LA TERAPIA CON ALFA-1 ANTITRIPSINA MODULA PROTEOMA E GENOMA DELLE MEMBRANE NEUTROFILE

a cura della Redazione

In quanti soffrono di deficit di alfa-1 antitripsina (DAAT) si osserva un esordio precoce delle broncopneumopatie ostruttive rispetto a chi non ne è colpito, un fatto che ha spinto Murphy et al. a indagare se il DAAT si manifesta anche attraverso delle alterate caratteristiche a livello dei neutrofili proprio a seguito delle ridotte concentrazioni plasmatiche di alfa-1 antitripsina (AAT). Il presente studio si è concentrato sull'analisi – mediante spettrometria di massa senza marcatura – delle membrane plasmatiche dei neutrofili, il cui proteoma è stato messo a confronto in un match basato sui valori del volume espiratorio forzato in un secondo (FEV_1) in tre gruppi di pazienti: affetti da DAAT, con broncopneumopatie croniche ostruttive (BPCO) ma esenti da DAAT e soggetti DAAT in terapia sostitutiva settimanale con AAT (n = 6 pazienti per coorte).
I più bassi livelli di AAT rappresentano un fattore di rischio genetico nello sviluppo di BPCO oltre che di enfisema, in genere di tipo panacinare in contrasto con quello centrolobulare più diffuso tra le BPCO non associate a DAAT.
La terapia sostitutiva con AAT – basata su infusioni endovenose di alfa-1 antitripsina, ricavata da plasma umano purificato – nei pazienti con DAAT si è già dimostrata valida nel ridurre la perdita di densità polmonare e, più recentemente, sono stati descritti migliori effetti biochimici derivanti da un suo dosaggio doppio (120 mg/kg/settimana) (1). Benché le patologie polmonari nei pazienti DAAT insorgano in giovane età, sono stati realizzati molti studi allo scopo di ottenere delle migliori discriminanti tra i fenotipi BPCO con e senza DAAT, arrivando a valutare svariati elementi: complicazioni e sopravvivenza dopo un trapianto polmonare, riabilitazione polmonare, biomarker plasmatici e urinari, qualità di vita e differenze nell'adeguamento della cura. Una caratteristica comune ad entrambe le categorie di pazienti risiede nella leucocitosi neutrofila delle vie respiratorie – con un aumento nel numero dei neutrofili riferito al liquido dell'epitelio di rivestimento nei DAAT non fumatori rispetto ai soggetti di controllo sani – presente persino in soggetti DAAT affetti da una lieve disfunzione polmonare. Una possibile spiegazione alla maggiore reattività dei neutrofili nel DAAT viene fornita da studi che dimostrano come la AAT possieda proprietà antinfiammatorie al di là della sua attività anti-proteasi. Ciò si rivela di particolare importanza nel modificare alcune funzioni essenziali dei neutrofili, tra cui: l'adesione indotta dal Leucotriene B4, la chemiotassi in risposta all'Interleuchina-8, la degranulazione di granuli secondari e terziari via segnale da Tumour Necrosis Factor-alfa (TNF), l'azione ossidativa e la capacità espressa dalla AAT nel normalizzare i segnali pro-apoptotici tra i neutrofili circolanti.
Avendo già dimostrato come la AAT tenda a legarsi alle membrane plasmatiche dei neutrofili, si solleva la questione se una terapia sostitutiva con AAT nei pazienti BPCO con DAAT possa modificare i neutrofili verso la tipologia cellulare dei pazienti BPCO senza DAAT. Si è pertanto stabilito di mettere a confronto il profilo proteomico delle membrane plasmatiche dei neutrofili tra i soggetti BPCO con DAAT e BPCO senza DAAT, valutando l'impatto esercitato da una terapia sostitutiva con AAT oltre che le conseguenze di un'alterata espressione delle proteine di membrana sulla funzione esercitata dai neutrofili.

I pazienti DAAT (omozigoti per l'allele Z, non fumatori) sono stati ripartiti tra soggetti sani (con FEV1 > 80% del predetto), con patologie ostruttive alle vie respiratorie (con FEV_1 < 80% del predetto ed enfisema caratterizzato mediante Tomografia Computerizzata) e in terapia sostitutiva con AAT (60 mg/kg di peso corporeo a settimana). Come gruppo di controllo sono stati arruolati dei volontari esenti da patologie e da sintomi respiratori, non fumatori e non assumenti farmaci, per i quali era stato accertato un fenotipo MM con livelli sierici di AAT entro la norma.
Tra i risultati messi in evidenza attraverso lo studio in oggetti possiamo elencarne alcuni qui di seguito:
- il proteoma delle membrane plasmatiche dei neutrofili circolanti risulta alterato nei soggetti DAAT rispetto ai soggetti con BPCO: di particolare rilievo, la maggiore concentrazione dei costituenti chiave dei granuli primari (la mieloperossidasi e il battericida/ permeabilità crescente di proteine);
- il rilascio di enzimi dai granuli primari risulta aumentato nei soggetti DAAT: è stato evidenziato il ruolo centrale esercitato nell'esocitosi dei granuli primari da parte dell'isoforma Rac2 delle proteine G monomeriche, la cui attività risulta alterata nei neutrofili dei soggetti DAAT;

- l'Elastasi Neutrofila (NE) induce la produzione dell'anione superossido: tra le conseguenze di una maggiore degranulazione nei soggetti DAAT (in particolare con FEV1 < 80%) si evidenzia un'aumentata produzione di O2- indotta dalla NE;
- l'effetto in vitro esercitato dall'AAT di derivazione esogena sul rilascio dei granuli primari da parte dei neutrofili nel DAAT: diminuivano i livelli di mieloperossidasi in risposta al legame TNF/recettore FMLP e ciò si evidenziava raggiungendo livelli fisiologici di AAT attraverso la terapia sostitutiva, valutata successivamente;
- la terapia sostitutiva con AAT in vivo modifica il proteoma delle membrane dei neutrofili: la correzione del profilo proteomico si traduce in una modifica nel rilascio dei granuli primari, un dato confermato attraverso i neutrofili isolati due giorni dopo la somministrazione della terapia sostitutiva; le proteine erano espresse praticamente allo stesso modo dai soggetti BPCO con e senza DAAT. Va segnalato inoltre che, a due giorni dalla somministrazione della terapia sostitutiva, si registrava una significativa diminuzione nei livelli del legame di attivazione GTP-Rac2 rispetto al Giorno 0 di pretrattamento (p = 0,04).

Partendo dal fatto assodato che i neutrofili – nei soggetti con DAAT legato alla mutazione allelica più severa (ZZ) – mostrano una marcata alterazione nel profilo proteico di membrana, si è quindi messa in luce una chiara correlazione con una degranulazione eccessiva. Infatti, il meccanismo di degranulazione si fonda sull'attivazione del Rac2, a cui fa seguito quella del recettore di tipo 2 attivato dalle serina-proteasi (PAR2) e una conseguente maggiore produzione di specie reattive dell'Ossigeno (ROS); tali risultati forniscono una migliore comprensione di come i neutrofili possano indirizzare verso le malattie respiratorie associate al DAAT e in parallelo mostrano il beneficio esercitato da una terapia sostitutiva settimanale con AAT. Da sottolineare come gli effetti clinico-terapeutici dell'alfa-1 antitripsina erano migliori a due giorni dalla somministrazione, risultati avvalorati anche dal RAPID Clinical Trial (uno studio randomizzato, a doppio cieco, con controllo placebo) (2) che mostrava un rallentamento nella progressione dell'enfisema (attraverso valutazioni radiologiche) ma anche come il classico dosaggio di 60 mg/kg/settimana non fosse in grado di arrestare il declino della funzione polmonare, suggerendo la necessità di rivalutare maggiori dosi per singole somministrazioni.
Pertanto, la terapia sostitutiva con AAT svolge un ruolo essenziale nei soggetti DAAT in quanto è in grado di modificare l'intero complesso proteico espresso dalle membrane cellulari dei neutrofili (reindirizzandolo verso quello delle cellule di soggetti BPCO senza DAAT) e intervenendo direttamente sul processo a cascata di degranulazione, risultante nell'attivazione del PAR2 e nella generazione di ROS.

Bibliografia

1. Campos MA, Geraghty P, Holt G, Mendes E, Newby PR, Ma S, Luna-Diaz LV, Turino GM, Stockley RA. The biological effects of double-dose alpha-1 antitrypsin augmentation therapy: a pilot study. Am J Respir Crit Care Med 2019.
2. Chapman KR, Burdon JG, Piitulainen E, Sandhaus RA, Seersholm N, Stocks JM, Stoel BC, Huang L, Yao Z, Edelman JM, McElvaney NG, RAPID Trial Study Group. Intravenous augmentation treatment and lung density in severe alpha1 antitrypsin deficiency (RAPID): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet 2015: 386(9991): 360-368.

Commento a:

- Murphy MP, McEnery T, McQuillan K, et al. Alpha-1 antitrypsin therapy modulates the neutrophil membrane proteome and secretome; Eur Respir J 2020; pii: 1901678. doi:10.1183/13993003.01678-2019