completamente privo di macrofagi infiltranti. Dopo 3 e 7 giorni di ri-perfusione i macrofagi presenti nel tessuto lesa sono risultati considerevolmente di numero inferiore rispetto alle 48h. L'infiltrazione cerebrale dei macrofagi è stata documentata sia in modelli animali di ischemia che in pazienti con stroke (Jander *et al.*, 2007) ed è stato messo in evidenza il ruolo dualistico di queste cellule nell'evoluzione del danno cerebrale (Hu *et al.*, 2012). Il fenotipo M1 promuove il danno mediante la produzione di NO, ROS e citochine pro-infiammatorie, mentre i macrofagi M2 sono implicati nella rimozione dei detriti cellulari, nella stimolazione dell'angiogenesi, nel rimodellamento e nella riparazione del tessuto lesa (Shechter & Schwartz, 2013). I macrofagi possono assumere numerosi fenotipi diversi in relazione ai segnali provenienti dal microambiente e che sono correlati in maniera spazio-temporale all'evoluzione del danno cerebrale ischemico (Perego *et al.*, 2011). Uno studio recente ha documentato come una sottopopolazione di macrofagi derivanti dal midollo osseo, reclutati attraverso CCR2 è in grado di mantenere l'integrità dell'unità neurovascolare e di prevenire la trasformazione emorragica in modelli murini di stroke (Gliem *et al.*,

2012a). Importanti informazioni circa le funzioni dei macrofagi e la loro infiltrazione nel tessuto cerebrale 24-48 ore dopo l'insulto ischemico sono presenti in letteratura (Iadecola, 1997) così come la caratterizzazione del ruolo di queste cellule nell'ischemia cerebrale e in altre patologie neurodegenerative (Biju *et al.*, 2010; Butovsky *et al.*, 2012b; Prinz *et al.*, 2011b). In un elegante studio, Gliem e colleghi hanno dimostrato come una specifica popolazione di macrofagi abbia un ruolo determinante nell'evoluzione dell'infiammazione associata alla lesione (Gliem *et al.*, 2012a). Essi hanno messo in evidenza come i macrofagi siano reclutati entro 24 ore dall'inizio dell'ischemia e possano trasformarsi localmente in un fenotipo anti-infiammatorio che gioca un ruolo determinante nel mantenimento dell'integrità dell'unità neurovascolare (Gliem *et al.*, 2012a). Nel nostro studio abbiamo osservato come immediatamente dopo l'insulto ischemico, a livello sistemico, la popolazione macrofagica che viene mobilizzata sia quella pro-infiammatoria M1. In effetti abbiamo documentato come a tempi precoci (dopo 2 ore di ri-perfusione) vi sia un drastico incremento di questa popolazione cellulare nel peritoneo ma anche nel sangue e nella milza di topi sottoposti a MCAo. Questa popolazione macrofagica infila il cervello ischemico esplicando le sue funzioni fagocitiche e di mantenimento della risposta pro-infiammatoria a 24-48 ore dall'insulto. A partire dalle 48 ore abbiamo osservato come alcune di queste cellule siano Arg1 positive (marker del fenotipo M2; dati non mostrati) indice del fatto che una parte dei macrofagi, già a questi tempi, inizia ad esplicare le proprie funzioni benefiche sulla riparazione e il rimodellamento del tessuto leso.

I nostri risultati hanno messo in evidenza la presenza di linfociti T citotossici nell'emisfero ischemico solo a tempi più tardivi, ovvero dopo 3 e, soprattutto, 7 giorni

di riperfusione nei topi sottoposti a MCAo. Il ruolo deleterio dei linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> è stato descritto in diversi modelli sperimentali di ischemia nel topo (Yilmaz *et al.*, 2006). Queste cellule sono state individuate, in seguito ad ischemia cerebrale, anche nei ratti e nei pazienti ischemici, testimoniando la loro funzione cruciale nell'evoluzione del danno (Jander *et al.*, 1995; Schwab *et al.*, 2001). Tuttavia, il fatto che tali cellule infiltrino il cervello a tempi più tardivi rispetto ai neutrofili e ai macrofagi suggerisce una loro minore rilevanza quali target terapeutici per la neuroprotezione. L'analisi genomica nei pazienti colpiti da ictus ischemico conferma ulteriormente la nostra ipotesi secondo cui i macrofagi e i neutrofili, attivati precocemente dopo l'insulto ischemico, potrebbero rappresentare utili bersagli terapeutici. La tecnologia *microarray* ha reso possibile l'analisi dell'espressione di migliaia di geni e studi recenti hanno descritto le variazioni dell'espressione genica nel sangue sia di animali che di pazienti colpiti da ischemia cerebrale. In particolare, è stato osservato che sono almeno 1335 i geni regolati in seguito ad un evento ischemico e tra questi 134 risultano regolati entro 5 ore dall'insulto. La maggior parte dei geni modulati acutamente nel sangue dei pazienti colpiti da ictus ischemico risiede nei PMN e nei monociti (Tang *et al.*, 2006; Brooks *et al.*, 2013) suggerendo un ruolo chiave di questi tipi cellulari nella patofisiologia ischemica. Utilizzando l'approccio del *drug repurposing* abbiamo individuato nell'azitromicina un potenziale farmaco per il trattamento dell'ischemia cerebrale essendo quest'ultimo in grado di accumularsi in queste cellule (Fieta *et al.*, 1997; Bearden & Rodvold, 1999; Mtairag *et al.*, 1995; Wildfeuer *et al.*, 1996) modulandone l'attivazione e le principali funzioni in numerose patologie infiammatorie (Anderson, 1989; Roche *et al.*, 1986). L'azitromicina è un antibiotico a struttura macrolidica utilizzato in clinica per il



trattamento di infezioni delle vie respiratorie, della cute e dei tessuti molli, di infezioni odontostomatologiche, di uretriti non gonococciche (da *Chlamydia trachomatis*) e dell'ulcera molle (da *Haemophilus ducreyi*) (Zuckerman *et al.*, 2009). Numerosi studi sia in vitro che in vivo (es. pazienti affetti da patologie quali la fibrosi cistica o la DPB) hanno messo in evidenza alcune importanti proprietà anti-infiammatorie dell'azitromicina tra cui l'inibizione della chemotassi dei neutrofili e della produzione di specie reattive dell'ossigeno, la riduzione dell'espressione di molecole di adesione, gli effetti pro-apoptotici sui neutrofili e l'inibizione della produzione di citochine pro-infiammatorie quali IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 da parte di cellule fagocitiche e neutrofili (Wenisch *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2000; Inamura *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 1999). Diversi studi hanno dimostrato come l'azitromicina sia in grado di polarizzare i macrofagi verso il fenotipo benefico M2 determinando una ridotta produzione di IL-12 e IL-6 e un aumento di IL-10 (Murohy *et al.*, 2008). È stata anche osservata una riduzione dei livelli di IL-1 $\beta$ , CCL-2 e TNF- $\alpha$  nei macrofagi alveolari M1 in seguito al trattamento con questo farmaco in soggetti affetti da fibrosi cistica (Meyer *et al.*, 2009).

Tali evidenze suggeriscono il potenziale terapeutico dell'azitromicina in patologie caratterizzate da un'importante attivazione/disregolazione di risposte infiammatorie mediate da macrofagi e neutrofili. Pertanto, nel presente lavoro abbiamo caratterizzato gli effetti neuroprotettivi di questo farmaco in modelli sperimentali di ischemia cerebrale focale caratterizzati, come sopra descritto, da un importante coinvolgimento sia delle cellule macrofagiche che dei neutrofili circolanti. Al fine di implementare la rilevanza traslazionale dei dati, gli esperimenti sono stati condotti in accordo con le indicazioni dello STAIR (Fisher *et al.*, 2009), ovvero è stata

caratterizzata la curva dose-risposta del farmaco ed è stata definita una finestra temporale di efficacia in modelli di MCAo. Gli esperimenti sono stati effettuati sia nei ratti che nei topi e le analisi istologiche e funzionali sono state effettuate sia acutamente che a lungo-termine.

La somministrazione orale di azitromicina ad una dose di 150 mg/kg, prima dell'induzione della MCAo, ha prodotto una significativa riduzione del volume di infarto cerebrale in modelli di MCAo sia transitoria che permanente. Sebbene nel caso di pazienti colpiti da ictus ischemico il trattamento farmacologico debba essere necessariamente effettuato dopo la comparsa dei sintomi e, quindi dopo l'insulto ischemico, il dato della protezione dell'azitromicina in pre-trattamento potrebbe trovare altre utili applicazioni come trattamento profilattico durante procedure chirurgiche (per es. chirurgia vascolare) che comportano un elevato rischio di danno tissutale ischemico. In tali casi, il pre-trattamento con azitromicina può ridurre il danno tissutale ischemico che può essere causato dalle procedure chirurgiche che coinvolgono vasi di grosso calibro, come per esempio procedure per il trattamento degli aneurismi dell'aorta toracica o dell'aorta addominale. Altre situazioni in cui il danno tissutale ischemico può essere prevenuto impiegando il trattamento descritto qui, includono il *bypass* coronarico, l'angioplastica coronarica, l'impianto di *stent* arteriosi, la ricostruzione mesenterica e renale, le procedure infrainguinali, l'endoarterectomia carotidea e le ricostruzioni dei vasi maggiori (Kantonen *et al.*, 1998; Axelrod *et al.*, 2004; Sharifpour *et al.*, 2013). È importante sottolineare che l'azitromicina è un farmaco ben tollerato nell'uomo. Ciò risulta notevolmente interessante dal punto di vista clinico poiché la maggior parte dei composti con documentata azione neuroprotettiva nei modelli sperimentali e quindi potenzialmente

benefici anche nei pazienti colpiti da ischemia, non è sfruttabile in clinica per la comparsa di gravi effetti tossici (Ginsberg, 2008). Tali effetti indesiderati ostacolano l'utilizzo di questi farmaci per il trattamento profilattico dei pazienti ad alto rischio di patologie ischemiche. Al contrario, l'azitromicina potrebbe essere efficace sia per la profilassi, che per il trattamento delle lesioni ischemiche senza produrre effetti collaterali gravi nell'uomo.

È ancora più interessante notare come l'attività neuroprotettiva dell'azitromicina si mantenga anche quando il farmaco viene somministrato dopo un insulto ischemico di natura transitoria. I risultati ottenuti indicano come la somministrazione sistemica del farmaco (0,15-150 mg/kg), produce una riduzione dose-dipendente del danno ischemico cerebrale, senza modificare il flusso ematico locale. L'effetto protettivo è stato osservato sia in un modello di ischemia cerebrale severa (2 ore di MCAo nei ratti) sia in un modello di ischemia meno intensa (30 minuti di MCAo nei topi), confermando ed estendendo precedenti osservazioni (Bagetta *et al.*, 2011). In accordo con le raccomandazioni STAIR, abbiamo infatti caratterizzato la finestra temporale di efficacia del farmaco e i risultati ottenuti hanno messo in evidenza che la somministrazione sistemica di azitromicina (150 mg/kg, i.p.) dopo 4,5 ore di occlusione della MCA continua a produrre una significativa riduzione del danno ischemico cerebrale. Questa estesa finestra temporale avvalorata la potenziale utilità clinica del farmaco. In effetti, dal momento che l'azitromicina è in grado di prevenire il danno cerebrale in modelli di ischemia transitoria caratterizzata dal ripristino del flusso ematico, il farmaco può essere impiegato per il trattamento dello stroke ischemico in combinazione con la trombolisi con Alteplase (rt-PA), unico trattamento farmacologico approvato per pazienti colpiti da ictus ischemico (*Guidelines*

*for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack*, 2008; SPREAD, 2012). Le conclusioni di due importanti studi pubblicati di recente su *New England Journal of Medicine* e su *Lancet* hanno mostrato come la finestra terapeutica del trattamento trombolitico endovenoso con t-PA (alteplase) possa essere ampliata a 4,5 ore (Furlan, 2012). Lo studio ECASS III ha dimostrato che i pazienti trattati con alteplase in tale finestra temporale estesa mostrano un aumento del 34% delle probabilità di avere un esito favorevole a 3 mesi rispetto al gruppo placebo. Risultati analoghi si sono ottenuti dal SITS-ISTR (*Safe Implementation of Treatments in Stroke – International Stroke Thrombolysis Registry*), in cui 664 pazienti trattati fra le 3 e le 4,5 ore sono stati paragonati a 11.865 pazienti trattati entro le 3 ore (Ahmed *et al.*, 2013). Non è emersa differenza significativa fra i due gruppi per quanto riguarda la comparsa di emorragie sintomatiche. A tal proposito, di recente, anche l'Italia, come la maggior parte dei Paesi Europei, ha recepito l'approvazione dell'estensione della finestra di trattamento con alteplase nei casi di ictus ischemico acuto, entro 4,5 ore dall'insorgenza dei sintomi e dopo aver escluso la diagnosi di emorragia intracranica o la presenza di altri fattori che rendono controindicato l'utilizzo (pazienti in terapia anticoagulante orale, ipertensione arteriosa grave non controllata, insufficienza epatica, ecc.) (SPREAD, 2012). Alla luce di queste nuove evidenze è ipotizzabile che l'azitromicina possa essere utilizzata in combinazione con la trombolisi nell'ambito della finestra temporale estesa.

La neuroprotezione indotta dall'azitromicina è stata valutata anche a tempi più tardivi ed è emerso come l'effetto protettivo del farmaco sia long-lasting. In effetti dai risultati è emerso come sia nei ratti sottoposti a 2h di MCAo che nei topi sottoposti a 30 minuti di ischemia, la somministrazione sistemica acuta di azitromicina produce

una riduzione significativa dell'area di infarto cerebrale, del volume e dell'edema misurati dopo sette giorni di riperfusione. Gli animali trattati acutamente con azitromicina hanno mostrato, inoltre, un significativo recupero dei deficit neurologici valutati fino a sette giorni dopo l'insulto. La valutazione di questo parametro è di estrema importanza. Le analisi istologiche e le valutazioni comportamentali devono essere condotte a tempi tardivi rispetto all'insulto ischemico al fine di dimostrare un beneficio persistente del trattamento farmacologico proposto (Fisher *et al.*, 2009). I nostri dati dimostrano che una singola somministrazione del farmaco produce effetti protettivi che si mantengono nel tempo, inoltre è interessante notare come la dose neuroprotettiva di azitromicina sia minore rispetto alla dose antimicrobica. Sulla base dei dati nei roditori, l'ED<sub>50</sub> per l'azione antimicrobica di azitromicina è circa 10 mg/kg (Girard *et al.*, 1987) mentre, in accordo con il presente lavoro, la ED<sub>50</sub> per l'effetto neuroprotettivo è risultata essere pari a 0,59 mg/kg nei topi e a 1,19 mg/kg nei ratti sottoposti ad ischemia cerebrale. Questi dati suggeriscono che la dose da utilizzare nei pazienti ischemici dovrebbe essere paragonabile o addirittura inferiore a quella normalmente impiegata in clinica per l'effetto antibatterico e di cui è già documentata l'ampia tollerabilità nell'uomo.

Riassumendo, le caratteristiche che rendono l'azitromicina un buon candidato per la terapia dell'ischemia includono: 1) una via di somministrazione che può essere orale o parenterale, 2) una buona biodisponibilità orale e una lunga emivita plasmatica (Lalak & Morris, 1993), 3) elevato accumulo nelle cellule, in particolare nei macrofagi, dove si raggiungono livelli centinaia di volte superiori rispetto a quelli sierici (Gladue *et al.*, 1989), 4) non ci sono controindicazioni per l'utilizzo nei

bambini e nelle donne in gravidanza (FDA categoria B), 5) il farmaco è ben tollerato e gli effetti tossici sono poco gravi (Steigbigel, 1995).

Sulla base dei risultati ottenuti in questo lavoro, verrà a breve avviato lo studio clinico ASTRIS. Si tratta di uno studio multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, a gruppi paralleli, per valutare l'efficacia e la sicurezza d'impiego dell'azitromicina, somministrata entro 5 ore dall'esordio dei sintomi, in pazienti con ictus ischemico acuto nel territorio dell'arteria cerebrale media e sottoposti a trattamento trombolitico. Si prevede l'arruolamento di circa 80 pazienti, i quali saranno trattati con azitromicina alla dose di 500 mg in 250 cc di fisiologica o con placebo (fisiologica 250 cc) per via endovenosa in un'unica somministrazione e saranno osservati per un periodo di 90 giorni. Per validare l'efficacia clinica dell'azitromicina, obiettivo primario dello studio sarà quello di documentare una riduzione significativa del deficit neurologico a 7 giorni nei pazienti trattati. Questo parametro sarà valutato anche dopo 30 giorni e 3 mesi dall'esordio della patologia. Infine, saranno valutate la tollerabilità e la sicurezza d'impiego del trattamento. I risultati dello studio ASTRIS saranno fondamentali per l'approvazione dell'azitromicina come nuova strategia terapeutica per il trattamento dei pazienti colpiti da ictus ischemico.

## REFERENZE

- Abbott NJ, Revest PA, Romero IA. *Astrocyte–endothelial interaction: physiology and pathology*. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 8:424-33 (1992).
- Adams CP & Brantner VV. *Estimating the cost of new drug development*. *Health. Aff.* (2006).
- Adhami F, Liao G, Morozov YM, Schloemer A, Schmithorst VJ, Lorenz JN, et al. *Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy*. *Am. J. Pathol.* 169(2):566-83 (2006).
- Ahmed N, Kellert L, Lees KR, Mikulik R, Tatlisumak T, Toni D; SITS Investigators. *Results of intravenous thrombolysis within 4.5 to 6 hours and updated results within 3 to 4.5 hours of onset of acute ischemic stroke recorded in the Safe Implementation of Treatment in Stroke International Stroke Thrombolysis Register (SITS-ISTR): an observational study*. *JAMA Neurol.* 70:837-44 (2013).
- Akins PT, Liu PK, Hsu CY. *Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia*. *Stroke* 27:1682-687 (1996).
- Albers GW, Goldstein LB, Hall D, Lesko LM. *Aptiganel Acute Stroke Investigators. Aptiganel hydrochloride in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial*. *JAMA* 286:2673-682 (2001).
- Albers GW, Goldstein LB, Hess DC, Wechsler LR, Furie KL, Gorelick PB, et al. *Stroke treatment academic industry roundtable (stair) recommendations for maximizing the use of intravenous thrombolytics and expanding treatment options with intra-arterial and neuroprotective therapies*. *Stroke* 42:2645-650 (2011).
- Allen CL & Bayraktutan U. *Risk factors for ischaemic stroke*. *Int. J. Stroke* 3:105-16 (2008).
- Allen C, Thornton P, Denes A, McColl BW, Pierozynski A, Monestier M, et al. *Neutrophil cerebrovascular transmigration triggers rapid neurotoxicity through release of proteases associated with decondensed DNA*. *J. Immunol.* 189:381-92 (2012).

- Almekhlafi MA, Wilton SB, Rabi DM, Ghali WA, Lorenzetti DA, Hill MD. *Recurrent cerebral ischemia in medically treated patent foramen ovale*. Neurology 73:89-97 (2009).
- Aloisi F. *Immune function of microglia*. Glia 36:165-79 (2001).
- Amantea D, Corasaniti MT, Mercuri NB, Bernardi G, Bagetta G. *Brain regional and cellular localization of gelatinase activity in rat that have undergone transient middle cerebral artery occlusion*. Neuroscience 152(1):8-17 (2008).
- Amantea D, Nappi G, Bernardi G, Bagetta G, Corasaniti MT. *Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators*. FEBS J. 276:13-26 (2009).
- Amantea D, Bagetta G, Tassorelli C, Mercuri NB, Corasaniti MT. *Identification of distinct cellular pools of interleukin-1beta during the evolution of the neuroinflammatory response induced by transient middle cerebral artery occlusion in the brain of rat*. Brain Res. 1313:259-69 (2010).
- Amantea D, Tassorelli C, Russo R, Petrelli F, Morrone LA, Bagetta G, Corasaniti MT. *Neuroprotection by leptin in a rat model of permanent cerebral ischemia: effects on STAT3 phosphorylation in discrete cells of the brain*. Cell Death Dis. 2:238 (2011).
- Amantea D, Tassorelli C, Micieli, Petrelli F, Certo M, Bezzi P, Corasaniti MT, Bagetta G. *Understanding the multifaceted role of inflammatory mediators in ischemic stroke*. Curr. Med. Chem. (2013), in press.
- Amarenco P, Bogousslavsky J, Callahan A 3rd, Goldstein LB, Hennerici M, Rudolph AE, et al. *High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack*. N. Engl. J. Med. 355:549-59 (2006).
- Anderson R. *Erythromycin and roxithromycin potentiate human neutrophil locomotion in vitro by inhibition of leukoattractant-derived superoxide generation and auto-oxidation*. J. Infect. Dis. 159:966-73 (1989).
- Araujo FG, Shepard RM, Remington JS. *In vivo activity of the macrolide antibiotics azithromycin, roxithromycin and spiramycin against Toxoplasma gondii*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10:519-23 (1991).
- Arbeloa J, Pérez-Samartín A, Gottlieb M, Matute C. *P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia*. Neurobiol. Dis. 45:954-61 (2012).
- Arundine M & Tymiansky M. *Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury*. Cell. Mol. Life Sci. 61:657-68 (2004).



- Aoshiba K, Nafai A, Konno K. *Erythromycin shortens neutrophil survival by accelerating apoptosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 39:872-77 (1995).
- Asano K, Kamakazu K, Hisamitsu T, Suzaki H. *Modulation of Th2 type cytokine production from human peripheral blood leukocytes by a macrolide antibiotic, roxithromycin, in vitro*. Int. J. Immunopharmacol. 1:1913-921 (2001).
- Atochin DN, Fisher D, Demchenko IT, Thom SR. *Neutrophil sequestration and the effect of hyperbaric oxygen in a rat model of temporary middle cerebral artery occlusion*. Undersea Hyperb. Med. 27:185-90 (2000).
- Axelrod DA, Stanley JC, Upchurch GR Jr, Khuri S, Daley J, Henderson W, et al. *Risk for stroke after elective noncarotid vascular surgery*. J. Vasc. Surg. 39(1):67-72 (2004).
- Bagetta G, Amantea D, Nappi G, Caltagirone C, Corasaniti MT. *Azitromicina, suoi sali o solvati farmaceuticamente accettabili come neuroprotettori*. Deposito domanda di brevetto n. RM2011A000233 (2011).
- Bailly S, Fay M, Gougerot-Pocidal MA. *Effects des antibiotiques sur la production de cytokines par les monocytes humains*. Pathol. Biol. 41:838-44 (1993).
- Bao Dang Q, Lapergue B, Tran-Dinh A, Diallo D, Moreno JA, Mazighi M, et al. *High-density lipoproteins limit neutrophil-induced damage to the blood-brain barrier in vitro*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 33:575-82 (2013).
- Bearden DT & Rodvold KA. *Penetration of macrolides into pulmonary sites of infections*. Infect. Med. 16:480-84 (1999).
- Bednar MM, Gross CE, Russell SR, Fuller SP, Ellenberger CI, Schindler E, et al. *Humanized anti-L-selectin monoclonal antibody DREG200 therapy in acute thromboembolic stroke*. Neurol. Res. 20:403-8 (1998).
- Bermudez LE, Inderlied C, Young LS. *Stimulation with cytokines enhances penetration of azithromycin into human macrophages*. Antimicrob. Agents Chemother. 35:2625-629 (1991).
- Biessels GJ, van der Heide LP, Kamal A, Bleys RL, Gispen WH. *Ageing and diabetes: implications for brain function*. Eur. J. Pharmacol. 441:1-14 (2002).
- Biju K, Zhou Q, Li G, Imam SZ, Roberts JL, Morgan WW, et al. *Macrophage-mediated GDNF delivery protects against dopaminergic neurodegeneration: a therapeutic strategy for Parkinson's disease*. Mol. Ther. 18: 1536-544 (2010).
- Blasi F, Mantero M, Aliberti S. *Antibiotics as immunomodulant agents I COPD*. Curr. Opin. Pharmacol. 12:293-99 (2012).

- Block F, Peters M, Nolden-Koch M. *Expression of IL-6 in the ischemic penumbra*. Neuroreport 11:963-7 (2000).
- Bonita R, Duncan J, Truelsen T, Jackson RT, Beaglehole R. *Passive smoking as well as active smoking increases the risk of acute stroke*. Tob Control. 8:156-60 (1999).
- Bossù P, Salani F, Cacciari C, Picchetto L, Cao M, Bizzoni F, et al. *Disease outcome, alexithymia and depression are differently associated with serum IL-18 levels in acute stroke*. Curr. Neurovasc. Res. 6:163-70 (2009).
- Bové J, Martínez-Vicente M, Vila M. *Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights*. Nat. Rev. Neurosci. 12:437-52 (2011).
- Braeuninger S, Kleinschnitz C, Stoll G. *Interleukin-18 does not influence infarct volume or functional outcome in the early stage after transient focal brain ischemia in mice*. Exp. Transl. Stroke Med. 2:1 (2010).
- Brait VH, Arumugam TV, Drummond GR, Sobey CG. *Importance of T lymphocytes in brain injury, immunodeficiency, and recovery after cerebral ischemia*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 32:598-611 (2012).
- Brea D, Blanco M, Ramos-Cabrera P, Moldes O, Arias S, Pérez-Mato M, et al. *Toll-like receptors 2 and 4 in ischemic stroke: outcome and therapeutic values*. J Cereb. Blood Flow Metab. 31:1424-31 (2011).
- Brennan FH, Anderson AJ, Taylor SM, Woodruff TM, Ruitenberg MJ. *Complement activation in the injured central nervous system: another dual-edged sword?* J. Neuroinflammation 9:137 (2012).
- Brisson NA, Trieu Cuot P, Courvalin P. *Mechanism of action of spiramycin and other macrolides*. J. Antimicrob. Chemother. 22:13-23 (1988).
- Brooks SD, VanGilder R, Frisbee JC, Barr TL. *Genomics for the Advancement of Clinical Translation in Stroke*. In *Frontiers in Neurotherapeutics: Rational Basis for Clinical Translation in Stroke Therapy*. CRC press, Boca Raton, FL, USA (2013) in press.
- Brough D, Le Feuvre RA, Iwakura Y, Rothwell NJ. *Purinergic (P2X7) receptor activation of microglia induces cell death via an interleukin-1-independent mechanism*. Mol. Cell. Neurosci. 19:272-80 (2002).
- Brouns R & De Deyn PP. *The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke*. Clin. Neurol. Neurosurg. 111:483-95 (2009).
- Bryskier A. *Roxithromycin: Review of its antimicrobial activity*. J. Antimicrob. Chemother. 41:1-21 (1998).

- Buck BH, Liebeskind DS, Saver JL, Bang OY, Yun SW, Starkman S, et al. *Early neutrophilia is associated with volume of ischemic tissue in acute stroke*. Stroke 39:355-60 (2008).
- Burk J, Burggraf D, Vosko M, Dichgans M, Hamann GF. *Protection of cerebral microvasculature after moderate hypothermia following experimental focal cerebral ischemia in mice*. Brain Research 1226:248-55 (2008).
- Butovsky O, Siddiqui S, Gabriely G, Lanser AJ, Dake B, Murugaiyan G, et al. *Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS*. J. Clin. Invest. 122:3063-087 (2012b).
- Campanella M, Sciorati C, Tarozzo G, Beltramo M. *Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain*. Stroke 33:586-92 (2002).
- Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MB, et al. *Neurologic dis-ease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:10061-65 (1993).
- Candelario-Jalil E, González-Falcón A, García-Cabrera M, León OS, Fiebich BL. *Post-ischaemic treatment with the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide reduces blood-brain barrier disruption and leukocyte infiltration following transient focal cerebral ischaemia in rats*. J. Neurochem. 100:1108-20 (2007).
- Carlier MB, Garcia-Luque I, Montenez JP, Tulkens PM, Piret J. *Accumulation, release and subcellular localization of azithromycin in phagocytic and non-phagocytic cells in culture*. Int. J. Tissue React. 16:211-20 (1994).
- Castillo J, Dávalos A, Noya M. *Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids*. Lancet 349:79-83 (1997).
- Celgene Reports Record Non-GAAP Fourth Quarter and Full Year 2010 Operating and Financial Results (2011).
- Chakraborti AK, Garg SK, Kumar R, Motiwala HF, Jadhavar PS. *Progress in COX-2 inhibitors: a journey so far*. Curr. Med. Chem. 17:1563-93 (2010).
- Chen GY & Nuñez G. *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. Nat. Rev. Immunol. 10:826-37 (2010).
- Chen H, Chopp M, Schultz L, Bodzin G, Garcia JH. *Sequential neuronal and astrocytic changes after transient middle cerebral artery occlusion in the rat*. J. Neurol. Sci. 118, 109-16 (1993).
- Chen Y, Hallenbeck JM, Ruetzler C, Bol D, Thomas K, Berman NE, et al. *Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates*

- ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells. J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23:748-55 (2003).
- Chen Y, Ruetzler C, Pandipati S, Spatz M, McCarron RM, Becker K, et al. *Mucosal tolerance to E-selectin provides cell-mediated protection against ischemic brain injury. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:15107-112 (2003b).
- Choi DW. *Ischemia-induced neuronal apoptosis. Curr. Opin. Neurobiol.* 6:667-72 (1996).
- Choi DW & Rothman SM. *The role glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. Ann. Rev. Neurosci* 13:171-78 (1990).
- Cipriani R, Villa P, Chece G, Lauro C, Paladini A, Micotti E, et al. *CX3CL1 is neuroprotective in permanent focal cerebral ischemia in rodents. J. Neurosci.* 31:16327-35 (2011).
- Clark WM, Lessov N, Lauten JD, Hazel K. *Doxycycline treatment reduces ischemic brain damage in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. J. Mol. Neurosci.* 9:103-8 (1997).
- Clausen BH, Lambertsen KL, Babcock AA, Holm TH, Dagnaes-Hansen F, Finsen B. *Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice. J Neuroinflamm.* 5:46 (2008).
- Clemens JA. *Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants. Free Radic. Biol. Med.* 28:1526-531 (2000).
- Corrales-Medina V, Musher D. *Immunomodulatory agents in the treatment of community-acquired pneumonia: a systematic review. J. Infect.* 63:187-99 (2011).
- Cui J, Holmes EH, Greene TG, Liu PK. *Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. FASEB J.* 14:955-67 (2000).
- Culebras A. *Sleep and stroke. Semin. Neurol.* 29:438-45 (2009).
- Cunningham LA, Wetzel M, Rosenberg GA. *Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. Glia* 50:329-39 (2005).
- Cutting Edge Information. *Pharmaceutical product relaunch: preserving market share through line extension and new market entry strategies.* (2007).
- Dawson DA, Wadsworth G, Palmer AM. *A comparative assessment of the efficacy and side-effect liability of neuroprotective compounds in experimental stroke. Brain Res.* 892:344-50 (2001).

- Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. *Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury*. Nat. Chem. Biol. 1(2):112-19 (2005).
- del Zoppo GJ, Milner R, Mabuchi T, Hung S, Wang X, Berg GI, et al. *Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia*. Stroke 38:646-51 (2007).
- del Zoppo GJ. *Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia*. Neuroscience 158:972-82 (2009).
- del Zoppo GJ. *Acute anti-inflammatory approaches to ischemic stroke*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1207:143-8 (2010).
- del Zoppo GJ. *The neurovascular unit, matrix proteases, and innate inflammation*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1207:46-9 (2010).
- Denes A, Ferenczi S, Halasz J, Kornyei Z, Kovacs KJ. *Role of CX3CR1 (fractalkine receptor) in brain damage and inflammation induced by focal cerebral ischemia in mouse*. J Cereb. Blood Flow Metab. 28:1707-21 (2008).
- Dénes A, Vidyasagar R, Feng J, Narvainen J, McColl BW, Kauppinen RA, et al. *Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 27:1941-53 (2007).
- Dentesano G, Straccia M, Ejarque-Ortiz A, Tusell JM, Serratosa J, Saura J, Solà C. *Inhibition of CD200R1 expression by C/EBP beta in reactive microglial cells*. J. Neuroinflammation 9:165 (2012).
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. *Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view*. Trends Pharmacol. Sci. 22:391-97 (1999).
- Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. *Stroke*. Lancet 371:1612-23 (2008).
- Donohue MM, Cain K, Zierath D, Shibata D, Tanzi PM, Becker KJ. *Higher plasma fractalkine is associated with better 6-month outcome from ischemic stroke*. Stroke 43:2300-6 (2012).
- Dvorientchikova G, Barakat D, Brambilla R, Agudelo C, Hernandez E, Bethea JR, et al. *Inactivation of astroglial NF-kappa B promotes survival of retinal neurons following ischemic injury*. Eur. J. Neurosci. 30:175-185 (2009).
- Edaravone Acute Infarction Study. *Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters*. Cerebrovasc. Dis. 15:222-29 (2003).

- Ehrensperger E, Minuk J, Durcan L, Mackey A, Wolfson C, Fontaine AM, Cote R. *Predictive value of soluble intercellular adhesion molecule-1 for risk of ischemic events in individuals with cerebrovascular disease.* Cerebrovasc. Dis. 20:456-62 (2005).
- Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. *Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia.* Neuroscience 158:1021-9 (2009).
- Elewa HF, Kozak A, Johnson MH, Ergul A, Fagan SC. *Blood pressure lowering after experimental cerebral ischemia provides neurovascular protection.* J. Hypertens. 25:855-9 (2007).
- Emsley HC, Smith CJ, Georgiou RF, Vail A, Hopkins SJ, Rothwell NJ, Tyrrell PJ. *Acute Stroke Investigators. A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients.* J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 76:1366-372 (2005).
- Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Waeber C, Zhang L, Gomez-Isla T, et al. *Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family.* J. Cereb. Blood Flow Metab. 18:238-47 (1998).
- Enlimomab acute stroke trial investigators. *Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: results of the Enlimomab Acute Stroke Trial.* Neurology 57(8):1428-34 (2001).
- Erecinska M, Thoresen M, Silver IA. *Effects of hypothermia on energy metabolism in mammalian central nervous system.* J. Cereb. Blood Flow Metab. 23:513-30 (2003).
- European cardiovascular disease statistics. (2008) European Heart Network, Brussels.
- Fagan SC, Hess DC, Hohnadel EJ, Pollock DM, Ergul A. *Targets for vascular protection after ischemic stroke.* Stroke 35:2220-5 (2004).
- Fagan SC, Hess DC, Machado LS, Hohnadel EJ, Pollock DM, Ergul A. *Tactics for vascular protection after acute ischemic stroke.* Pharmacotherapy 25:387-95 (2005).
- Fagan SC, Kozak A, Hill WD, Pollock DM, Johnson MH, Ergul A, Hess DC. *Hypertension after experimental cerebral ischemia: candesartan provides neurovascular protection.* J. Hypertens. 24:535-9 (2006).
- Felger J, Abe T, Kaunzner U, Gottfried-Blackmore A, Gal-Toth J, McEwen B, et al. *Brain dendritic cells in ischemic stroke: time course, activation state, and origin.* Brain Behav. Immun. 24:724-37 (2010).
- Feuerstein GZ, Zaleska MM, Krams M, Wang X, Day M, Rutkowski JL, et al. *Missing steps in the STAIR case: a translational medicine perspective on the development of NXY-059 for treatment of acute ischemic stroke.* J. Cereb. Blood Flow Metab. 28:217-19 (2008).

- Fieta A, Merlini C, Grassi GC. *Requirements for intracellular accumulation and release of clarithromycin and azithromycin by human phagocytes*. J. Chemother. 9:23-31 (1997).
- Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, Lo EH. *Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations*. Stroke 40:2244-250 (2009).
- Fiskum G & Reed JC. *Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:5752-757 (1999).
- Foulds G, Shepard RM, Johnson RB. *The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues*. J. Antimicrob. Chemother. 25:73-82 (1990).
- Friedlander RM. *Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases*. New Engl. J. Med. 348:1365-375 (2003).
- Friedlander RM, Gagliardini V, Hara H, Fink KB, Li W, MacDonald G, et al. *Expression of a dominant negative mutant of interleukin-1 beta converting enzyme in transgenic mice prevents neuronal cell death induced by trophic factor withdrawal and ischemic brain injury*. J. Exp. Med. 185:933-40 (1997).
- Frieler RA, Meng H, Duan SZ, Berger S, Schütz G, He Y, et al. *Myeloid-specific deletion of the mineralocorticoid receptor reduces infarct volume and alters inflammation during cerebral ischemia*. Stroke 42:179-85 (2011).
- Furuya K, Takeda H, Azhar S, McCarron RM, Chen Y, Ruetzler CA, et al. *Examination of Several Potential Mechanisms for the Negative Outcome in a Clinical Stroke Trial of Enlimomab, a Murine Anti-Human Intercellular Adhesion Molecule-1 Antibody: A Bedside-to-Bench Study*. Stroke 32:2665-674 (2001).
- Garau A, Bertini R, Colotta F, Casilli F, Bigini P, Cagnotto A, et al. *Neuroprotection with the CXCL8 inhibitor repertaxin in transient brain ischemia*. Cytokine 30:125-31 (2005).
- Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Lian J, Chen S, del Zoppo G. *Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat)*. Am. J. Pathol. 144:188-99 (1994).
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J. Cell. Biol. 119:493-501 (1992).
- Gelderblom M, Leypoldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, et al. *Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke*. Stroke 40:1849-57 (2009).
- Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, et al. *Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is*

- proinflammatory after transient focal cerebral ischemia*. Am. J. Physiol. 289:H558–H568 (2005).
- Ginsberg MD. *Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future*. Neuropharmacology 55:363-89 (2008).
- Gladue RP, Bright GM, Isaacson RE, Newborg MF. *In vitro and in vivo uptake of azithromycin (CP-62,993) by phagocytic cells: possible mechanism of delivery and release at sites of infections*. Antimicrob. Agents Chemother. 33:277-82 (1989).
- Gliem M, Mausberg AK, Lee JI, Simiantonakis I, Rooijen N, Hartung HP, et al. *Macrophages prevent hemorrhagic infarct transformation in murine stroke models*. Ann. Neurol. 71:743-52 (2012a).
- Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. *Heart Disease and Stroke Statistics--2013 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation 127:143-52 (2013).
- Goeckeler ZM & Wysolmerski RB. *Myosin light chain kinase-regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerization, and myosin phosphorylation*. J. Cell. Biol. 130(3):613-27 (1995).
- Gordon R, Mays R, Sambrano B, Mayo T, Lapolla W. *Antibiotics used in nonbacterial dermatologic conditions*. Dermatol. Ther. 25:38-54 (2012).
- Gottfried-Blackmore A, Kaunzner U, Idoyaga J, Felger J, McEwen B, Bulloch K. *Acute in vivo exposure to interferon-gamma enables resident brain dendritic cells to become effective antigen presenting cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:20918-23 (2009).
- Greco R, Mangione AS, Amantea D, Bagetta G, Nappi G, Tassorelli C. *IkappaB-alpha expression following transient focal cerebral ischemia is modulated by nitric oxide*. Brain Res. 1372:145-51 (2011).
- Gu L, Xiong X, Zhang H, Xu B, Steiberg GK, Zhao H. *Distinctive effects of T cell subsets in neuronal injury induced by cocultured splenocytes in vitro and by in vivo stroke in mice*. Stroke 43:1941-6 (2012).
- Guan Q, Pei D, Liu X, Wang X, Xu T, Zhang G. *Neuroprotection against ischemic brain injury by SP600125 via suppressing the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis*. Brain Res. 1092(1):36-46 (2006).
- Guekht A. *Are neuroprotection agents still an option for acute ischemic stroke?* 7<sup>th</sup> World Congress Controversies in Neurology (CONY). Istanbul, April 15, (2013).
- Guidlines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. Cerebrovasc. Dis. 25:457-507 (2008).



- Hand WL & Hand DL. *Influence of pentoxifylline and its derivatives on antibiotic uptake and superoxide generation by human phagocytic cells*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:511-21 (1995).
- Hanisch UK. *Microglia as a source and target of cytokines*. *Glia* 40:140-55 (2002).
- Hansen AT & Nedergaard M. *Brain ion homeostasis in cerebral ischemia*. *Neurochem. Pathol.* 9:195-209 (1988).
- Haqqani AS, Nesic M, Preston E, Baumann E, Kelly J, Stanimirovic D. *Characterization of vascular protein expression patterns in cerebral ischemia/reperfusion using laser capture microdissection and ICAT-nanoLCMS/MS*. *FASEB J.* 19:1809-21 (2005).
- Harrison DC, Davis RP, Bond BC, Campbell CA, James MF, Parsons AA, et al. *Caspase mRNA expression in a rat model of focal cerebral ischemia*. *Brain Res. Mol.* 89:133-46 (2001).
- Hart RG, Benavente O, McBride R, Pearce LA. *Antithrombotic therapy to prevent stroke in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis*. *Ann. Intern. Med.* 131:492-501 (1999).
- Härtl R, Schürer L, Schmid-Schönbein GW, del Zoppo GJ. *Experimental antileukocyte interventions in cerebral ischemia*. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16(6):1108-19 (1996).
- Hassid BG, Nair MN, Ducruet AF, Otten ML, Komotar RJ, Pinsky DJ, et al. *Neuronal RAGE expression modulates severity of injury following transient focal cerebral ischemia*. *J. Clin. Neurosci.* 16:302-6 (2009).
- Hayakawa K, Nakano T, Irie K, Higuchi S, Fujioka M, Orito K, et al. *Inhibition of reactive astrocytes with fluorocitrate retards neurovascular remodeling and recovery after focal cerebral ischemia in mice*. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30:871-82 (2010).
- Hedrich HJ & Bullock GR. *The laboratory mouse*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Academic Press; (2004).
- Hermann DM, Kilic E, Hata R, Hossmann KA, Mies G. *Relationship between metabolic dysfunctions, gene responses and delayed cell death after mild focal cerebral ischemia in mice*. *Neuroscience* 104:947-55 (2001).
- Herrmann JE, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen TK, et al. *STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury*. *J. Neurosci.* 28:7231-243 (2008).

- Hill WD, Hess DC, Martin-Studdard A, Carothers JJ, Zheng J, Hale D, et al. *SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury*. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 63:84-96 (2004).
- Holme I, Aastveit AH, Hammar N, Jungner I, Walldius G. *Relationships between lipoprotein components and risk of ischaemic and haemorrhagic stroke in the Apolipoprotein MOrtality RISk study (AMORIS)*. J. Intern. Med. 265:275-87 (2009).
- Horn J, de Haan RJ, Vermeulen M, Limburg M. *Very Early Nimodipine Use in Stroke (VENUS): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Stroke 32:461-65 (2001a).
- Horn J, de Haan RJ, Vermeulen M, Luiten PG, Limburg M. *Nimodipine in animal model experiments of focal cerebral ischemia: a systematic review*. Stroke 32:2433-438 (2001b).
- Hossmann KA. *Pathophysiology and therapy of experimental stroke*. Cell. Mol. Neurobiol. 26:1057-83 (2006).
- Hoyte L, Barber PA, Buchan AM, Hill MD. *The rise and fall of NMDA antagonists for ischemic stroke*. Curr. Mol. Med. 4:131-36 (2004).
- Hu G, Sarti C, Jousilahti P, Silventoinen K, Barengo NC, Tuomilehto J. *Leisure time, occupational, and commuting physical activity and the risk of stroke*. Stroke 36:1994-99 (2005).
- Hu G, Tuomilehto J, Silventoinen K, Sarti C, Mannisto S, Jousilahti P. *Body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio on the risk of total and type-specific stroke*. Arch. Intern. Med. 167:1420-27 (2007).
- Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, et al. *Microglia/Macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia*. Stroke 43:3063-70 (2012).
- Hua F, Ma J, Ha T, Xia Y, Kelley J, Williams DL, et al. *Activation of Toll-like receptor 4 signaling contributes to hippocampal neuronal death following global cerebral ischemia/reperfusion*. J. Neuroimmunol. 190:101-11 (2007).
- Huang J, Choudhri TF, Winfree CJ, McTaggart RA, Kiss S, Mocco J, et al. *Postischemic cerebrovascular E-selectin expression mediates tissue injury in murine stroke*. Stroke 31:3047-53 (2000b).
- Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. *Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia*. Surg. Neurol. 66(3):232-45 (2006).
- Huang YC & Feng ZP. *The good and bad of microglia/macrophages: new hope in stroke therapeutics*. Acta Pharmacol. Sin. 36:6-7 (2013).

- Huang J, Li Y, Tang Y, Tang G, Yang GY, Wang Y. *CXCR4 antagonist AMD3100 protects blood-brain barrier integrity and reduces inflammatory response after focal ischemia in mice*. Stroke 44:190-7 (2013).
- Hyakkoku K, Hamanaka J, Tsuruma K, Shimazawa M, Tanaka H, Uematsu S, et al. *Toll-like receptor 4 (TLR4), but not TLR3 or TLR9, knock-out mice have neuroprotective effects against focal cerebral ischemia*. Neuroscience 171:258-67 (2010).
- Iadecola C. *Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury*. Trends Neurosci. 20:132-39 (1997).
- Iadecola C & Anrather J. *The immunology of stroke: from mechanisms to translation*. Nat. Med. 17:796-808 (2011).
- Iadecola C & Davisson RL. *Hypertension and cerebrovascular dysfunction*. Cell Metabolism 7:476-84 (2008).
- Iadecola C, Park L, Capone C. *Threats to the mind: aging, amyloid, and hypertension*. Stroke 40:S40-44 (2009).
- Imai F, Suzuki H, Oda J, Ninomiya T, Ono K, Sano H, et al. *Neuroprotective effect of exogenous microglia in global brain ischemia*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 227:488-500 (2007).
- Inamura K, Ohta N, Fukase S, Kasajima N, Aoyagi M. *The effect of erythromycin on human peripheral neutrophil apoptosis*. Rhinology 38:124-29 (2000).
- Jander S, Kraemer M, Schroeter M, Witte OW, Stoll G. *Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 15:42-51 (1995).
- Jander S, Schroeter M, Saleh A. *Imaging inflammation in acute brain ischemia*. Stroke 38:642-5 (2007).
- Jin R, Yang G, Li G. *Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells*. J. Leukoc. Biol. 87:779-89 (2010).
- Jin R, Yang G, Li G. *Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator*. Neurobiol. Dis. 38:376-85 (2010).
- Johansson MW, Patarroyo M, Oberg F, Siegbahn A, Nilsson K. *Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alpha M beta 2 integrin (Mac-1, CD11b/CD18)*. J. Cell. Sci. 110(9):1133-39 (1997).

- Joly LM, Mucignat V, Mariani J, Plotkine M, Charriaut-Marlangue C. *Caspase inhibition after neonatal ischemia in the rat brain*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 24:124-31 (2004).
- Kamel H & Iadecola C. *Brain-immune interactions and ischemic stroke*. Clinical implications. Arch. Neurol. 69:576-81 (2012).
- Kantonen I, Lepantalo M, Salenius P. *Influence of surgical experience on the results of carotid surgery*. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 15:155-60 (1998).
- Kanwar JR, Kanwar RK, Burrow H, Baratchi S. *Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders*. Curr. Med. Chem. 16:2373-94 (2009).
- Katsura K, Kristian T, Siesjo BK. *Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain*. Biochem. Soc. Trans. 22:991-96 (1994).
- Kawasaki S, Takizawa H, Ohtoshi T, Takeuchi N, Kohyama T, Nakamura H, et al. *Roxithromycin inhibits cytokine production by and neutrophil attachment to human bronchial epithelial cells in vitro*. Antimicrob. Agents Chemother. 42:1499-502 (1998).
- Khan AA, Silber TR, Araujo G, Remington JS. *Effects of clarithromycin and azithromycin on production of cytokines by human monocytes*. Int. J. Antimicrob. Agents 11:121-32 (1999).
- Khanna I. *Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends*. Drug Discov. Today 17:1088-102 (2012).
- Kikuchi T, Hagiwara K, Honda Y, Gomi K, Kobayashi T, Takahashi H, et al. *Clarithromycin suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production by human monocytes through AP-1 and NF-kappa B transcription factors*. J. Antimicrob. Chemother. 49:745-55 (2002).
- Kim YS, Immink RV, Stok WJ, Karemaker JM, Secher NH, van Lieshout JJ. *Dynamic cerebral autoregulatory capacity is affected early in Type 2 diabetes*. Clin. Sci. (Lond). 115:255-62 (2008).
- Kizer JR, Wiebers DO, Whisnant JP, Galloway JM, Welty TK, Lee ET, et al. *Mitral annular calcification, aortic valve sclerosis, and incident stroke in adults free of clinical cardiovascular disease: the Strong Heart Study*. Stroke 36:2533-37 (2005).
- Kohyama T, Takizawa H, Kawasaki S, Akiyama N, Sato M, Ito K. *Fourteen-member macrolides inhibit interleukin-8 release by human eosinophils from atopic donors*. Antimicrob. Agents Chemother. 43:907-11 (1999).
- Kokovay E, Li L, Cunningham LA. *Angiogenic recruitment of pericytes from bone marrow after stroke*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 26:545-55 (2006).

- Konsman JP, Drukarch B, Van Dam AM. *(Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology*. Clin. Sci. (Lond.) 112:1-25 (2007).
- Kostulas N, Li HL, Xiao BG, Huang YM, Kostulas V, Link H. *Dendritic cells are present in ischemic brain after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat*. Stroke 33:1129-34 (2002).
- Koto T, Takubo K, Ishida S, Shinoda H, Inoue M, Tsubota K, et al. *Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells*. Am. J. Pathol. 170(4):1389-97 (2007).
- Kozak W, Kozak A, Elewa HF, Fagan SC. *Vascular protection with candesartan after experimental acute stroke in hypertensive rats: a dose-response study*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 326:773-82 (2008).
- Kozak A, El-Remessy AB, Ergul A, Johnson MH, Machado LS, Elewa HF, et al. *Candesartan augments ischemia-induced proangiogenic state and results in sustained functional improvement after stroke*. Stroke 40:1870-6 (2009).
- Krams M, Lees KR, Hacke W, Grieve AP, Orgogozo JM, Ford GA; ASTIN Study Investigators. *Acute Stroke Therapy by Inhibition of Neutrophils (ASTIN): an adaptive dose-response study of UK-279,276 in acute ischemic stroke*. Stroke 34(11): 2543-48 (2003).
- Kristián T & Siesjö BK. *Calcium in ischemic cell death*. Stroke 29:705-18 (1998).
- Kroemer G & Reed JC. *Mitochondrial control of cell death*. Nat. Med. 6:513-19 (2000).
- Kuboyama K, Harada H, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Ushijima K, Inoue K. *Astrocytic P2Y(1) receptor is involved in the regulation of cytokine/chemokine transcription and cerebral damage in a rat model of cerebral ischemia*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 31:1930-41 (2011).
- Kuroda S, Tsuchidate R, Smith ML, Maples KR, Siesjö BK. *Neuroprotective effects of a novel nitron, NXY-059, after transient focal cerebral ischemia in the rat*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 19:778-87 (1999).
- Labro MT, el Benna J, Babin-Chevaye C. *Comparison of the in-vitro effect of several macrolides on the oxidative burst of human neutrophils*. J. Antimicrob. Chemother. 24:561-72 (1989).
- Lai AY & Todd KG. *Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury*. Glia 56:259-70 (2008).
- Lalancette-Hébert M, Swarup V, Beaulieu JM, Bohacek I, Abdelhamid E, Weng YC, et al. *Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury*. J. Neurosci. 32:10383-95 (2012).

- Lambertsen KL, Clausen BH, Babcock AA, Gregersen R, Fenger C, Nielsen HH, et al. *Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor*. J. Neurosci. 29:1319-30 (2009).
- Lambertsen KL, Biber K, Finsen B. *Inflammatory cytokines in experimental and human stroke*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 32:1677-98 (2012).
- Lau A & Tymianski M. *Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration*. Pflugers Arch. 460:525-42 (2010).
- Lawes CM, Bennett DA, Feigin VL, Rodgers A. *Blood pressure and stroke: an overview of published reviews*. Stroke 35:776-85 (2004a).
- Lawes CM, Parag V, Bennett DA, Suh I, Lam TH, Whitlock G, et al. *Blood glucose and risk of cardiovascular disease in the Asia Pacific region*. Diabetes Care 27:2836-42 (2004b).
- Lehmberg J, Beck J, Baethmann A, Uhl E. *Effect of P-selectin inhibition on leukocyte-endothelium interaction and survival after global cerebral ischemia*. J. Neurol. 253:357-63 (2006).
- Lees KR, Asplund K, Carolei A, Davis SM, Diener HC, Kaste M, Orgogozo JM, Whitehead J. *Glycine antagonist (gavestinel) in neuroprotection (GAIN International) in patients with acute stroke: a randomised controlled trial*. GAIN International Investigators. Lancet 355:1949-954 (2000).
- Léveillé F, Gaamouch F, Gouix E, Lecocq M, Lobner D, Nicole O, Buisson A. *Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors*. FASEB J. 22:4258-271 (2008).
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. Cell 94:491-501 (1998).
- Liebenskind DS & Kasner SE. *Neuroprotection for ischaemic stroke: an unattainable goal?* CNS Drugs 15(3):165-74 (2001).
- Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, Doerr H, Sommer C, Rivest S, et al. *Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke*. Nat. Med. 15, 192-9 (2009b).
- Lin HC, Wang CH, Liu CY, Yu CT, Kuo HP. *Erythromycin inhibits  $\beta$ 2 integrins (CD11b/CD18) expression, interleukin-8 release and intracellular oxidative metabolism in neutrophils*. Respir. Med. 94:654-60 (2000).
- Lin MT & Beal MF. *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Nature 443:787-95 (2006).

- Lipfert J, Odemis V, Wagner DC, Boltze J, Engele J. *CXCR4 and CXCR7 form a functional receptor unit for SDF-1/CXCL12 in primary rodent microglia.* Neuropathol. Appl. Neurobiol. 39:667-80 (2013).
- Liszczyk TM, Hedley-Whyte ET, Adams JF, Han DH, Kolluri VS, Vacanti FX, et al. *Limitations of tetrazolium salts in delineating infarcted brain.* Acta Neuropathol. 65:150-7 (1984).
- Liu X & Rinkel GJE. *Aneurysmal and clinical characteristics as risk factors for intracerebral haematoma from aneurysmal rupture.* J. Neurol. 258:862-65 (2011).
- Liu J, Jin X, Liu KJ, Liu W. *Matrix metalloproteinase-2-mediated occluding degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage.* J. Neurosci. 32:3044-57 (2012).
- Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyackers M, Liu L, Lai TW, et al. *NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo.* J. Neurosci. 27:2846-857 (2007).
- Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, et al. *Heart disease and stroke statistics-2010 update: A report from the American Heart Association.* Circulation 121:e46-e215 (2010).
- Lo EH. *A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke.* Nat. Med. 14:497-500 (2008).
- Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. *Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat.* J. Cereb. Blood Flow Metab. 18:176-9 (1998).
- Loh E, Sutton MS, Wun CC, Rouleau JL, Flaker GC, Gottlieb SS, et al. *Ventricular dysfunction and the risk of stroke after myocardial infarction.* N. Engl. J. Med. 336:251-57 (1997).
- Logan A, Berry M, Gonzalez AM, Frautschy SA, Sporn MB, Baird A. *Effects of transforming growth factor beta 1 on scar production in the injured central nervous system of the rat.* Eur. J. Neurosci. 6:355-63 (1994).
- Luheshi NM, Kovács KJ, Lopez-Castejon G, Brough D, Denes A. *Interleukin-1 $\alpha$  expression precedes IL-1 $\beta$  after ischemic brain injury and is localised to areas of focal neuronal loss and penumbral tissues.* J. Neuroinflammation 8:186 (2011).
- Manaenko A, Chen H, Kammer J, Zhang JH, Tang J. *Comparison Evans Blue injection routes: intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood-brain barrier in a mice hemorrhage model.* J. Neurosci. Met. 195:206-10 (2011).

- Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI. *The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death?* Trends Neurosci. 17:251-57 (1994).
- Mead EL, Mosley A, Eaton S, Dobson L, Heales SJ, Pocock JM. *Microglial neurotransmitter receptors trigger superoxide production in microglia; consequences for microglial-neuronal interactions.* J. Neurochem. 121:287-301 (2012).
- Melani A, Amadio S, Gianfriddo M, Vannucchi MG, Volontè C, Bernardi G, et al. *P2X7 receptor modulation on microglial cells and reduction of brain infarct caused by middle cerebral artery occlusion in rat.* J. Cereb. Blood Flow Metab. 26:974-82 (2006).
- Melani A, Corti F, Stephan H, Müller CE, Donati C, Bruni P, et al. *Ecto-ATPase inhibition: ATP and adenosine release under physiological and ischemic in vivo conditions in the rat striatum.* Exp. Neurol. 233:193-204 (2012).
- Meden P, Overgaard K, Pedersen H, Boysen G. *Effect of early treatment with tirilazad (u74006f) combined with delayed thrombolytic therapy in rat embolic stroke.* Cerebrovasc. Dis. 6:141-48 (1996).
- Meyer M, Huaux F, Gavilanes X, van den Brûle S, Lebecque P, Lo Re S, et al. *Azithromycin reduces exaggerated cytokine production by M1 alveolar macrophages in cystic fibrosis.* Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 41:590-602 (2009).
- Minnerup J, Sevimli S, Schabitz WR. *Granulocyte-colony stimulating factor for stroke treatment: mechanisms of action and efficacy in preclinical studies.* Exp. Transl. Stroke Med. 1: 2 (2009).
- Mitsuyama T, Hidaka K, Furono T, Hara N. *Neutrophil-induced endothelial cell damage: inhibition by a 14-membered ring macrolide through the action of nitric oxide.* Int. Arch. Allergy Immunol. 114:111-15 (1997).
- Mocco J, Choudhri T, Huang J, Harfeldt E, Efros L, Klingbeil C, et al. *HuEP5C7 as a humanized monoclonal anti-E/ P-selectin neurovascular protective strategy in a blinded placebocontrolled trial of nonhuman primate stroke.* Circ. Res. 91:907-14 (2002).
- Morikawa K, Watabe H, Arake M, Morikawa S. *Modulatory effects of antibiotics on cytokine production by human monocytes in vitro.* Antimicrob. Agents Chemother. 40:1366-370 (1996).
- Moro MA, Cárdenas A, Hurtado O, Leza JC, Lizasoain I. *Role of nitric oxide after brain ischaemia.* Cell Calcium 36:265-75 (2004).
- Moutard I, Gressier B, Bonte F, Dine T, Brunet C, Luyckx M, et al. *In vitro effects of spiramycin on IL-1 beta production by human LPS-stimulated mononuclear cells.* Therapie 54:512-607 (1999).



- Muir KW. *Heterogeneity of stroke pathophysiology and neuroprotective clinical trial design*. Stroke 33(6):1545-50 (2002).
- Mullard A. *Could pharma open its drug freezers?* Nat. Rev. Drug Discov. 10:399-400 (2011).
- Muralikrishna Adidhatla R & Hatcher JF. *Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia*. Free Rad. Biol. Med. 40:376-87 (2006).
- Murphy S & Gibson CL. *Nitric oxide, ischaemia and brain inflammation*. Biochem. Soc. Trans. 35:1133-37 (2007).
- Murphy BS, Sundareshan V, Cory TJ, Hayes D, Anstead MI, Feola DJ. *Azithromycin alters macrophage phenotype*. J. Antimicrob. Chemother. 61(3): 554-60 (2008).
- Murray PJ & Wynn TA. *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets*. Nature Rev. Immunol. 11:723-37 (2011).
- Nakamura H, Strong AJ, Dohmen C, Sakowitz OW, Vollmar S, Sué M, et al. *Spreading depolarizations cycle around and enlarge focal ischaemic brain lesions*. Brain 133:1994-2006 (2010).
- Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, et al. *Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia*. J. Neurosci. 18:3659-68 (1998).
- Nedeltchev K, Wiedmer S, Schwerzmann M, Windecker S, Haefeli T, Meier B, et al. *Sex differences in cryptogenic stroke with patent foramen ovale*. Am. Heart J. 156:461-65 (2008).
- Ni B, Wu X, Su Y, Stephenson D, Smalstig EB, Clemens J, Paul SM. *Transient global forebrain ischemia induces a prolonged expression of the caspase-3 mRNA in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 18:248-256 (1998).
- Nicholls DG. *Mitochondrial calcium function and dysfunction in the central nervous system*. Biochim. Biophys. Acta 1787:1416-424 (2009).
- Nicholls DG & Budd SL. *Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity*. Biochim. Biophys. Acta 1366: 97-112 (1998).
- Nieswandt B, Pleines I, Bender M. *Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke*. J. Thromb. Haemost. 1:92-104 (2011).
- Nowicka D, Rogozinska K, Aleksy M, Witte OW, Skangiel-Kramska J. *Spatiotemporal dynamics of astroglial and microglial responses after photothrombotic stroke in the rat brain*. Acta Neurobiol. Exp. 68:155-68 (2008).

- Nuttall ME, Lee D, McLaughlin B, Erhardt JA. *Selective inhibitors of apoptotic caspases: implications for novel therapeutic strategies*. Drug Discov. Today 6:85-91 (2001).
- Oda H, Kadota J, Kohno S, Hara K. *Leukotriene B 4 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis*. Chest 108:116-22 (1995).
- Offner H, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Vandenbark AA, Hurn PD. *Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 26:654-65 (2006a).
- Ogata J, Yamanishi H, Ishibashi-Ueda H. *Role of cerebral vessels in ischaemic injury of the brain*. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 37:40-55 (2011).
- Oh SM & Betz L. *Interaction between free radicals and excitatory amino acids in the formation of ischemic brain edema in rats*. Stroke 22:915-21 (1991).
- Olsson S, Holmegaard L, Jood K, Sjögren M, Engström G, Lövkvist H, et al. *Genetic variation within the interleukin-1 gene cluster and ischemic stroke*. Stroke 43:2278-82 (2012).
- Osborne KA, Shigeno T, Balarsky AM, Ford I, McCulloch J, Teasdale GM, Graham DI. *Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischaemia*. J. Neurol. Neurosurg. Psych. 50:402-10 (1987).
- Ouyang YB, Tan Y, Comb M, Liu CL, Martone ME, Siesjo BK, Hu BR. *Survival- and death-promoting events after transient cerebral ischemia: phosphorylation of Akt, release of cyto-chrome C and activation of caspase-like proteases*. J. Cereb Blood Flow Metab. 19:1126-35 (1999).
- Palinski W. *Immunomodulation: a new role for statins?* Nat. Med. 6:1311-2 (2000).
- Pang L, Ye W, Che XM, Roessler BJ, Betz AL, Yang GY. *Reduction of inflammatory response in the mouse brain with adenoviral-mediated transforming growth factor- $\beta$ 1 expression*. Stroke 32:544-52 (2001).
- Park, S, Lee YC, Rhee YK, Lee HB. *The effect of long-term treatment with erythromycin on Th1 and Th2 cytokines in diffuse panbronchiolitis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 324:114-17 (2004).
- Pascual A, Rodriguez-Bano J, Ballesta S, Garcia I, Perea EJ. *Azithromycin uptake by tissue cultured epithelial cells*. J. Antimicrob. Chemother. 39:293-95 (1997).
- Perego C, Fumagalli S, De Simoni MG. *Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice*. J. Neuroinflamm. 8:174 (2011).

- Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. *Microglia in neurodegenerative disease*. Nat. Rev. Neurol. 6:193-201 (2010).
- Plane J, Shen Y, Pleasure D, Deng W. *Prospects for minocycline neuroprotection*. Arch. Neurol. 67:1442-48 (2010).
- Pradillo JM, Romera C, Hurtado O, Cárdenas A, Moro MA, Leza JC, et al. *TNFR1 upregulation mediates tolerance after brain ischemic pre-conditioning*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 25:193-203 (2005).
- Prestigiacomo CJ, Kim SC, Connolly ES, Liao H, Yan SF, Pinsky DJ. *CD18-mediated neutrophil recruitment contributes to the pathogenesis of reperfused but not nonreperfused stroke*. Stroke 30:1110-17 (1999).
- Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM. *Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration*. Nat. Neurosci. 14:1227-235 (2011b).
- Qiu J, Xu J, Zheng Y, Wei Y, Zhu X, Lo EH, et al. *High-mobility group box 1 promotes metalloproteinase-9 upregulation through Toll-like receptor 4 after cerebral ischemia*. Stroke 41:2077-82 (2010).
- Ransohoff RM & Cardona AE. *The myeloid cells of the central nervous system parenchyma*. Nature 468:253-62 (2010).
- Retsema JA, Girard AE, Girard D, Milisen WB. *Relationship of high tissue concentrations of azithromycin to bactericidal activity and efficacy in vivo*. J. Antimicrob. Chemother. 25:83-9 (1990).
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. *Reactive astrocytes: cellular and molecular clues to biological function*. Trends Neurosci. 20:570-77 (1997).
- Robertson GS, Crocker SJ, Nicholson DW, Schulz JB. *Neuroprotection by the inhibition of apoptosis*. Brain Pathol. 10:283-92 (2000).
- Roche Y, Gougerot-Pocidallo MA, Fay M, Forest N, Pocidallo JJ. *Macrolides and immunity: effects of erythromycin and spiramycin on human mononuclear cell proliferation*. J. Antimicrob. Chemother. 17:195-203 (1986).
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. *Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake*. Nature 403:316-21 (2000).
- Rothwell PM, Eliasziw M, Gutnikov SA, Fox AJ, Taylor DW, Mayberg MR, et al. *Analysis of pooled data from the randomised controlled trials of endarterectomy for symptomatic carotid stenosis*. Lancet 361:107-16 (2003).
- Rothwell PM, Howard SC, Power DA, Gutnikov SA, Algra A, van Gijn J, et al. *Fibrinogen concentration and risk of ischemic stroke and acute coronary events in*

- 5113 patients with transient ischemic attack and minor ischemic stroke. *Stroke* 35:2300-305 (2004).
- Sakata H, Narasimhan P, Niizuma K, Maier CM, Wakai T, Chan PH. *Interleukin 6-preconditioned neural stem cells reduce ischaemic injury in stroke mice*. *Brain* 135:3298-310 (2012).
- Sakito O, Kadota J, Kohno S, Abe K, Shirai R, Hara K. *Interleukin 1 $\beta$ , tumor necrosis factor alpha, and interleukin 8 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis: a potential mechanism of macrolide therapy*. *Respiration* 63:42-48 (1996).
- Sasaki C, Kitagawa H, Zhang WR, Warita H, Sakai K, Abe K. *Temporal profile of cytochrome c and caspase-3 immunoreactivities and TUNEL staining after permanent middle cerebral artery occlusion in rats*. *Neurol. Res.* 22:223-28 (2000).
- Sattler R & Tymianski M. *Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity*. *J. Mol. Med.* 78:3-13 (2000).
- Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M. *Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PS-95 protein*. *Science* 284:1845-848 (1999).
- Schneider A, Kruger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, et al. *The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis*. *J. Clin. Invest.* 115(8):2083-98 (2005).
- Schuetten-Nuetgen K, Strecker JK, Minnerup J, Ringelstein EB, Schilling M. *MCP-1/CCR-2-double-deficiency severely impairs the migration of hematogenous inflammatory cells following transient cerebral ischemia in mice*. *Exp. Neurol.* 233:849-58 (2012).
- Schwab JM, Nguyen TD, Meyermann R, Schluesener HJ. *Human focal cerebral infarctions induce differential lesional interleukin-16 (IL-16) expression confined to infiltrating granulocytes, CD8+ T-lymphocytes and activated microglia/macrophages*. *J. Neuroimmunol.* 114:232-41 (2001).
- Sharifpour M, Moore LE, Shanks AM, Didier TJ, Kheterpal S, Mashour GA. *Incidence, predictors, and outcomes of perioperative stroke in noncarotid major vascular surgery*. *Anesth. Analg.* 116(2):424-34 (2013).
- Shechter R & Schwartz M. *Harnessing monocyte-derived macrophages to control central nervous system pathologies: no longer 'if' but 'how'*. *J. Pathol.* 229, 332-46 (2013).

- Shen LH, Li Y, Chopp M. *Astrocytic endogenous glial cell derived neurotrophic factor production is enhanced by bone marrow stromal cell transplantation in the ischemic boundary zone after stroke in adult rats*. *Glia* 58:1074-81 (2010).
- Shichita T, Ago T, Kamouchi M, Kitazono T, Yoshimura A, Ooboshi H. *Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke*. *J. Neurochem.* 123:29-38 (2012).
- Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, Kiefer R. *Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice*. *Exp. Neurol.* 183:25-33 (2003).
- Schrader J, Luders S, Kulschewski A, Berger J, Zidek W, Treib J, et al. *The ACCESS study: evaluation of acute candesartan cilexetil therapy in stroke survivors*. *Stroke* 34:1699-1703 (2003).
- Schultz M, Speelman JP, Hack CE, Buurman WA, van Deventer SJ, van der Poll T. *Intravenous infusion of erythromycin inhibits CXC chemokine production, but augments neutrophil degranulation in whole blood stimulated with Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:235-40 (2000).
- Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM. *Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury*. *Cytokine Growth Factor Rev.* 10:119-30 (1999).
- Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, et al. *NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke*. *N. Engl. J. Med.* 357:562-71 (2007).
- Shyu WC, Lin SZ, Yen PS, Su CY, Chen DC, Wang HJ, Li H. *Stromal cell-derived factor-1 alpha promotes neuroprotection, angiogenesis, and mobilization/homing of bone marrow-derived cells in stroke rats*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324:834-49 (2008).
- Sieber MW, Jaenisch N, Brehm M, Guenther M, Linnartz-Gerlach B, Neumann H, et al. *Attenuated inflammatory response in triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) knock-out mice following stroke*. *PLoS One* 8:e52982 (2013).
- Siesjo BK, Zhao Q, Pahlmark K, Siesjo P, Katsura K, Folbergrova J. *Glutamate, calcium and free radicals as mediators of ischemic brain damage*. *Ann. Thorac. Surg.* 59:1316-320 (1995).
- Simon SI & Green CE. *Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during in-inflammation*. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 7:151-85 (2005).
- Simons LA, McCallum J, Friedlander Y, Simons J. *Risk factors for ischemic stroke: Dubbo Study of the elderly*. *Stroke* 29:1341-46 (1998).

- Snider BJ, Gottron FJ, Choi DW. *Apoptosis and necrosis in cerebrovascular disease*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 893:243-53 (1999).
- Sofroniew MV. *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*. Trends Neurosci. 32:638-47 (2009).
- Soriano SG, Coxon A, Wang YF, Frosch MP, Lipton SA, Hickey PR, Mayadas TN. *Mice deficient in Mac-1 (CD11b/CD18) are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury*. Stroke 30:134-139 (1999).
- SPREAD - Stroke Prevention And Educational Awareness Diffusion. Ictus cerebrale: linee guida italiane di prevenzione e trattamento. VII Edizione. (2012).
- Sriram K & O'Callaghan JP. *Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain*. J. Neuroimmune Pharmacol. 2:140-153 (2007).
- Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA. *Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families*. Cell 52:925-33 (1988).
- Steen PA, Newberg L, Milde JH, Michenfelder JD. *Hypothermia and barbiturates: individual and combined effects on canine cerebral oxygen consumption*. Anesthesiology 58(6):527-32 (1983).
- Stout AK, Raphael HM, Kanterewicz BI, Klann E, Reynolds IJ. *Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake*. Nat. Neurosci. 1:366-73 (1998).
- Strecker JK, Minnerup J, Gess B, Ringelstein EB, Schäbitz WR, Schilling M. *Monocyte chemoattractant protein-1-deficiency impairs the expression of IL-6, IL-1 $\beta$  and G-CSF after transient focal ischemia in mice*. PLoS One 6:e25863 (2011).
- Strle K, Zhou JH, Shen WH, Broussard SR, Johnson RW, Freund GG, et al. *Interleukin-10 in the brain*. Crit. Rev. Immunol. 21:427-49 (2011).
- Sudlow CLM & Warlow CP. *Comparable studies of the incidence of stroke and its pathologic types: results from an international collaboration*. Stroke 28:491-99 (1997).
- Sugiyama, K, Shirai R, Mukae H, Ishimoto H, Nagata T, Sakamoto N, et al. *Differing effects of clarithromycin and azithromycin on cytokine production by murine dendritic cells*. Clin. Exp. Immunol. 147:540-46 (2007).
- Sun H-S, Doucette TA, Liu Y, Fang Y, Teves L, Aarts M, et al. *Effectiveness of PSD95 inhibitors in permanent and transient focal ischemia in the rat*. Stroke 39:2544-553 (2008).

- Suzuki H, Shimomura A, Ikeda K, Furukawa M, Oshima T, Takasa T. *Inhibitory effects of macrolides on interleukin-8 secretion from cultured human nasal epithelial cells.* Laryngoscope 107:1661-666 (1997b).
- Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. *Astrocyte influences on ischemic neuronal death.* Curr. Mol. Med. 4:193-205 (2004).
- Swardfager W, Winer DA, Herrmann N, Winer S, Lanctôt KL. *Interleukin-17 in post-stroke neurodegeneration.* Neurosci. Biobehav. Rev. 37:436-47 (2013).
- Takizawa H, Desaki M, Ohtoshi T, Kikutani T, Okazaki H, Sato M, et al. *Erythromycin suppresses interleukin-6 expression by human bronchial epithelial cell: a potential mechanism of its anti-inflammatory action.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 210:781-86 (1995).
- Tanaka R, Komine-Kobayashi M, Mochizuki H, Yamada M, Furuya T, Migita M, et al. *Migration of enhanced green fluorescent protein expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mouse brain following permanent focal ischemia.* Neuroscience 117:531-39 (2003).
- Tarozzo G, Campanella M, Ghiani M, Bulfone A, Beltramo M. *Expression of fractalkine and its receptor, CX3CR1, in response to ischaemia-reperfusion brain injury in the rat.* Eur. J. Neurosci. 15:1663-8 (2002).
- Thayer A. *Drug Repurposing.* Chemical & Engineering News. (Online Article). <http://cen.acs.org/articles/90/i40/Drug-Repurposing.html> (2012).
- Thornton P, Pinteaux E, Allan SM, Rothwell NJ. *Matrix metalloproteinase-9 and urokinase plasminogen activator mediate interleukin-1-induced neurotoxicity.* Mol. Cell Neurosci. 37:135-42 (2008).
- Tirilazad International Steering Committee. *Tirilazad mesylate in acute ischemic stroke: a systematic review.* Stroke 31:2257-65 (2000).
- Tralau-Stewart CJ, Wyatt CA, Kleyn DE, Ayad A. *Drug discovery: new models for industry-academic partnerships.* Drug Discov. Today 14:95-101 (2009).
- Tsai, W, Rodriguez CML, Young KS, Deng JC, Thannickal VJ, Tateda K, et al. *Azithromycin blocks neutrophil recruitment in Pseudomonas endobronchial infection.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 170:1331-339 (2004).
- Tuttolomondo A, Di Raimondo D, di Sciacca R, Pinto A, Licata G. *Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke.* Curr. Pharm. Des. 14:3574-89 (2008).
- Tzeng SF, Hsiao HY, Mak OT. *Prostaglandins and cyclooxygenases in glial cells during brain inflammation.* Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy 4:335-40 (2005).

- Ünal-Çevik I, Kiliç M, Can A, Gürsoy-Özdemir, Dalkara T. *Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia*. Stroke 35:2189-194 (2004).
- Vartanian KB, Stevens SL, Marsh BJ, Williams-Karnesky R, Lessov NS, Stenzel-Poore MP. *LPS preconditioning redirects TLR signaling following stroke: TRIF-IRF3 plays a seminal role in mediating tolerance to ischemic injury*. J. Neuroinflammation 8:140 (2011).
- Vazifeh D, Abdelghaffar H, Labro MT. *Cellular accumulation of the new ketolides RU 64004 by human neutrophils: comparison with that of azithromycin and roxithromycin*. Antimicrob. Agents Chemother. 41:2099-107 (1997).
- Velier JJ, Ellison JA, Kikly KK, Spera PA, Barone FC, Feuerstein GZ. *Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat*. J. Neurosci. 19:5932-41 (1999).
- Verkhatsky A & Parpura V. *Recent advances in (patho)physiology of astroglia*. Acta Pharmacol. Sin. 31:1044-54 (2010).
- Volonté C, Apolloni S, Skaper SD, Burnstock G. *P2X7 receptors: channels, pores and more*. CNS Neurol. Disord. Drug Targets 11:705-21 (2012).
- Wald DS, Law M, Morris JK. *Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis*. BMJ 325:1202 (2002).
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA. *The inflammatory response in stroke*. J. Neuroimmunol. 184:53-68 (2007).
- Wang X, Han W, Du X, Zhu C, Carlsson Y, Mallard C, et al. *Neuroprotective effect of Bax-inhibiting peptide on neonatal brain injury*. Stroke 41:2050-55 (2010).
- Wang L, Zhang X, Liu L, Yang R, Cui L, Li M. *Atorvastatin protects rat brains against permanent focal ischemia and downregulates HMGB1, HMGB1 receptors (RAGE and TLR4) NF-kappaB expression*. Neurosci. Lett. 471:152-6 (2010).
- Warach S & Sabounjian LA. *ECCO 2000 study of citicoline for treatment of acute ischemic stroke: effects on infarct volumes measured by MRI*. Stroke 31(1):42 (2000).
- Warlow C, Sudlow C, Dennis M, Wardlaw J, Sandercock P. *Stroke*. Lancet 362:1211-24 (2003).
- Watanabe T, Yuki S, Egawa M, Nishi H. *Protective effects of MCI-186 on cerebral ischemia: possible involvement of free radical scavenging and antioxidant actions*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 268:1597-604 (1994).



- Waxman EA & Lynch DR. *N-methyl-D-aspartic receptor subtypes: multiple role in excitotoxicity and neurological disease*. *Neuroscientist* 11:37-49 (2005).
- Wei J, Pan X, Pei Z, Wang W, Qiu W, Shi Z, Xiao G. *The beta-lactam antibiotic, ceftriaxone, provides neuroprotective potential via antiexcitotoxicity and anti-inflammation response in a rat model of traumatic brain injury*. *J. Trauma Acute Care Surg.* 73:654-60 (2012).
- Weng YC & Kriz J. *Differential neuroprotective effects of a minocycline-based drug cocktail in transient and permanent focal cerebral ischemia*. *Exp. Neurol.* 204:433-42 (2007).
- Wenisch C, Parschalk B, Zedwitz-Liebenstein K, Weihs A, El Menyawi I, Graininger W. *Effects of single oral dose of azithromycin, clarithromycin, and roxithromycin on polymorphonuclear leukocyte function assessed ex vivo by flow cytometry*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2039-042 (1996).
- Wittchen HU, Jacobi F, Rehm J, Gustavsson A, Svensson M, Jönsson B, et al. *The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010*. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 21:655-79 (2011).
- Wu TC & Grotta JC. *Hypothermia for acute ischaemic stroke*. *Lancet Neurol.* 12:275-84 (2013).
- Wong CH & Crack PJ. *Modulation of neuro-inflammation and vascular response by oxidative stress following cerebral ischemia-reperfusion injury*. *Curr. Med. Chem.* 15:1-14 (2008).
- Yang GY, Gong C, Qin Z, Ye W, Mao Y, Bertz AL. *Inhibition of TNFalpha attenuates infarct volume and ICAM-1 expression in ischemic mouse brain*. *Neuroreport* 9:2131-4 (1998).
- Yang QW, Lu FL, Zhou Y, Wang L, Zhong, Q, Lin S, et al. *HMBG1 mediates ischemia-reperfusion injury by TRIF-adaptor independent Toll-like receptor 4 signaling*. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31:593-605 (2011).
- Yenari M, Kitagawa K, Lyden P, Perez-Pinzon M. *Metabolic Downregulation: A Key to Successful Neuroprotection?* *Stroke* 39:2910-917 (2008).
- Yilmaz G, Arumugam TV, Stokes KY, Granger DN. *Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke*. *Circulation* 113:2105-112 (2006).
- Yilmaz G & Granger DN. *Leukocyte recruitment and ischemic brain injury*. *Neuromolecular Med.* 12:193-204 (2010).

- Yin L, Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Iwai Y, Funahashi H, et al. *Expression of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) following transient cerebral ischemia*. Acta Neurochir. Suppl. 86:93-6 (2003).
- Yin XM, Luo Y, Cao G, Bai L, Pei W, Kuharsky DK, Chen J. *Bid-mediated mitochondrial pathway is critical to ischemic neuronal apoptosis and focal cerebral ischemia*. J. Biol. Chem. 277:42074-81 (2002).
- Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J. *Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95, 15769-15774.
- Yulug B, Kilic U, Kilic E, Bahr M. *Rifampicin attenuates brain damage in focal ischemia*. Brain Res. 996:76-80 (2004).
- Zaidan E & Sims NR. *The calcium content of mitochondria from brain subregions following short-term forebrain ischemia and recirculation in the rat*. J. Neurochem. 63:1282-289 (1994).
- Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, et al. *Genomic analysis of reactive astrogliosis*. J. Neurosci. 32:6391-410 (2012).
- Zhang ZG, Chopp M, Powers C. *Temporal profile of microglial response following transient (2h) middle cerebral artery occlusion*. Brain Res. 744:189-98 (1997b).
- Zhang L, Dong LY, Li YJ, Hong Z, Wei WS. *The microRNA miR-181c controls microglia-mediated neuronal apoptosis by suppressing tumor necrosis factor*. J. Neuroinflammation 9:211 (2012).
- Zhao BQ, Tejima E, Lo EH. *Neurovascular proteases in brain injury, hemorrhage and remodeling after stroke*. Stroke 38, 748-52 (2007).
- Zheng Z & Yenari MA. *Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications*. Neurol. Res. 26:884-92 (2004).
- Zhu P, Hata R, Ogasawara, M, Cao F, Kameda K, Yamauchi K, et al. *Targeted disruption of organic cation transporter 3 (Oct3) ameliorates ischemic brain damage through modulating histamine and regulatory T cells*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 32:1897-908 (2012).
- Zhu Y, Yang GY, Ahlemeyer B, Pang L, Che XM, Culmsee C, et al. *Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage*. J. Neurosci. 22:3898-909 (2002).
- Zlokovic BV. *The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders*. Neuron. 57(2):178-201 (2008).

## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio innanzitutto la mia relatrice, dott.ssa. Diana Amantea, dapprima per la sua indiscussa professionalità, nonché per la schiettezza, i consigli datomi e l'entusiasmo dimostratomi. La ringrazio per avermi fatto capire che bisogna credere sempre nel proprio lavoro, nonostante le numerose "avversità ambientali".

Un grazie speciale alla mia amata famiglia, alla quale dedico questo lavoro.

Ringrazio i miei genitori, poiché sono stati il mio punto di riferimento, per tutti i valori che mi hanno trasmesso e perché con grande sostegno mi hanno permesso di raggiungere questo importante obiettivo, infine per avermi supportato con molta pazienza.

