

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

**DOTTORATO DI RICERCA
IN
SCIENZE BIOCHIMICHE E BIOMOLECOLARI
XXIII CICLO**

COORDINATORE: Prof. Angelo Vanella

Dottor Ignazio Alberto Barbagallo

**Effetto dell'Iperglicemia nel differenziamento di
Cellule Staminali Mesenchimali Umane in Osteoblasti:
Ruolo dell'Eme Ossigenasi 1**

———
TESI DI DOTTORATO
———

**Tutor:
Chiar.mo Prof. Angelo Vanella**

INDICE

Capitolo 1

Diabete e osteoporosi pag. 5

Capitolo 2

Le cellule staminali pag.9

2.1 Cellule Staminali Embrionali pag.12

2.2 Cellule Staminali Adulte pag.15

2.3 Cellule Staminali Mesenchimali pag.19

Capitolo 3

L'Eme Ossigenasi pag.21

3.1 Isoforme dell'emeossigenasi 1 pag.26

3.2 Funzione e Regolazione dell'emeossigenasi 1 pag.27

Capitolo 4

Scopo della Tesi pag.30

Capitolo 5

Materiali e Metodi pag.32

Capitolo 6

Risultati pag.36

Capitolo 7

Conclusioni pag.42

Bibliografia pag.44

Capitolo 1

DIABETE E OSTEOPOROSI

Il diabete mellito e l'osteoporosi sono entrambi patologie in rapida e costante diffusione, sostenute dall'incremento dei casi nelle popolazioni anziane (1). Dovute sia al progressivo invecchiamento della popolazione sia alle modifiche metaboliche proprie di tale processo; che si associa a cambiamenti fisiopatologici e declino funzionale che possono risultare in un'aumentata fragilità, disabilità e cadute, dovute almeno in parte ad una ridotta massa e forza muscolari, che può essere aggravato dalle malattie croniche tra cui il diabete.

Il diabete mellito ("diabainein", attraversare;"mel" dolce) viene genericamente classificato in:

Diabete mellito di tipo 1

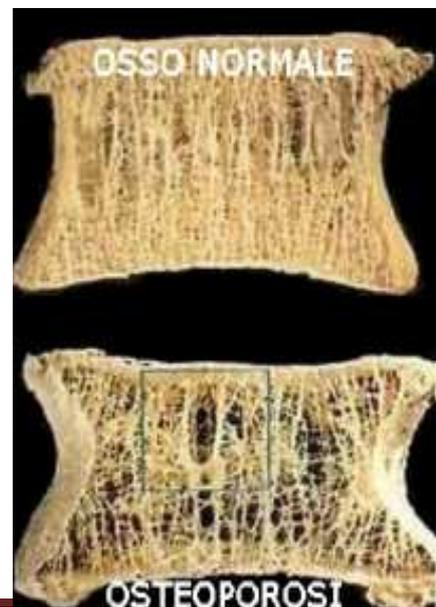
Diabete mellito di tipo 2

Mentre il diabete di tipo 1 è determinato dalla distruzione delle β cellule pancreatiche, di solito associato ad insulino-dipendenza; il diabete di tipo 2 presenta una eziologia di tipo multifattoriale, riconducibile infatti all'azione combinata di più geni e fattori ambientali, inclusi i fattori di rischio legati allo stile di vita dei singoli individui.

L'osteoporosi, invece, è una patologia che comporta una riduzione della massa ossea e alterazioni della struttura dell'osso che diventa poroso.

Di conseguenza, l'osso diventa più fragile e maggiormente esposto a fratture spontanee o provocate da traumi.

Le zone più comuni di rottura sono vertebre, femore, polso, omero. Esistono due tipi di osteoporosi distinti in: post-



menopausale, la cui causa principale è legata alla brusca diminuzione degli estrogeni circolanti, ed osteoporosi senile, legata ad un aumento di un ormone che sottrae calcio e fosfato all'osso. L'osteoporosi, quindi, è determinata da una perdita di equilibrio fra osteoblasti e osteoclasti, ed imputabile ad un maggiore produzione di osteoclasti o a una diminuita attività degli osteoblasti.

Recentemente si sono ampliate le conoscenze sulle correlazioni esistenti tra queste due patologie, associando il diabete ad un elevato rischio di fratture femorali, omerali e del piede.

Studi recenti hanno suggerito che il diabete per se può aumentare il rischio di fratture femorali, omerali e del piede negli anziani (2-7) e ricerche in animali da esperimento diabetici hanno evidenziato delle alterazioni nella conformazione ossea che si sono ipotizzato come possibile fattori favorevoli del rischio di fratture. Nonostante ciò, questo è un argomento ancora non del tutto chiaro ed è necessaria una conoscenza più approfondita dei fattori che determinano la qualità dell'osso nel diabete per attuare una prevenzione efficace delle fratture in questa popolazione ad alto rischio.

Diversi meccanismi sono stati proposti per spiegare le possibili influenze del diabete sul tessuto osseo. I livelli bassi di insulina nel diabete di tipo 1 e nel diabete di tipo 2 di lunga durata possono causare una riduzione della densità minerale ossea (DMO) (8).

D'altra parte, i diabetici di tipo 2 sono frequentemente obesi e l'obesità si associa di solito ad una normale o elevata DMO (9) probabilmente attraverso l'aumento del carico e attraverso fattori ormonali come gli estrogeni, l'insulina, la leptina e l'adiponectina (9-11). La glicosuria può favorire una ipercalciuria e conseguente perdita di massa ossea (12). I prodotti finali della glicosilazione avanzata (AGEs) possono accumularsi nelle fibre collagene alterando la struttura e la resistenza ossea (13). L'"Insulin like growth factor-I" (IGFI), proposto come fattore anabolizzante dell'osso, ha livelli circolanti bassi nei soggetti diabetici (14).

Un processo di infiammazione cronica con aumento nella produzione di citochine può anch'esso accelerare il rimodellamento osseo e la perdita di DMO (15). Le complicazioni microvascolari del diabete possono ridurre il flusso vascolare osseo e contribuire alla fragilità ossea (16, 17) e la riduzione della funzionalità renale si associa ad una bassa DMO in donne anziane (18).

Il processo d'invecchiamento per se si associa a cambiamenti fisiopatologici e declino funzionale che possono risultare in un'aumentata fragilità, disabilità e cadute, dovute almeno in parte ad una ridotta massa e forza muscolari (sarcopenia) (19), che può essere aggravato dalle malattie croniche tra cui il diabete.

La riduzione della massa muscolare può portare a riduzione dell'attività fisica con peggioramento del compenso glicometabolico e riduzione della DMO.

La maggior parte degli studi hanno evidenziato una riduzione modesta della DMO in soggetti con diabete di tipo 1 (6, 22-23) e un notevole incremento del rischio di fratture femorali (3, 4). Risultati contrastanti sono stati riscontrati in due studi caso controllo precedenti (23, 24). I dati sui markers di rimodellamento osseo nel diabete di tipo 1 non sono consistenti. In questo modo, studi in animali da esperimento indicano un basso rimodellamento osseo con attività osteoblastica ed osteoclastica ridotte (12, 25) mentre studi di rimodellamento osseo in soggetti diabetici tipo 1 hanno riportato sia un aumento (26, 27) che una riduzione nel riassorbimento osseo (21, 28). Anche i dati sui markers di formazione ossea non sono omogenei (21, 29, 30).

È quindi ipotizzabile che una alterata qualità dell'osso con una riduzione della resistenza ossea possa essere un fattore importante dell'aumentato rischio di fratture tra i diabetici.

Due studi condotti in animali da esperimento diabetici confermano la ipotesi che l'osso diabetico possa avere una ridotta resistenza ossea in assenza di una riduzione della DMO (31, 32). Un altro studio ha riportato che i femori di ratti spontaneamente diabetici hanno una riduzione della resistenza alla torsione, deformazione angolare e assorbimento della energia, nonostante la DMO non fosse significativamente ridotta (25). Una possibile spiegazione della ridotta resistenza ossea nel diabete è l'accumulo di prodotti finali della glicosilazione avanzata (AGEs) nelle fibre di collagene ossee.

Gli AGEs si formano attraverso una serie di reazioni non enzimatiche tra il glucosio e le proteine e la formazione di questi composti può influenzare l'integrità e la funzionalità delle proteine.

In uno studio su cadaveri, Wang et al. (33) hanno riscontrato che una maggiore concentrazione di AGEs si associava ad una riduzione della resistenza ossea. Si è ipotizzato che gli AGEs possano direttamente alterare le proprietà fisiche del collagene (34) e studi in colture cellulari indicano che gli AGEs possano anche influire sul metabolismo delle cellule ossee. In questo modo è stato riportato che gli AGEs del collagene stimolano la produzione

di interleuchina-6 in cellule ossee umane (35), inibiscono la espressione fenotipica degli osteoblasti (36) ed incrementano il riassorbimento osseo indotto dagli osteoclasti (37).

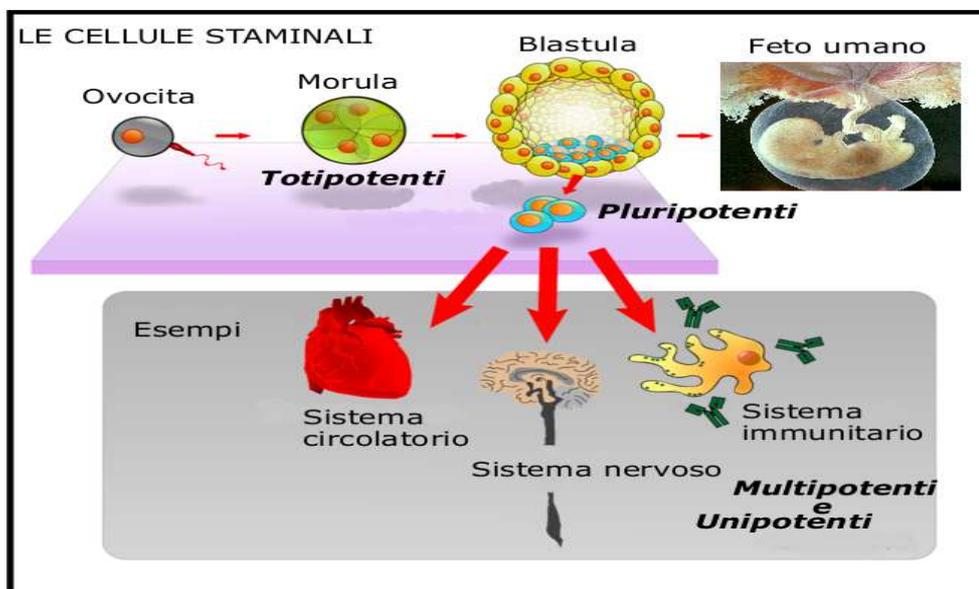
Non è del tutto chiaro se le terapie attualmente utilizzate per la osteoporosi, che hanno dimostrato una riduzione del rischio di fratture in popolazioni di anziani con ridotta DMO, saranno in grado di dimostrarsi altrettanto efficaci nella riduzione degli eventi fratturativi negli anziani diabetici di tipo 2, con DMO normale o aumentata. Nonostante ciò, ci sono evidenze iniziali che le terapie antiriassorbitive hanno un effetto simile a quello osservato nei soggetti non diabetici (38, 39), ed è stato suggerito di attuare queste terapie anche in presenza di una DMO normale in anziani diabetici che hanno avuto una frattura (40). Non è nemmeno del tutto chiaro se la terapia antidiabetica aggressiva e la riduzione delle complicanze diabetiche possono avere effetti sull'osso.

Capitolo 2

LE CELLULE STAMINALI

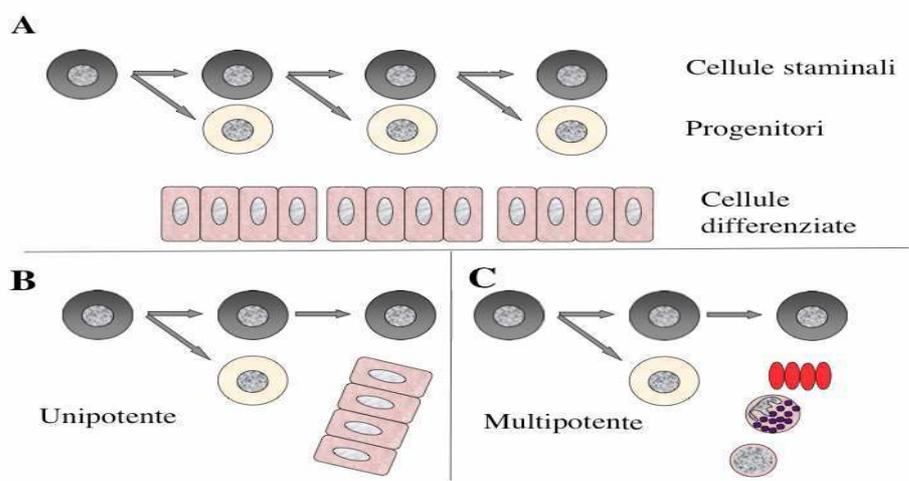
Durante l'embriogenesi, un singolo oocita fecondato è in grado di dare origine a un organismo pluricellulare, attraverso eventi di commitment, proliferazione e differenziazione che portano alla formazione di organi e tessuti diversi.

Dopo la nascita e per tutta la vita adulta, tutti i tessuti mantengono la loro omeostasi, sostituendo cellule che muoiono naturalmente o a causa di insulti esterni o patologici. La



capacità dell'embrione di creare tutti i tipi cellulari e la capacità di alcuni tessuti adulti di rigenerarsi nel corso della vita è dovuta alla presenza di cellule staminali (SC). Queste possiedono elevate capacità di autorinnovarsi, cioè di dividersi e ricreare altre cellule staminali identiche alla madre, ma anche di proliferare indefinitamente e differenziare in molteplici tipi cellulari seguendo specifici pathways molecolari.

A tutt'oggi non esiste ancora una definizione omnicomprensiva e puntuale delle cellule staminali. Con una buona dose di approssimazione si può definire una staminale come “una cellula che si divide (di solito raramente) dando origine a due cellule diverse tra loro: una cellula figlia è uguale alla cellula madre (staminale) mentre l'altra cellula figlia è diversa (progenitore) e, anche se può dividersi numerose volte, non può più farlo indefinitamente (perdita della staminalità) e prima o poi tutta la sua progenie differenzierà in un solo tipo (cellula staminale unipotente) o in diversi tipi (cellula staminale multipotente) di cellule differenziate” (Fig. 1)-



(Fig.2).

Figura 1

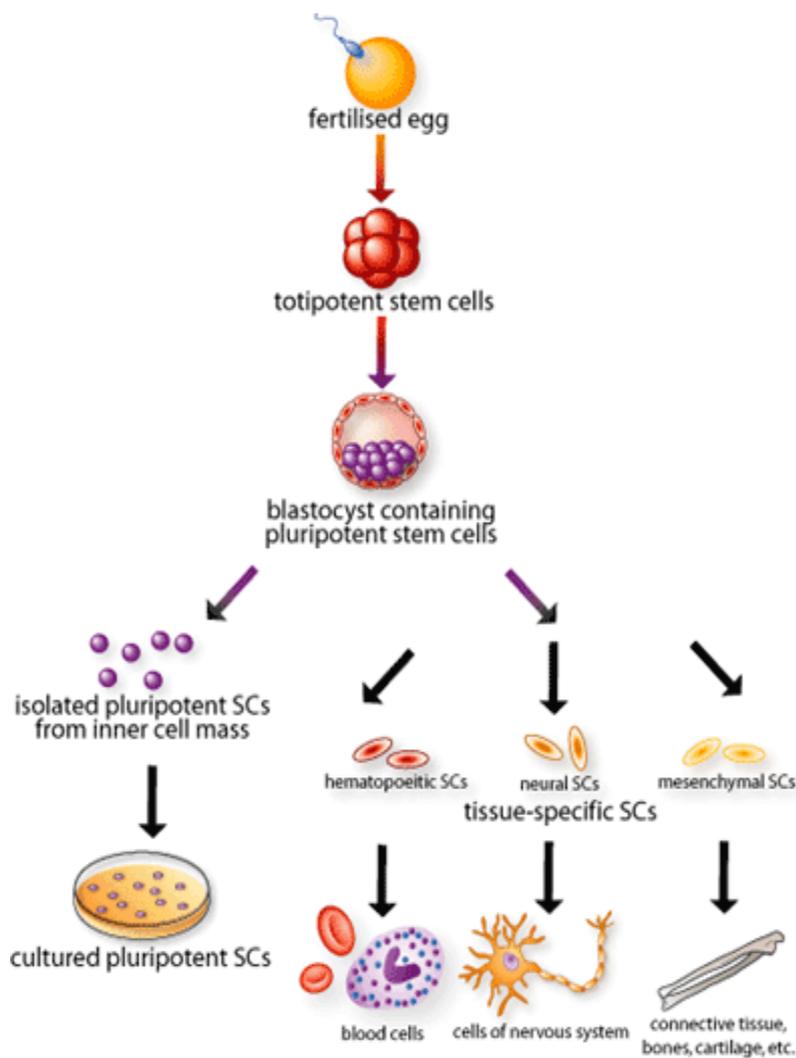
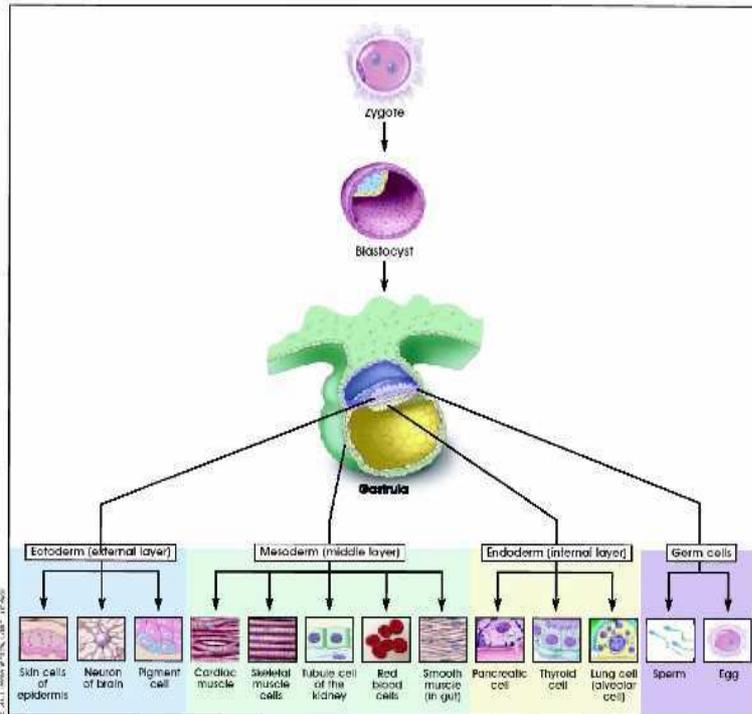


Figura 2

Mentre le cellule staminali dell’embrione sono totipotenti, cioè hanno conservato la capacità di differenziare in tutti i tessuti dell’animale, si ritiene che le cellule staminali dei tessuti adulti possiedano capacità differenziative limitate al tessuto in cui risiedono (41).

Tuttavia, questa teoria negli ultimi anni è stata messa in discussione da studi che indicano che alcuni tipi di cellule staminali adulte sono in grado di generare progenie tipica di altri tessuti, cioè sono dotate di plasticità (42). Sono molte le caratteristiche che permettono di correlare diversi tipi di cellule staminali, in riferimento, soprattutto, alle loro capacità di autoreplicazione, proliferazione e differenziazione .

Le cellule staminali embrionali derivano dalla blastocisti
Le cellule staminali adulte originano dopo la gastrulazione



2.1 LE CELLULE STAMINALI EMBRIONALI (ES)

Le cellule staminali embrionali derivano dalla massa cellulare interna della blastocisti dell'embrione dei mammiferi, prima dell'impianto nella parete uterina. Le cellule ES possono proliferare indefinitamente, mantenendo la loro pluripotenza, ma allo stesso tempo possono dare origine a tutte le cellule dei tre foglietti embrionali e differenziare in tutti i tipi cellulari dell'organismo adulto. Inoltre, possono essere isolate, stabilizzate e cresciute ex vivo, dove continuano a mantenere le loro elevate capacità autorinnovative, proliferative e differenziative. Le cellule ES murine sono state stabilizzate per la prima volta nel 1981, e si sono rivelate di estrema utilità sia per la generazione di topi mutanti,

sia per lo studio dei meccanismi che regolano lo sviluppo e la differenziazione tissutale (43; 44). Nel 1998 sono state generate cellule staminali pluripotenti anche a partire da blastocisti umane (45). Per mantenere le cellule ES in coltura nel loro stato relativamente indifferenziato, esse devono ricevere costitutivamente il segnale estrinseco di una citochina, il LIF (Leucemia Inhibitory Factor) (46), che agisce tramite il suo legame a un eterodimero costituito dal recettore per lo stesso LIF e dalla glicoproteina 130 (gp130) che attiva un segnale tramite il pathway molecolare di JAK/STAT, essenziale per il mantenimento della pluripotenzialità in vitro (47). In assenza di LIF, spontaneamente le cellule ES coltivate si aggregano formando i corpi embrioidi che differenziano, se esposti ad appropriati fattori di crescita, in diversi lineages cellulari, tra cui cellule muscolari cardiache pulsanti, isole sanguigne, neuroni, cellule endoteliali, cellule pigmentate, macrofagi, cellule epiteliali e adipociti (48; Dani et al., 1997; 50, 1997; Brustel et al., 1999) (Figura 1.2.1).

Similmente, se le cellule ES vengono iniettate in topi nudi, queste differenziano in masse multicellulari, definiti teratocarcinomi. Sebbene il programma di espressione genica di queste strutture somigli fortemente al pathway differenziativo tipico dello sviluppo degli animali, la crescita di queste strutture è caotica, e il risultato finale è un miscuglio di tessuti diversi (41). Questo illustra l'importanza delle interazioni intercellulari e della organizzazione cellulare nello sviluppo embrionale. Durante l'embriogenesi, infatti, la comunicazione intercellulare genera una trasmissione di segnali specifici tra una cellula e quelle che la circondano, alterando in qualche modo il comportamento di queste ultime. Il modo più comune di comunicare è l'utilizzo di segnali chimici, quali ormoni o citochine. E' quindi di importanza fondamentale studiare i meccanismi molecolari e biochimici che spingono le cellule ES ad adottare specifici destini differenziativi. Ad esempio, il gruppo di Brustel è stato in grado di isolare una popolazione pura di progenitori multipotenti che esprimono marcatori di precursori gliali. Aggregati murini di cellule ES sono stati coltivati e propagati in mezzo condizionato contenente prima soltanto il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF2), successivamente un mix di FGF2 e il fattore di crescita epidermico (EGF), e infine, un mix di FGF2 e il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF). In queste condizioni, le cellule potevano essere mantenute in coltura per più generazioni. Successivamente, le cellule sono state private dei fattori di crescita e queste si sono differenziate in oligodendrociti o astrociti (51). Per testare la loro reale potenzialità, questi

cloni cellulari sono stati trapiantati nel ventricolo di ratti con deficit di mielina: si è osservata la formazione di una guaina mielinica attorno agli assoni dell'ospite in diverse regioni del cervello, tra cui la corteccia, l'ippocampo e l'ipotalamo. Inoltre non si è avuto nessun segno di tessuti non neuronali in questi trapianti(51).

Non vi è nessun dubbio che le cellule ES siano le più flessibili tra tutte le cellule staminali ma il loro utilizzo a scopo terapeutico è oggetto di accesi dibattiti, soprattutto sulla base di considerazioni etiche.

Pertanto, molti sforzi sono diretti a trovare fonti alternative di cellule pluripotenti capaci di rigenerare organi e tessuti, in particolare cellule staminali adulte. Tuttavia le ES rappresentano un modello validissimo per comprendere i meccanismi dello sviluppo embrionale, della differenziazione tissutale e della patogenesi di numerose malattie.

2.2 LE CELLULE STAMINALI ADULTE

E' ormai appurato che, nell'età adulta, le cellule staminali sono presenti in quasi tutti i tessuti, inclusi la pelle (52), il sistema nervoso centrale (53), il muscolo scheletrico (54), il midollo osseo (55;56), il fegato (57), il pancreas, il polmone, la prostata, le ghiandole mammarie (Welm et al., 2002), il follicolo pilifero (59) e l'intestino (60).

Le cellule staminali adulte possiedono un'elevata capacità di self-renewal e possono al contempo dare origine a tipi di cellule mature con funzioni specializzate. Tipicamente esse generano intermedi cellulari (progenitori e precursori più differenziati) prima di raggiungere il loro pieno stato differenziato.

I progenitori e i precursori sono considerati come determinati a differenziare lungo uno specifico lineage cellulare. La funzione primaria delle SC adulte è di mantenere l'omeostasi interna all'organismo e, con alcune limitazioni, di sostituire le cellule danneggiate e morte a causa dell'invecchiamento, di disfunzioni o di danni. Il loro comportamento è fortemente influenzato dal microambiente tissutale da cui originano e risiedono (61).

Fino a poco tempo fa si pensava che le potenzialità differenziative delle cellule staminali adulte fossero tessuto-specifiche, tuttavia sempre più numerose scoperte scientifiche sembrano sfidare questo dogma classico, suggerendo che la capacità delle cellule staminali di generare una progenie matura non è limitata ai tipi cellulari presenti nel tessuto in cui risiedono, ma può essere sorprendentemente più estesa. Il fenomeno della plasticità è tuttora dibattuto e in attesa di definitive verifiche, tuttavia diverse ipotesi sono state avanzate per spiegarne i meccanismi di base. Fondamentalmente sono stati proposti quattro modelli (62): il modello gerarchico, la transdifferenziazione, la transdeterminazione e la dedifferenziazione.

- Il modello gerarchico prevede l'esistenza, all'interno dei diversi tessuti, di cellule staminali altamente pluripotenti non ancora indirizzate verso un determinato destino differenziativo e capaci, quindi, come le cellule staminali embrionali di dare origine a progenie di diversi tessuti. A questo proposito, è stata recentemente isolata dal midollo osseo umano e murino, dal muscolo e dal cervello una popolazione molto primitiva di cellule (MAPCs, Multipotent Adult Progenitor Cells) che sono in grado di dare origine, in vitro, a tutti i tipi cellulari somatici (63).

- La transdifferenziazione definisce la condizione (il processo attraverso il quale) in cui una cellula già differenziata acquisisce un altro fenotipo, spesso senza andare incontro alla divisione cellulare: un esempio sono le cellule pancreatiche che, in opportune condizioni di coltura, transdifferenziano in vitro in cellule epatiche (64), mentre analisi in vivo effettuate sulla salamandra mostrano le cellule epiteliali della lente transdifferenziare in cellule pigmentate della retina (65).
- La transdeterminazione descrive invece la condizione in cui una cellula staminale o un precursore primitivo già indirizzati verso uno specifico cammino differenziativo generano una progenie appartenente ad un altro lineage cellulare. In letteratura sono riportati dati sperimentali a favore di questo modello: per esempio è stato osservato che cellule staminali neurali in coltura sono in grado, se trapiantate nelle blastocisti di embrioni murini, di contribuire alla generazione di tutti e tre i foglietti embrionali (66).
- Nella dedifferenziazione, una cellula lineage-specifica riacquisisce dapprima le proprietà di cellula staminale o di precursore primitivo e, in seguito, intraprende un altro cammino differenziativo. Per esempio, in seguito all'amputazione di un arto nella salamandra, i miociti presenti localmente sono in grado di de-differenziare e generare altri tipi cellulari (67); così nei follicoli piliferi del topo, parte delle cellule che migrano fuori dal microambiente recuperano le capacità "staminali" dell'autorinnovamento ed acquisiscono altre potenzialità differenziative (68).

Le prime evidenze a favore della plasticità delle cellule staminali adulte sono emerse dallo studio sul sistema ematopoietico, attraverso saggi funzionali in vivo che sfruttano la proprietà clonogenica delle cellule ematopoietiche immature: è stato infatti osservato che cellule di midollo trapiantate in animali mutanti difettivi o mieloablati, genotipicamente o fenotipicamente distinguibili, sono in grado di dare origine a progenie "atipica" e rigenerare, anche se ad una frequenza piuttosto bassa, altri tessuti. A tale proposito, una delle prime dimostrazioni delle capacità plastiche delle HSCs è stata ottenuta trapiantando in animali recipienti wild type cellule di midollo osseo di un topo trasgenico contenente il costrutto LacZ sotto il controllo di un promotore muscolo-specifico; dopo alcuni mesi dal trapianto è stato osservato che, in seguito ad una lesione muscolare indotta, un significativo numero di cellule LacZ⁺ avevano contribuito alla rigenerazione del tessuto muscolare scheletrico (69). Questo risultato è stato successivamente consolidato da altri esperimenti condotti in vivo su modelli murini affetti da particolari distrofie, in cui cellule di midollo erano in grado di

recuperare parzialmente il fenotipo wild type, mostrando le elevate potenzialità miogeniche delle HSCs (70)

A queste prime osservazioni, si sono aggiunte, negli anni più recenti, innumerevoli dati sperimentali che sembrano attribuire alle HSCs capacità differenziative sempre più ampie: saggi funzionali in vivo ed in vitro suggeriscono che le cellule di midollo osseo adulto siano in grado di dare origine a cellule mature di tessuti non ematopoietici, quali fegato (71;72), pancreas (73) e dei reni (74), pelle (75) tratto gastro-intestinale (76), cuore (77,78), muscolo scheletrico (79) e sistema nervoso (80).

Sebbene le evidenze sperimentali siano sempre più confortanti, il tema della plasticità delle cellule staminali continua ad essere argomento di acceso dibattito; molte perplessità nascono dal fatto che le tecniche in vivo ed in vitro fino ad oggi adottate non sono in grado di fornire una prova certa delle loro effettive potenzialità differenziative e, molto spesso, i dati ottenuti non sono riproducibili. Infatti, negli ultimi due anni, studi sempre più rigorosi hanno messo in evidenza che alcuni apparenti eventi di plasticità sono in realtà riconducibili ad altri fenomeni, quali la contaminazione o la fusione cellulare. In particolare, dal momento che le cellule staminali ematopoietiche sono in grado di migrare, attraverso la circolazione, in tutto l'organismo (81) è possibile che l'osservata trasdifferenziazione verso il destino ematopoietico di cellule di un determinato tessuto non ematopoietico non sia determinata dalla loro plasticità ma dalla presenza, nel tessuto stesso, di HSCs che ivi transitano (82).

D'altra parte, la bassa frequenza con la quale si verificano gli eventi di trasdifferenziazione ha sollevato la possibilità che si tratti di eventi stocastici non-fisiologici e, a favore di questa ipotesi, alcune evidenze sperimentali suggeriscono che la fusione cellulare possa essere un'alternativa per alcuni casi di osservata plasticità (83). Infatti questa rappresenta un naturale processo biologico che contribuisce alla formazione di diversi tessuti nell'organismo, quali la formazione dei miotubi (84), degli osteoclasti (85), della placenta (86) e dalle cellule giganti derivanti dai macrofagi (87), e si protrae per tutta la vita, producendo cellule con distinte proprietà biologiche.

Recenti esperimenti condotti su modelli murini affetti da tirosinemia ereditaria di tipo I hanno permesso di dimostrare che la fusione cellulare interviene anche nella riparazione dei tessuti adulti (83;88): questi animali presentano, a seguito di una mutazione del gene Fah (Fumaril- acetoacetato-Idrolasi), un difetto al fegato curabile attraverso un trapianto di cellule wild type di midollo osseo, le quali sono in grado di rigenerare cellule epatiche

esprimenti Fah. Analisi citogenetiche, genomiche e immunoistochimiche indicano che questi nuovi epatociti non sono cellule ematopoietiche transdifferenziate ma il risultato della fusione di cellule di midollo osseo wild type del donatore con gli epatociti affetti del ricevente (83;88). Come per la plasticità, le osservazioni sperimentali a conferma (89;90) e a smentita (79a;91) del fenomeno della fusione sono numerose; lo sforzo dei ricercatori rimane, comunque, quella di effettuare analisi sempre più rigorose al fine di stabilire quale dei due processi giochi realmente un ruolo determinante nelle capacità differenziative delle cellule staminali nell'ambito dei diversi sistemi differenziativi.

2.3 LE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI (MSC)

Nel 1973, Friedenstein fu il primo a identificare una popolazione cellulare con un forte potenziale osteogenico in una sospensione a singole cellule prelevata dal midollo osseo adulto. Similmente, cellule osteogeniche sono state isolate dal timo e dalla milza di coniglio e maiale nano. Successivamente a questi lavori pionieristici, molti gruppi di ricerca hanno recentemente isolato cellule staminali/progenitori mesenchimali da molti tessuti adulti, quali muscolo scheletrico, tessuto adiposo, pelle e retina (92;93;94;95; Asakura et al., 2001). Lo stroma del midollo osseo è composto da una varietà di tipi cellulari essenziali per lo sviluppo delle cellule ematopoietiche e produce una vasta gamma di mediatori chimici necessari per il corretto processo di formazione delle cellule del sangue (97).

E' noto da diversi anni che le MSC del midollo osseo sono in grado di differenziare in vitro, sotto opportune condizioni, in diversi tipi cellulari quali osteoblasti, adipociti, condrociti e miociti.

Le metodologie per isolare e coltivare le MSC sono molteplici, uno dei metodi più diffusi è quello di sfruttare le loro caratteristiche di adesione per separarle dalla componente ematopoietica del midollo, che cresce in sospensione. A tale scopo si utilizza un terreno di coltura minimo, privo cioè di citochine, che facilita la crescita delle unità formanti colonie di tipo fibroblastoide (CFU-F).

Queste ultime possono anche essere propagate per molti passaggi fino a diventare linee cellulari (98).

Le cellule così ottenute possono essere differenziate, sotto specifici stimoli chimici in (fig..A):

- osteoblasti: con acido ascorbico, dexametasone e β -glicerofosfato;
- adipociti: con insulina e dexametasone;
- condrociti: con TGF β (Transforming growth factor) (99).

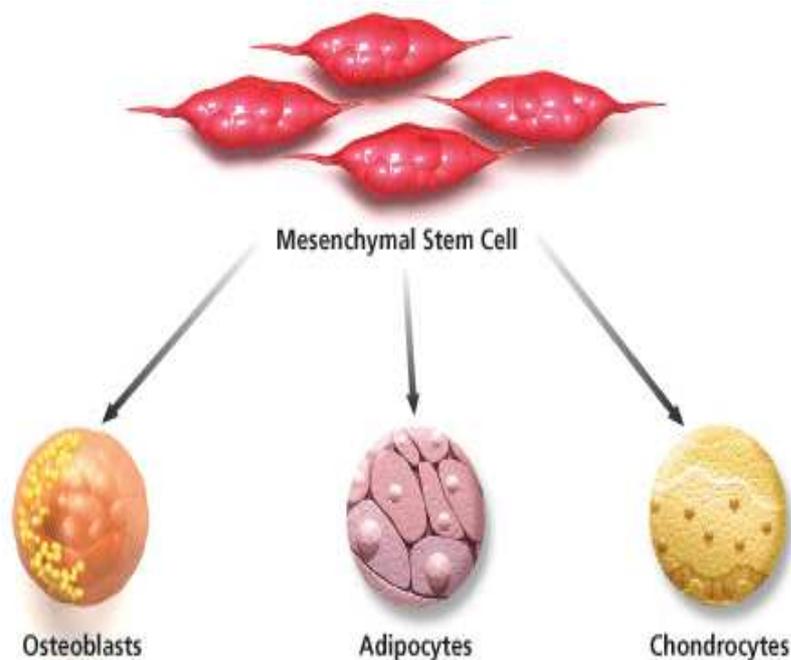


Fig.. A

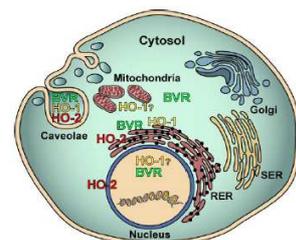
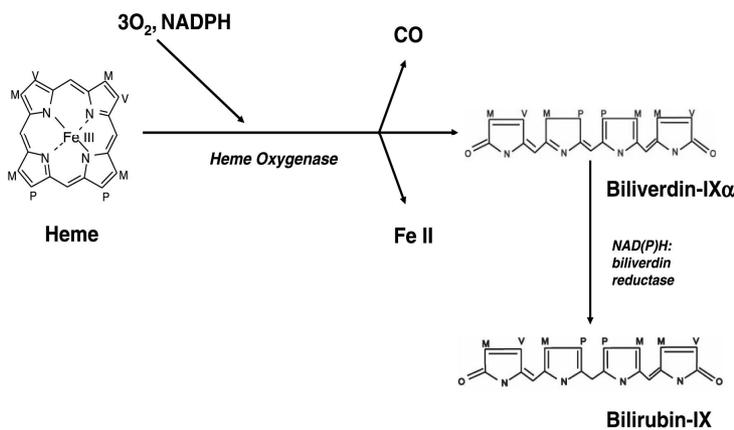
Un approccio alternativo è basato sull'isolamento di una popolazione di precursori utilizzando marcatori sulla superficie cellulare (Pittenger et al., 1999). Ad esempio, alcuni recenti studi indicano che le MSC prelevate da midollo osseo umano possono essere selezionate in base all'espressione di CD49a, recettore per collagene e laminina (101). Questa popolazione è CD49a+ CD45^{med/low} e differenzia verso un lineage mesodermico. tutte le CFU-F coltivate a partire da midollo osseo umano in toto sembrano essere CD49a+ CD45^{med/low}. Poiché le MSC sembrano essere multipotenti e coltivabili in vitro, potrebbero rappresentare una risorsa molto importante di cellule utilizzabili nella clinica, per approcci di terapia e genica (102).

CAPITOLO 3

L'EME OSSIGENASI

L'eme ossigenasi (HO) è un'enzima microsomiale che catalizza l'apertura regiospecifica dell'anello dell'eme con formazione di biliverdina, ferro e monossido di carbonio (CO). La reazione necessita di ossigeno molecolare e di equivalenti riducenti forniti dalla NADPH-citocromo P₄₅₀ reduttasi.

Eme ossigenasi 1 (HO-1)



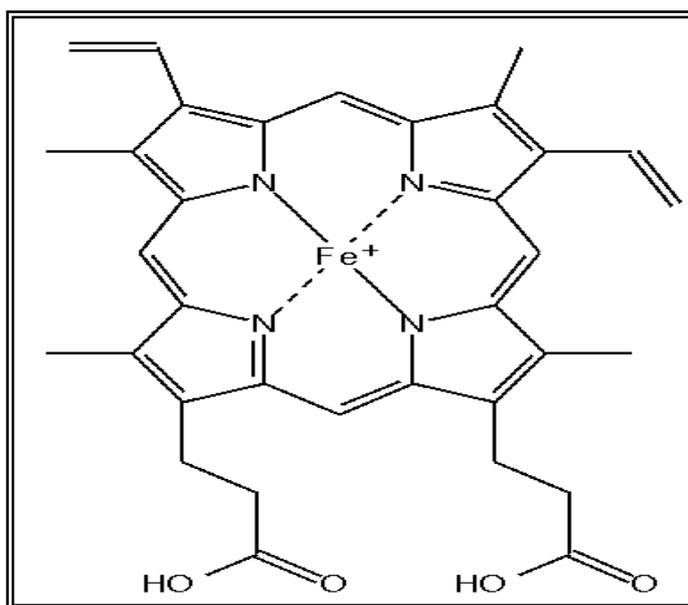
L'HO fu descritto per la prima volta nel 1968 da Tenhunen et coll., (103) ; inizialmente si pensò che la proteina potesse essere un tipo di citocromo P₄₅₀, successivamente fu dimostrato che in realtà si trattava di una proteina diversa da quelle appartenenti alla famiglia dei P₄₅₀ (104).

È stato dimostrato che l'HO è una proteina altamente conservata nel regno animale ed inoltre è presente nelle alghe ed in quasi tutte le specie di piante superiori (104a).

Inizialmente fu purificata in omogenati di fegato di ratto, milza di bovino e maiale e fu dimostrato che aveva un peso molecolare di 32.000 dalton (105).

L'eme ossigenasi presenta un rapporto stechiometrico 1:1 con l'eme, che gli permette di formare un eme-proteina transiente.

Il posizionamento dell'eme con la molecola dell'HO è simile a quella dell'anello tetrapirrolico dell'eme, può solo essere aperta nella posizione α -meso (106). L'utilizzo di tecniche spettroscopiche in due diversi laboratori ha dimostrato che il legame dell'eme che circonda l'HO è simile a quello della mioglobina e che il sesto legame di coordinazione di metà molecola dell'eme è stabilito con un istidina complessata, che è essenziale nello svolgere la funzione di ponte con una molecola d'acqua (Takahashi et coll., 1993).



La molecola dell'EME è un complesso dell'elemento di transizione, ferro, legato a quattro atomi di idrogeno di un macroanello tetrapirrolico.

Esso è sempre presente in natura e di vitale importanza negli Eucarioti; funziona come porzione prostetica di varie eme-proteine che includono: emoglobina e mioglobina, rispettivamente, per il trasporto e l'accumulo dell'ossigeno.

In più, nel sistema nervoso (SN), l'eme stimola lo sviluppo dei neuriti e regola l'inizio e la sintesi proteica dell'eIF-2a chinasi; nel midollo osseo rappresenta un fattore essenziale per lo sviluppo e la differenziazione delle cellule ematopoietiche.

Oltre al midollo osseo che è eritropoietico, anche il fegato ha un notevole bisogno di eme; infatti, circa il 15% del totale di esso è utilizzato da quest'organo.

La biosintesi dell'eme, che è catalizzata contemporaneamente da enzimi mitocondriali e microsomiali, contiene una sequenza di reazioni che include la condensazione, seguita dalla decarbossilazione, da una seconda condensazione e successivamente da una serie di ossidazioni (106a;108).

La biliverdina che si forma nella reazione catalizzata dall'HO nei Mammiferi viene in seguito convertita in bilirubina dall'enzima citosolico biliverdina reduttasi; e quest'ultima, a sua volta, viene coniugata con zuccheri (acido glucuronico) per mezzo dell'UDP-glucuronil transferasi e viene escreta nella bile.

Diversi studi hanno dimostrato che la biliverdina rappresenta un importante antiossidante, nonostante quest'ultima venga immediatamente convertita in bilirubina ad opera della *biliverdina reduttasi*. Un tipico esempio di questa reazione enzimatica è rappresentato dall'ematoma, come risultato di un trauma. In queste condizioni, l'eme viene rilasciato dando il tipico colore nerastro che, successivamente, diventa verde per la concomitante formazione della biliverdina ad opera dell'HO ed, infine, diventa giallo per la presenza dei pigmenti di bilirubina. Quest'ultima è particolarmente tossica quando si accumula in concentrazioni micromolari

nel cervello e tende ad aggregarsi ed ad attaccarsi alle membrane cellulari, come si osserva nelle zone giallastre del cervello (*kernicterus*). Anche nelle colture neuronali, la bilirubina libera, a concentrazioni micromolari e non complessata a *carriers* proteici (es: albumina, che tiene in soluzione la bilirubina) ha la tendenza ad aggregarsi e ad attaccarsi alle membrane cellulari, conferendo un aspetto giallastro alle cellule (109). Gli aggregati di bilirubina incorporati nelle membrane cellulari sembra che interferiscano con le funzioni vitali della cellula. Comunque, quando essa è in soluzione ed è utilizzata a concentrazioni fisiologiche, esplica una funzione di protezione contro lo stress ossidativo.

E' stato dimostrato in modelli animali con ischemia cardiaca che la perfusione di bilirubina era capace di ridurre significativamente il danno da infarto (110). Studi clinici

hanno dimostrato che elevati livelli di bilirubina nel plasma sono correlati con una riduzione di incidenza dei rischi cardiovascolari. Bassi livelli di bilirubina, invece, sono associati ad un maggiore rischio di malattie cardiovascolari (111). E' stato dimostrato che l'attività della *biliverdina reduttasi* è modulata dalla fosforilazione ed è stato osservato che è localizzata nel nucleo, dove, probabilmente, esplica un ruolo protettivo nei confronti degli acidi nucleici contro l'azione tossica espletata dai radicali liberi. A tal proposito, studi *in vitro* hanno messo in evidenza che la bilirubina è in grado di limitare il danno al DNA (112).

Peraltro, il ferro libero formatosi dalla reazione catalizzata dall'HO, essendo un pro-ossidante, viene rapidamente neutralizzato da alcune proteine leganti il ferro (*Iron Binding Proteins*), come la ferritina, che legandolo impedisce che esso possa partecipare a reazioni di tipo Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^- + \text{HO}\cdot$).

Il ferro, dal momento che l'HO è maggiormente concentrato nel reticolo endoplasmico, può essere immediatamente trasportato all'esterno della cellula attraverso una pompa *ATPasi-dipendente* che funge da trasportatore del ferro (113). Diverse proteine (ferritina, ceruloplasmina, transferrina) possono legare il ferro, attenuando quindi la tossicità del ferro libero, la cui omeostasi è strettamente regolata da numerosi fattori (114).

Modificazioni dell'attività enzimatica dell'HO sono state riscontrate nei cervelli di pazienti affetti dalla malattia di Alzhèimer con una conseguente modificazione dei contenuti di ferro.

Infatti, già nel 1953, mediante tecniche citochimiche, fu dimostrato che i contenuti di ferro risultavano elevati nella corteccia dei pazienti affetti dalla malattia di Alzhèimer.

In uno studio parallelo, che si proponeva di dimostrare se la riduzione del ferro potesse essere una strategia da utilizzare per questa patologia, è stato dimostrato che la somministrazione per 2 anni di desferrossamina, un ben noto chelante del ferro trivalente, rallentava la progressione clinica dei sintomi della malattia.

Un altro prodotto della reazione catalizzata dall'HO è il CO, un gas che può liberamente passare attraverso i compartimenti intracellulari ed extracellulari. La letteratura, riguardo le possibili funzioni del CO, è particolarmente vasta e controversa e molti aspetti non sono stati ancora del tutto chiariti (115;116;117).

E' stato evidenziato che il CO ed i pigmenti biliari, hanno importanti funzioni regolatorie all'interno della cellula. Il CO generato, alle alte concentrazioni, risulta tossico, ma in

condizioni fisiologiche esso gioca un ruolo essenziale nei processi di vasodilatazione e nella modulazione dell'attività della *guanilato ciclasi*, stimolando conseguentemente la sintesi di un secondo messaggero: il *cGMP*. Il CO è particolarmente tossico e l'inalazione di sue alte concentrazioni può causare la morte. Parte di questi effetti tossici derivano dal fatto che esso satura l'emoglobina e fa diminuire l'efficacia del trasporto di ossigeno. E' stato, inoltre, ipotizzato che il CO possa competere con i siti di legame dell'ossido nitrico (NO) che si trovano sulle proteine e conseguentemente potrebbe elevare i livelli di NO (118). L'affinità delle proteine per il CO è generalmente più bassa che per l'NO, ma la sua emivita è elevata. Le interazioni tra CO e NO starebbero alla base di un *cross-talk* tra il sistema dell'HO e dell'*ossido nitrico sintetasi* (NOS) (119). A livello cellulare il CO potrebbe avere funzioni fisiologiche diverse da quelle derivanti da dosi farmacologiche o tossiche.

Inoltre, potrebbe agire da vasodilatatore sia modulando l'attività della *guanilato ciclasi*, che l'apertura dei canali del potassio attivati dagli ioni calcio (120;121). Il CO potrebbe anche agire da anti-infiammatorio ed avere anche attività anti-apoptica (122;123).

3.1 ISOFORME DELL'EME OSSIGENASI

Esistono diverse isoforme dell'HO, tutte prodotte da geni diversi. Due di queste isoforme sono state ampiamente caratterizzate. Esse sono: l'HO-1, isoforma inducibile, e l'HO-2, che è sintetizzata costitutivamente. Entrambe le isoforme hanno in comune circa il 40% di sequenze aminoacidiche omologhe (Muller et coll., 1987). McCoubrey and Maines (1994)(125,126) dimostrarono che l'HO-1 era il prodotto di un solo trascritto, mentre l'HO-2 era codificata da due trascritti di un gene. Questi differenti trascritti presentano una differenza durante il processo di poliadenilazione.

HO-1	HO-2
<ul style="list-style-type: none">— Inducibile— Ha molti siti di regolazione— È indotta da: UVA, metalli pesanti, stress ossidativo infiammazione	<ul style="list-style-type: none">— Costitutiva— È indotta dai glucocorticoidi

Tab. 1 - Isoforme dell'eme ossigenasi

L'HO-1 è una proteina di 32 KDa ed è stata originariamente trovata nella milza dove la sua principale funzione è quella di degradare l'eme dei globuli rossi invecchiati (127). I geni dell'HO-1, sono stati clonati e caratterizzati, sia nel ratto, che nell'uomo (Muller et coll., 1987;127a). Entrambi i geni sono organizzati in quattro introni e cinque esoni. La regione 5' non tradotta dei geni contiene numerosi siti regolatori (Fig. 1)

-506	GCAGTCAGCA	GAGGATTECA	GCAGGTGACA	TTTTAGGGAG	CTGGAGACAG	CAGAGCCTGG	GGTTGCTAAG
-436	TTCCTGATGT	TGCCACCAG	GCTATTGCTC	TGAGCAGCGC	TGCCTCCCAG	CTTCTGGAA	CCTCTGGGA HSE
-366	CGCCTGGGT	GCATCAAGTC	CCAAGGGGAC	AGGGAGCAGA	AGGGGGGGCT	CTGGAAGGAG	CAAAATCACA
-296	CCCAGAGCCT	GCAGCTTCTC	AGATTTCCTT	AAAGGTTTIG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTA poly [dG-dT]
-226	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	TTCTCTAAAA	GTCCTATGGC	CAGACTTGTG	TTCCCAAGGG NF- κ B
-156	ICATATGACT	GCTCCTCTCC	ACCCACACT	GGCCCCGGCC	GGGCTGGGCG	CGGGCCCTG	CGGGGTGTGC AP-2
-86	AAAGCCCGGC	CAGAAAGTGG	GCATCAGCTG	TCCGCCTGG	CCCACGTGAC	CCGCCGAGCA	TAAATGTGAC USF TATA box
-16	CGGCCGCGGC	TCCGGCAGTC	AACGCCTGCC	TCCTCTCGAG			

-1
Exon 1

Fig. 1 – Siti regolatori presentinel gene dell’HO-1

La seconda isoforma (HO-2) ha un peso molecolare di 38 KDa (127a) ed è particolarmente abbondante nel Sistema Nervoso e nei testicoli (117a). L’HO-2 è costitutivamente espressa nei neuroni e viene anche chiamata *HO costitutiva o neuronale*. In condizioni normali, nel cervello è responsabile per la maggior parte dell’attività totale dell’HO. Il gene che codifica per l’HO-2 di ratto (125a,127b) consiste di 12563 bp, cinque esoni e quattro introni e non ha un TATA-box standard, ma presenta una “TATA-like” avente sequenza TAACTA, a monte del maggior punto di inizio della trascrizione. L’HO-2 è decodificata in due trascritti rispettivamente di 1,3 e 1,9 Kb, che condividono con l’HO-1 solo il 50-57% di somiglianza in due esoni. Il dominio di legame dell’HO-2 all’eme è l’esone 4.

3.2 FUNZIONE E REGOLAZIONE DELL’EME OSSIGENASI-1

Le proprietà benefiche dell’HO-1 sono stati descritti in diverse patologie, come l’aterosclerosi e la pre-clampsia. La funzione antiossidante dell’HO-1 potrebbe, almeno in parte, dipendere dalla impossibilità dell’eme a partecipare alle reazioni pro-ossidanti

(128). Il maggior interesse, comunque, è riposto nei prodotti di degradazione enzimatica dell'eme, i quali fungono da mediatori della citoprotezione. Alcuni studi hanno anche dimostrato che l'induzione del HO-1 in fibroblasti della pelle espleta un ruolo protettivo contro i raggi ultravioletti (129).

L'HO-1 è indotta da stimoli diversi che sono in grado di provocare uno stress ossidativo; questi includono: *eme*, *iperossia*, *ipossia*, *heat shock*, endotossine, perossido d'idrogeno, citochine, raggi UV, metalli pesanti ed NO (130; 131; 132;133;134;135;136; 137). Molte cellule in coltura, incluse quelle emopoietiche, epatiche, epiteliali, endoteliali, retiniche pigmentate, rispondono agli agenti stressanti precedentemente menzionati, con marcato incremento dell'attività dell'HO-1. Infatti, essendo l'HO una Heat-Shock Protein (HSP), agisce da proteina dello stress e può essere indotta anche dal danno di tipo ossidativo (138;139;127c;128a;140; 141; Kutty et coll., 1994;143; AL Nascimento et coll., 1993). E' stato dimostrato che l'espressione dell'HO-1 è principalmente regolata a livello trascrizionale (145;146;147;148; 149).

Sono stati identificati vari elementi regolatori nella regione promotore del gene che codifica per l'HO-1; essi includono i siti di legame per fattori di trascrizione responsabili dello stress ossidativo come, ad esempio, il fattore di trascrizione nucleare kappa B (NF-KB), il cui sito di legame è presente nel gene umano dell'HO-1, ed il fattore di trascrizione AP-1 (150;151;146a).

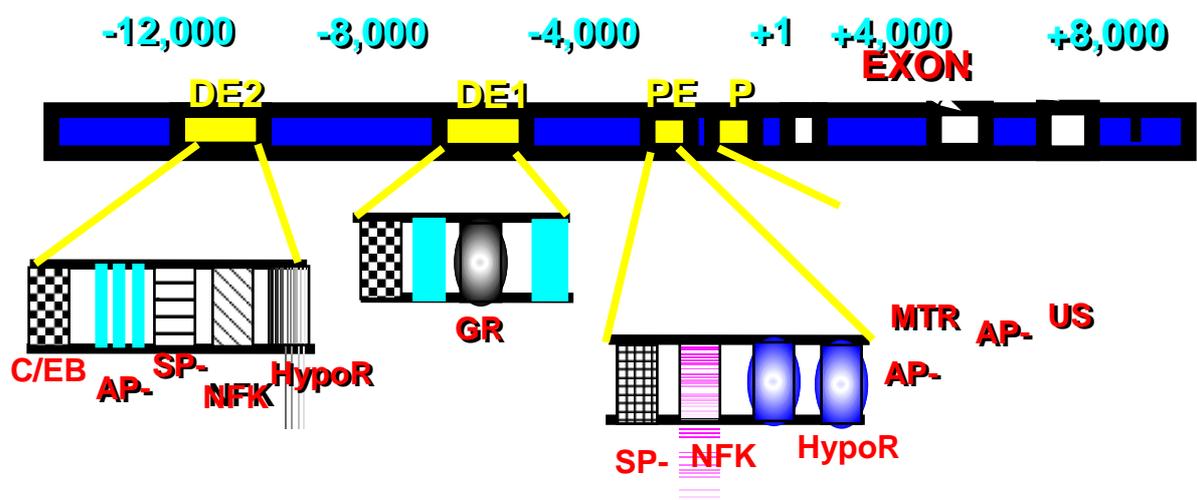


Fig. 2 - Siti di legame per alcuni fattori di trascrizione (NF KB, AP-1) presenti nel gene umano dell'HO-1.

Capitolo 4

SCOPO DELLA TESI

E' stato dimostrato che la densità minerale e altri markers biochimici del tessuto osseo variano in pazienti affetti da diabete. Studi recenti hanno suggerito che il diabete per se può aumentare il rischio di fratture femorali, omerali e del piede negli anziani (152-157) e ricerche in animali da esperimento diabetici hanno evidenziato delle alterazioni nella conformazione ossea che si sono ipotizzato come possibile fattori favorenti del rischio di fratture. Nonostante ciò, questo è un argomento ancora non del tutto chiaro ed è necessaria una conoscenza più approfondita dei fattori che determinano la qualità dell'osso nel diabete per attuare una prevenzione efficace delle fratture in questa popolazione ad alto rischio.

Diversi meccanismi sono stati proposti per spiegare le possibili influenze del diabete sul tessuto osseo. I livelli bassi di insulina nel diabete di tipo 1 e nel diabete di tipo 2 di lunga durata possono causare una riduzione della densità minerale ossea (DMO) (158). D'altra parte, i diabetici di tipo 2 sono frequentemente obesi e l'obesità si associa di solito ad una normale o elevata DMO (159) probabilmente attraverso l'aumento del carico e attraverso fattori ormonali come gli estrogeni, l'insulina, la leptina e l'adiponectina (159-161). La ridotta massa ossea frequentemente riscontrata in pazienti con diabete mellito è stata attribuita al mancato controllo della glicemia, ma il meccanismo con il quale esso agisce rimane poco chiaro.

Recentemente uno studio svolto *in vivo* su topi obesi diabetici ha dimostrato che il trattamento con un induttore dell'eme ossigenasi 1 (HO-1) riduce l'adipogenesi viscerale e sottocutanea, aumenta i livelli di adiponectina e migliora la sensibilità dell'insulina e la tolleranza del glucosio (162).

L'eme ossigenasi (HO) è una proteina enzimatica citoprotettiva ed antinfiammatoria che degrada l'eme producendo biliverdina e bilirubina, entrambe aventi attività antiossidanti,

rilasciando anche ferro e monossido di carbonio. Quest'ultimo è un potente vasodilatatore e un importante mediatore di molte attività cellulari. E' stato dimostrato che la forma inducibile dell'eme ossigenasi (HO-1) ha proprietà antiossidanti e che il trattamento con CO esogeno riduce la produzione di diverse citochine e il monossido nitrico (NO) in risposta ai processi infiammatori. L'Eme ossigenasi 1 quindi potrebbe giocare un importante ruolo durante il differenziamento, inoltre l'eme ossigenasi 1 nel diabete ed in altre patologie è un area di ricerca di attuale interesse per la comunità scientifica internazionale (162-164).

Pochi studi in vitro sono stati effettuati usando cellule progenitrici del tessuto osseo per investigare questo problema.

Lo stroma del midollo osseo è ricco di cellule staminali adulte, la funzione primaria delle SC adulte è di mantenere l'omeostasi interna all'organismo e, con alcune limitazioni, di sostituire le cellule danneggiate e morte a causa dell'invecchiamento, di disfunzioni o di danni. Tipicamente esse generano intermedi cellulari (progenitori e precursori più differenziati) prima di raggiungere il loro pieno stato differenziato. Le cellule staminali adulte presenti nel midollo osseo possono essere classificate in base al tipo di progenie che generano in cellule staminali ematopoietiche (HSC) e cellule staminali mesenchimali (MSC). Mentre le prime daranno origine alle cellule del sangue, le MSC sono i progenitori dei tessuti di origine mesenchimale come cartilagine, tessuto osseo, etc. (166).

E' stato dimostrato che le BM MSCs hanno la capacità di differenziarsi in vitro, sotto opportune condizioni, in osteoblasti, adipociti, condrociti e miociti (167,168). Le metodologie per isolare e coltivare le MSC sono molteplici, uno dei metodi più diffusi è quello di sfruttare le loro caratteristiche di adesione per separarle dalla componente ematopoietica del midollo, che cresce in sospensione. A tale scopo si utilizza un terreno di coltura minimo, privo cioè di citochine, che facilita la crescita delle unità formanti colonie di tipo fibroblastoide (CFU-F). Queste ultime possono anche essere propagate per molti passaggi fino a diventare linee cellulari (trattato in Zipoli, 2004).

In conclusione il seguente studio si propone di studiare l'effetto dell'iperglicemia nel differenziamento di cellule staminali mesenchimali provenienti dal midollo osseo in osteoblasti e di valutare l'eventuale ruolo svolto da parte dell'eme ossigenasi 1 sullo stress provocato dall'alta concentrazione di glucosio.

Capitolo 5

MATERIALI E METODI

Colture di MSC

Campioni di midollo osseo sono stati ottenuti da pazienti sottoposti ad aspirato midollare a scopo diagnostico. La frazione di cellule mononucleate del midollo osseo è stata isolata mediante centrifugazione in gradiente di densità (Ficoll-Paque TM PLUS).

Le cellule mononucleate sono state coltivate in D-MEM + 2mM glutamax (GIBCO, UK) , 20% siero fetale bovino (FBS), 1X antibiotico-antimicotico (GIBCO, Carlsbad, CA) e incubate a 37 ° C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂. Le cellule non-aderenti sono state eliminate dopo 72 ore e le cellule aderenti sono state incubate in nuovo terreno di coltura per altri 4 giorni. Non appena le cellule hanno raggiunto la confluenza , esse sono state tripsinizzate. Le cellule sono state analizzate al citofluorimetro e trovate positive per gli antigeni CD13, CD29, CD44, CDw90, CD73 e CD105 e negative per i marcatori ematopoietici, come CD34 e CD45.

Protocolli sperimentali

Il differenziamento osteoblastico delle hMSCs è stato indotto mediante incubazione in un terreno di coltura contenente (OM): DMEM +10% FBS, 100 U / ml penicillina 100 mg / ml di streptomycin, 0,2 mM di acido ascorbico (Sigma), 0.1 microM desametasone (Sigma) e 10 mM β-glicerofosfato 10 FBS% e antibiotico-antimicotico (1X) . Il terreno è stato cambiato ogni 2 giorni (Nóvikof et al., 1980 ; Tondreau et al., 2005) ed alcune fiasche sono state trattate con 5 microM SnMP, 30 mM glucosio, 0,5 microM CoPP . Le cellule sono state raccolte dopo 7, 14 e 21 giorni di cultura, ed il cambiamento di morfologia delle

cellule in coltura durante la differenziazione osteoblastica è stata valutata mediante microscopia ottica. L'espressione di markers osteoblastici (BMP-2, RUNX-2, osteocalcina.) è stata misurata mediante immunofluorescenza, RT-PCR ed ELISA. HO-1 mRNA e l'espressione della proteina sono stati valutati anche durante il differenziamento osteoblastico delle MSCs a 7, 14 e 21 giorni, anche in presenza o in assenza di CoPP, SnMP e Glucosio 30 mM. Le cellule sono state testate per la loro suscettibilità alla elevata concentrazione di glucosio, infatti i ROS rilasciati sono stati misurati all'inizio e durante il differenziamento tramite tecnica di citofluorimetria.

Analisi di mineralizzazione di colture di cellule

La mineralizzazione è stata determinata attraverso la colorazione “alizarina Red S” (Sigma) delle colture a 21 giorni di differenziamento. Le colture sono state osservate in microscopia in contrasto di fase per verificare la presenza di noduli mineralizzati.

mRNA isolamento

L'RNA totale è stato isolato usando tryzol. La prima catena cDNA è stata sintetizzata con la trascrizione inversa (Roche). L'RNA totale (1 mg) è stato analizzato mediante RT-PCR quantitativa (Real Time PCR).

Real-time PCR quantificazione

L'analisi quantitativa del trascritto (QRT-PCR) è stata eseguita con il test di espressione genica TaqMan su un ABI Prism 7.900 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Un valore di 10 ng di cDNA è stato amplificato utilizzando il TaqMan Universal PCR Master (ID Hs01055564_m1 per uso umano BMP-2, ID Hs00231692_m1 per RUNX2, ID Hs00605917_m1 per adiponectina, ID Hs00157965_m1 per HO-1, GAPDH come controllo endogeno ; Applied Biosystems).

Western Blot

Le BM MSCs indifferenziate e dopo 7 – 14 – 21 giorni di differenziamento sono state raccolte in un tampone di lisi contenente Tris-HCl 50 mM, a pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, fenilmetilsulfonil fluoruro 0,1 mM ed una miscela di inibitori delle proteasi (10 µg/ml di aprotinina, leupeptina o pepstatina) e sonicate a 4°C.

Dopo centrifugazione per 15 minuti a 13.000 x g, le proteine presenti nel sovrantante ottenuto dalla centrifugazione sono state dosate con il reattivo di Bradford e portate alla concentrazione di 1 mg/ml mediante un tampone 2X contenente Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8, EGTA 5 mM, ditiotreitolo 25 mM, SDS 2%, e di glicerolo 10% in presenza di blu di bromofenolo.

Le proteine (30 µg) sono state separate su gel di poliacrilammide con SDS all'8,5% e trasferite su membrana di nitrocellulosa (Mini Trans-blot cell).

Queste ultime, una per ciascuna proteina da esaminare (HO-1, nestina e α -tubulina III) , sono state incubate per 12 ore a 4°C con soluzione di latte in polvere al 5% in Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,5%. Successivamente, le membrane di nitrocellulosa sono state incubate per 1 h con anticorpo monoclonale di topo contro HO-1, diluito 1:1000 in PBS, un anticorpo monoclonale di topo contro la β -actina (1:1000).

Dopo 3 lavaggi con PBS, le membrane sono state trattate con anticorpo policlonale anti-IgG di topo coniugato con perossidasi diluito 1:1000 in latte in polvere.

Entrambe le proteine sono state evidenziate in chemiluminescenza mediante il Kit ECL-Plus. L'analisi densitometrica delle lastre è stata effettuata utilizzando il programma Alphamager 1200 System (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA).

Rilevazione di ROS

La produzione di ROS da parte delle colture cellulari durante l'esperimento è stata valutata utilizzando probediidrodietidum fluorescente (DHE-SIGMA). In presenza di superossido (O₂⁻), DHE viene ossidato da prodotti fluorescenti, che sono stati monitorati mediante citometria a flusso (FC500 Beckman Coulter).

Brevemente, le cellule sono state incubate con 20 microM DHE nel terreno di coltura per 30 minuti a 37 ° C, e poi lavati, risospesi in PBS, e successivamente lette al citofluorimetro.

ELISA test

Utilizzando un test ELISA specifico, secondo le raccomandazioni del fabbricante, abbiamo valutato i livelli di proteina HO-1 (Tenore Design, CA) nei pellet cellulari, ed i livelli di osteocalcina(OCN) (BioSource International, Inc.), osteoprotegerina(OPG) e RANKL (recettore attivatore del fattore nucleare kB ligand) nel terreno di coltura.

Analisi Statistica

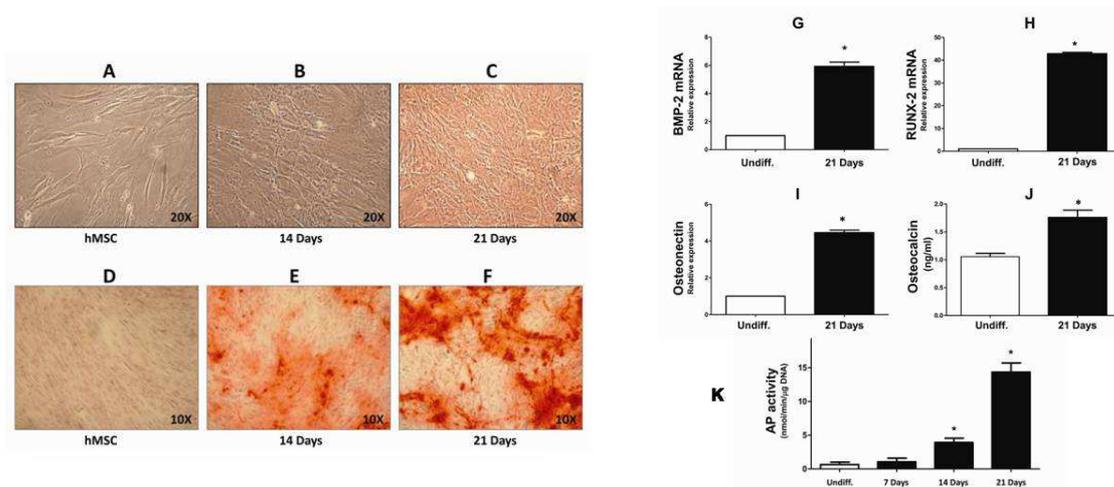
Le differenze tra i gruppi sono stati analizzati con il test t ed ANOVA. I valori sono stati espressi come media \pm SEM, e le differenze tra i gruppi sono stati considerati significativi per $P < 0,05$.

Capitolo 6

RISULTATI

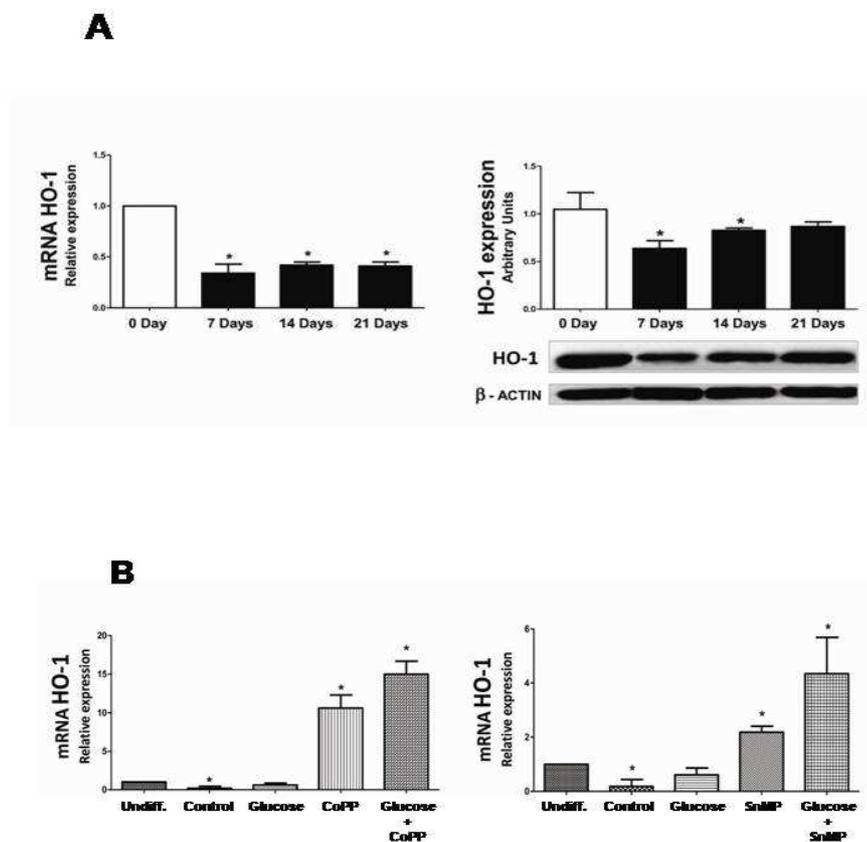
I dati ottenuti esprimono la possibilità di ottenere osteoblasti dalle BM MSCs, infatti come si può vedere dalla fig. 1, attraverso l'aggiunta nel medium di coltura di dexametasone, acido ascorbico e glicerofosfato è possibile ottenere osteoblasti dopo circa 21 giorni di incubazione. L'avvenuto differenziamento è stato confermato dall'espressione dei markers osteoblastici come BMP-2, RUNX-2, Osteonectina ed Osteocalcina (Fig.1G,H,I,J) analizzati tramite RT-PCR ed ELISA test. Nella fig 1 si può vedere il graduale incremento dell'espressione dei suddetti markers dopo 21 giorni di differenziamento. Inoltre il differenziamento osteoblastico è ulteriormente confermato dall'attività dell'alcalino fosfatasi (ALP) (fig.1K) e dalla ALIZARINA RED STAIN (fig. 1D,E,F), colorazione che mette in risalto i fosfati di calcio formatisi durante il differenziamento.

Figura 1



L'espressione dell'eme ossigenasi 1, analizzata tramite Real Time PCR e Western Blot, mostra un graduale decremento dell'enzima durante il differenziamento in osteoblasti (Fig. 2A) e inoltre dalla fig.2B si può notare come il CoPP 2 uM (Cobalto proto-porfirina) sia in grado d'indurre l'enzima durante il differenziamento.

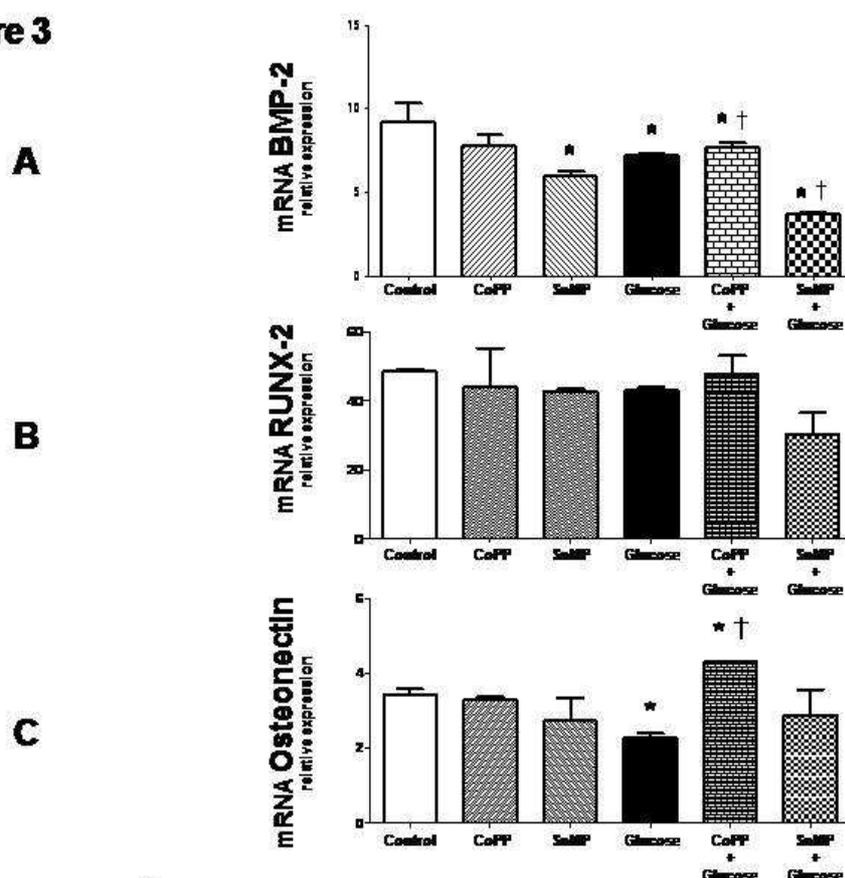
Figura 2



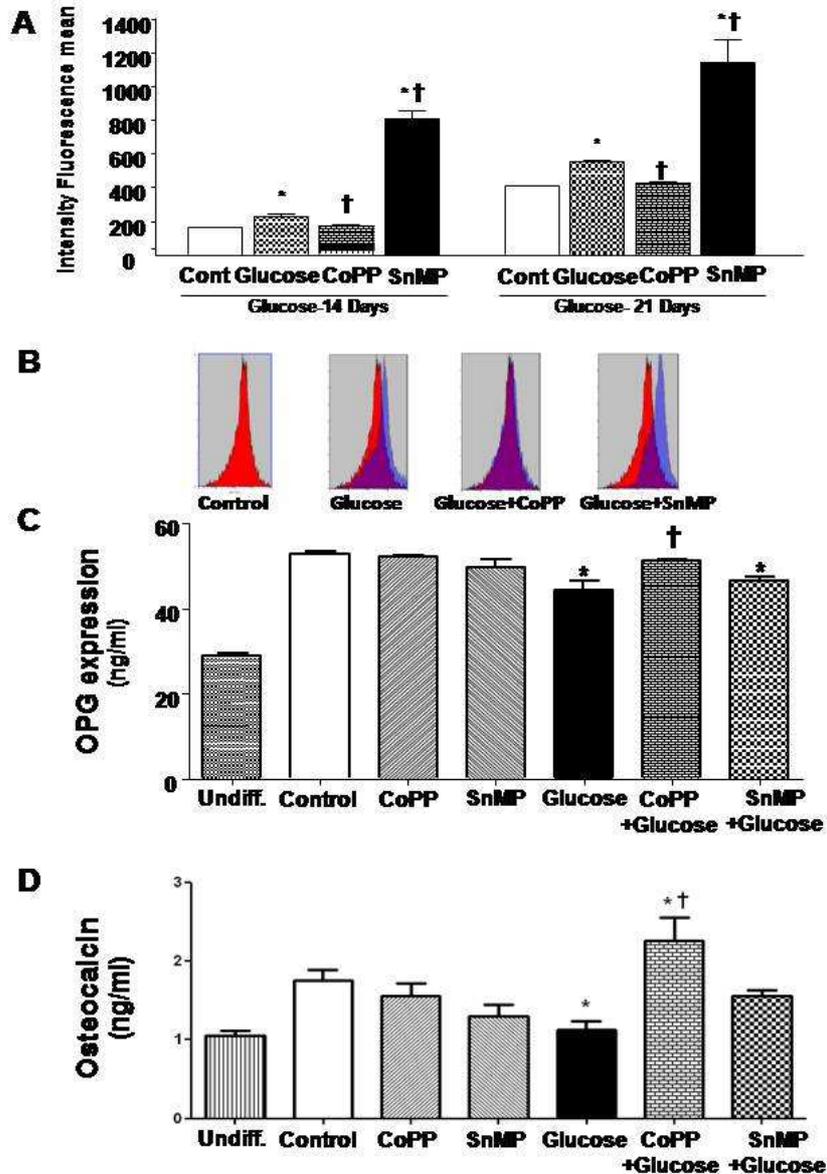
Il glucosio ad alta concentrazione (30 mM) ha provocato durante il differenziamento un decremento di tutti i markers osteoblastici come BMP-2, RUNX-2 ed Osteonectina. Tuttavia il trattamento con CoPP è stato in grado di riportare i valori dei suddetti markers a quelli delle cellule differenziate in normoglicemia (Glucosio 5mM) (fig.3A,B,C). Inoltre l'alta concentrazione di glucosio ha provocato un aumentata formazione di ROS a partire dal 14

giorno di differenziamento, anche in questo caso l'induzione di HO-1 è stata in grado di annullare la formazione di ROS da parte del glucosio (fig. 4A,B).

Figure 3



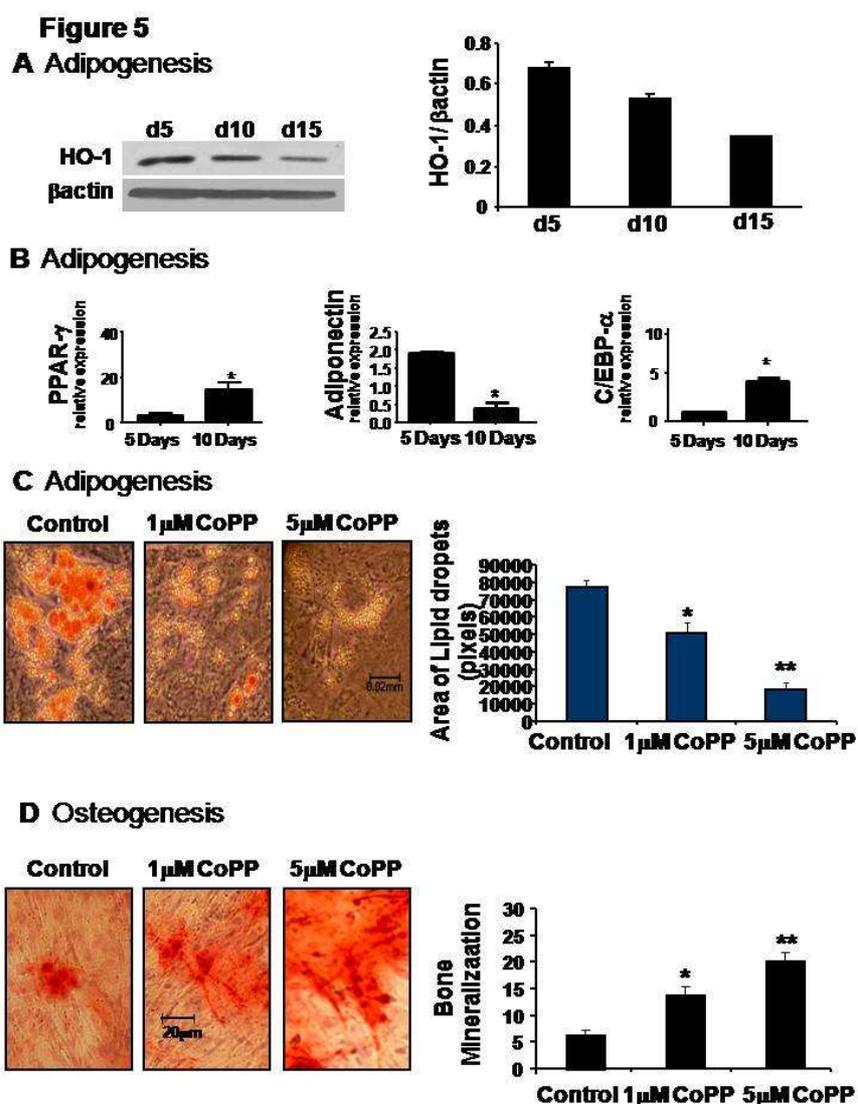
L'osteoprotegerina (OPG) durante il differenziamento presenta un incremento rispetto alle cellule indifferenziate, mentre l'alta concentrazione di glucosio in presenza o in assenza di SnMP è stata in grado di decrementare i livelli di secrezione. Anche in questo caso il trattamento con CoPP è stato in grado di riportare i livelli di OPG simili a quelli delle cellule differenziate in normoglicemia. Lo stesso andamento è stato riscontrato anche riguardo l'espressione dell'osteocalcina, infatti l'induzione di HO-1 è stata in grado di ripristinare i livelli di OCN simili a quelli controllo.

Figure 4

Gli effetti di HO-1 sul differenziamento di MSC in adipociti è mostrato nella figura 5. Lo studio mostra che gli adipociti differenziati esprimono bassi livelli di HO-1 (Fig.5A). L'espressione dell'eme ossigenasi 1 è stata decrementata a 10 e 15 giorni di differenziamento. Anche i livelli di Adiponectina sono stati downregolati durante il differenziamento mentre i markers PPAR γ e C/EBP α sono stati trovati aumentati già al 10 giorno di differenziamento. Lo studio quindi ha esaminato la significativa modulazione di HO-1 sul differenziamento adipocitico attraverso la colorazione Oil Red. Come visto in

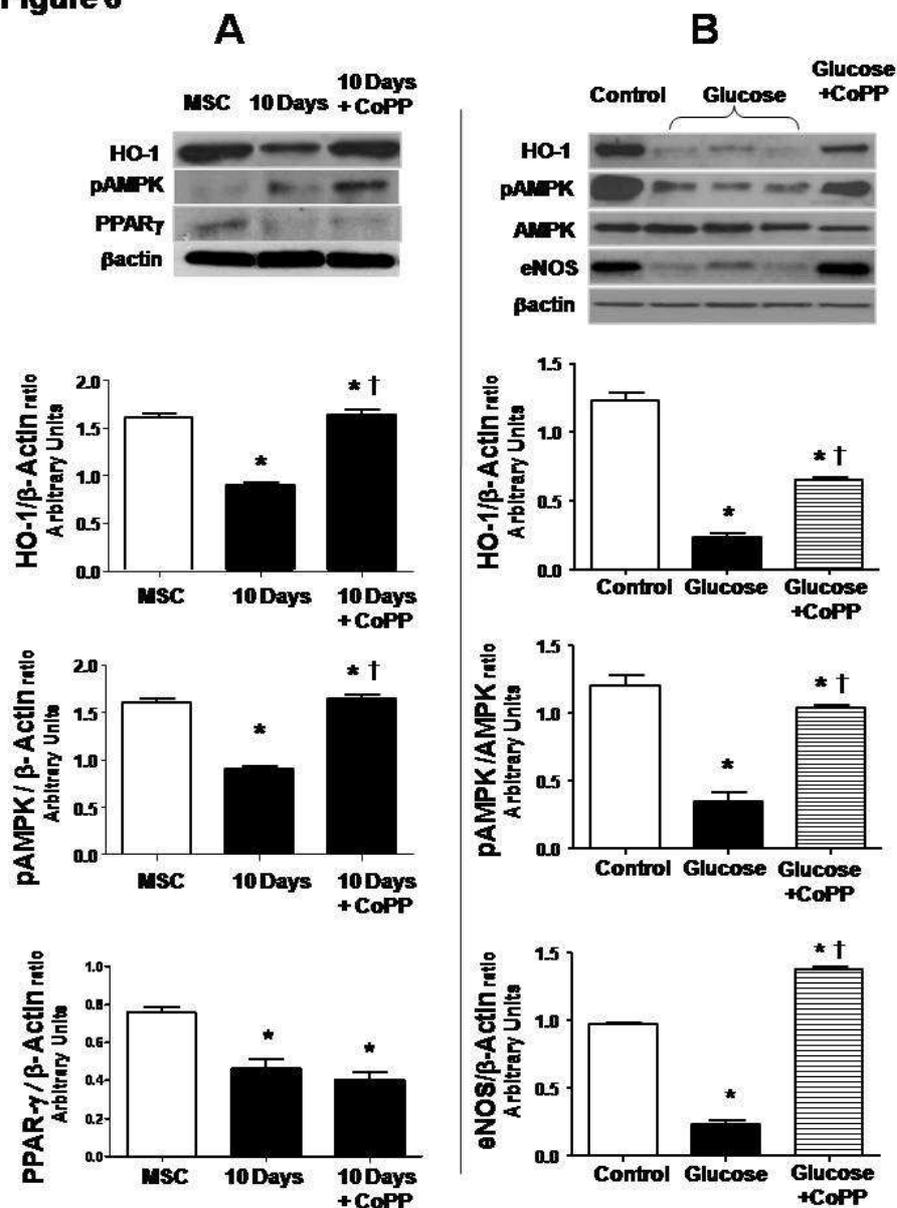
figura 5C, l'aggiunta di CoPP durante il differenziamento in adipociti fu in grado di ridurre la misura degli adipociti (lipid droplet) rispetto al controllo.

Gli effetti opposti sono stati invece osservati durante il differenziamento osteoblastico (Fig. 5D).



L'espressione di HO-1 è stata decrementata dopo 10 giorni di differenziamento osteoblastico, il trattamento con CoPP è stato abile ad indurre l'espressione sia HO-1 che di pAMPK. (fig.6A). Inoltre il differenziamento osteoblastico in alta concentrazione di glucosio fu in grado di downregolare l'espressione di HO-1, contrariamente il CoPP è stato in grado di riportare i livelli di HO-1 simili a quelli controllo. L'induzione di HO-1 è stata anche in grado di upregolare l'espressione di pAMPK e eNOS.

Figure 6



Capitolo 7

DISCUSSIONE

Nel presente studio , noi dimostriamo che l'upregolazione di HO-1 incrementa il differenziamento di MSCs in osteoblasti decrementando tuttavia anche quello in adipociti.

La somministrazione di CoPP , un induttore di HO-1 è stata in grado di aumentare la proliferazione e la differenziazione associata anche ad una aumentata espressione di AKT. Mentre un significativo incremento del differenziamento osteoblastico è stato osservato dopo somministrazione di CoPP, contrariamente lo SnMP , un inibitore dell'attività enzimatica di HO-1, ha avuto l'effetto di inibire l'espressione dei markers osteoblastici, suggerendo che l'effetto di CoPP incrementa sia l'espressione che l'attività di HO-1. Inoltre è stato dimostrato che il differenziamento osteoblastico in presenza di un'alta concentrazione di glucosio provoca un decremento dei livelli di BMP-2, osteonectin, pAMPK, e eNOS. Comunque l'aumentata espressione di HO-1, attraverso la somministrazione di CoPP in condizioni di iperglicemia, è stata in grado di riportare i livelli di BMP-2, HO-1, eNOS and pAMPK simili a quelli riscontrati in normoglicemia. Precedenti studi hanno infatti dimostrato che eNOS è espressa negli osteoblasti e che una deficienza di questo enzima ha avuto come risultato una riduzione della formazione ossea in esperimenti svolti sui topi (169).

A tal proposito l'incremento di HO-1 e eNOS provocato dal CoPP potrebbe essere indirizzato come primo step nella formazione del tessuto osseo. Infatti è stato dimostrato che eNOS ed NO stimolano BMP-2 incrementando il differenziamento osteoblastico (170, 171).

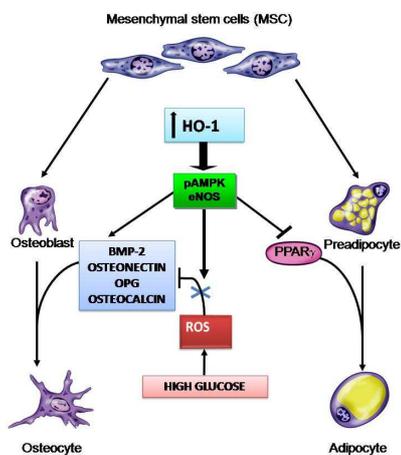
Ancor più recentemente è stato dimostrato che l'espressione di HO-1 in modelli animali di diabete di tipo 1 e 2 attenua le disfunzioni vascolari attraverso un incremento dei livelli di pAMPK e AKT, ed inoltre riduce anche lo stress ossidativo (172-174).

I pazienti diabetici mostrano un deficit nell'integrità e funzionalità del tessuto osseo, ciò è stato collegato all'aumentata produzione di adipociti riscontrata nei diabetici (175).

Infatti lo studio dimostra anche un differente effetto di HO-1 sul differenziamento di MSC in adipociti. Un induzione del differenziamento in adipociti è stata ottenuta dopo l'esposizione di MSC ad un'alta concentrazione di glucosio. La capacità dell'alta concentrazione di glucosio di attivare il differenziamento in adipociti è stata ampiamente dimostrata (176) ed è stato anche visto che è dipendente dalla soppressione dei livelli di espressione di HO-1. In accordo con questi risultati, il glucosio incrementa il differenziamento adipocitico associato ad una diminuzione di HO-1.

Noi dimostriamo in questo studio che la suscettibilità al glucosio delle MSCs risulta in un aumento della formazione dei ROS dopo 14 giorni di differenziamento osteoblastico. La concentrazione di glucosio usata in questi studi corrisponde a quella riportata in pazienti sani (5mM) (177) e a quella riportata in pazienti diabetici (30mM) (178). E' stato dimostrato che il glucosio inibisce l'espressione sia del promoter che della proteina dell'eme ossigenasi 1 (179-180). Il fatto che l'inibizione di HO-1 incrementa il differenziamento delle MSCs in adipociti implica due importanti concetti. Primo, l'alta concentrazione di glucosio ha un potenziale adipogenico, ed esiste un link diretto tra inibizione di HO-1, adipogenesi e sindrome metabolica. Secondo, l'inibizione di HO-1 incrementa la formazione di ROS, necessaria per il differenziamento in adipociti.

I risultati di questo studio dimostrano che l'incremento dell'espressione e dell'attività di HO-1 sono essenziali per il differenziamento di MSC in osteoblasti, cosicché l'induzione di questo enzima potrebbe attenuare l'effetto dell'iperglicemia sugli osteoblasti e simultaneamente inibire l'adipogenesi, offrendo così una strategia terapeutica nel trattamento delle complicanze del diabete e della sindrome metabolica in genere.



BIBLIOGRAFIA

1. Sowers JR, Frohlich ED. Insulin and insulin resistance: impact on blood pressure and cardiovascular disease. *Med Clin North Am* 2004; 88: 63-82.
2. Schwartz AV, Sellmeyer DE, Ensrud KE, Cauley JA, Tabor HK, Schreiner PJ, et al. Older women with diabetes have an increased risk of fracture: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 186: 32-8.
3. Nicodemus KK, Folsom AR. Type 1 and type 2 diabetes and incident hip fractures in postmenopausal women. *Diabetes Care* 2001; 24: 1192-7.
4. Forsen L, Meyer HE, Midthjell K, Edna TH. Diabetes mellitus and the incidence of hip fracture: results from the Nord-Trondelag Health Survey. *Diabetologia* 1999; 42: 920-5.
5. Meyer HE, Tverdal A, Falch JA. Risk factors for hip fracture in middle-aged Norwegian women and men. *Am J Epidemiol* 1993; 137: 1203-11.
6. Ottenbacher KJ, Ostir GV, Peek MK, Goodwin JS, Markides KS. Diabetes mellitus as a risk factor for hip fracture in Mexican American older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002; 57: M64853.
7. Keegan TH, Kelsey JL, Sidney S, Quesenberry CP. Foot problems as risk factors of fractures. *Am J Epidemiol* 2002; 155: 926-31.
8. Tuominen JT, Impivaara O, Puukka P, Ronnema T. Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22: 1196-200.

9. Thomas T, Burguera B, Melton LJ, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL, et al. Role of serum leptin, insulin, and estrogen levels as potential mediators of the relationship between fat mass and bone mineral density in men versus women. *Bone* 2001; 29: 114-20.
10. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Anderson JJ. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 567-73.
11. Lenchik L, Register TC, Hsu FC, Lohman K, Nicklas BJ, Freedman BI, et al. Adiponectin as a novel determinant of bone mineral density and visceral fat. *Bone* 2003; 33: 646-51.
12. Ward DT, Yau SK, Mee AP, Mawer EB, Miller CA, Garland HO, et al. Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 779-90.
13. Paul RG, Bailey AJ. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 1996; 28: 1297-310.
14. Li JB, Wang CY, Chen JW, Feng ZQ, Ma HT. Expression of liver insulin-like growth factor 1 gene and its serum level in patients with diabetes. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 255-9.
15. Manolagas, SC, Jilka, RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 1995; 332: 305-11.
16. Vogt MT, Cauley JA, Kuller LH, Nevitt MC. Bone mineral density and blood flow to the lower extremities: the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 283-9.

17. Amir G, Rosenmann E, Sherman Y, Greenfeld Z, Ne'eman Z, Cohen AM. Osteoporosis in the Cohen diabetic rat: correlation between histomorphometric changes in bone and microangiopathy. *Lab Invest* 2002; 82: 1399-405.
18. Need AG, O'Loughlin PD, Morris HA, Horowitz M, Nordin BE. The effects of age and other variables on serum parathyroid hormone in postmenopausal women attending an osteoporosis center. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1646-9.
19. Doherty TJ. Aging and sarcopenia. *J Appl Physiol* 2003; 95: 1717-27.
20. Buysschaert M, Cauwe F, Jamart J, Brichant C, De Coster P, Magnan A, et al. Proximal femur density in type 1 and 2 diabetic patients. *Diabetes Metab* 1992; 18: 32-7.
21. Miazgowski T, Czekalski S. A 2-year follow-up study on bone mineral density and markers of bone turnover in patients with long-standing insulin-dependent diabetes mellitus. *Osteoporos Int* 1998; 8: 399-403.
22. Liu E, Wactawski-Wende J, Donahue RP, Dmochowski J, Hovey KM, Quattrin T. Does low bone mineral density start in post-teenage years in women with type 1 diabetes? *Diabetes Care* 2003; 26: 2365-69.
23. Heath H, Melton LJ, Chu CP. Diabetes mellitus and risk of skeletal fracture. *N Engl J Med* 1980; 303: 567-70.
24. Melchior TM, Sorensen H, Torp-Pedersen C. Hip and distal arm fracture rates in peri- and postmenopausal insulin- treated diabetic females. *J Intern Med* 1994; 236: 203-8.
25. Verhaeghe J, Suiker AM, Einhorn TA, Geusens P, Visser WJ, Van Herck E, et al. Brittle bones in spontaneously diabetic female rats cannot be predicted by bone mineral

- measurements: studies in diabetic and ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1657-67.
26. Bjorgaas M, Haug E, Johnsen HJ. The urinary excretion of deoxypyridinium cross-links is higher in diabetic than in nondiabetic adolescents. *Calcif Tissue Int* 1999; 65: 121-4.
27. Selby PL, Shearing PA, Marshall SM. Hydroxyproline excretion is increased in diabetes mellitus and related to the presence of microalbuminuria. *Diabetes Med* 1995; 12: 240-3.
28. Christensen JO, Svendsen OL. Bone mineral in preand postmenopausal women with insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Osteoporos Int* 1999; 10: 307-11.
29. Gallacher SJ, Fenner JA, Fisher BM, Quin JD, Fraser WD, Logue FC, et al. An evaluation of bone density and turnover in premenopausal women with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Med* 1993; 10: 129-33.
30. Munoz-Torres M, Jodar E, Escobar-Jimenez F, Lopez- Ibarra PJ, Luna JD. Bone mineral density measured by dual X-ray absorptiometry in Spanish patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Calcif Tissue Int* 1996; 58: 316-19.
31. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Hamade S, Enwemeka CS. The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2001; 54: 1-8.
32. Verhaeghe J, van Herck E, Visser WJ, Suiker AM, Thomasset M, Einhorn TA, et al. Bone and mineral metabolism in BB rats with long-term diabetes. Decreased bone turnover and osteoporosis. *Diabetes* 1990; 39: 477-82.
33. Wang X, Shen X, Li X, Agrawal CM. Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone* 2002; 31: 1-7.

34. Vashishth D, Gibson GJ, Khoury JI, Schaffler MB, Kimura J, Fyhrie DP. Influence of nonenzymatic glycation on biomechanical properties of cortical bone. *Bone* 2001; 28: 195-201.
35. Takagi M, Kasayama S, Yamamoto T, Motomura T, Hashimoto K, Yamamoto H, et al. Advanced glycation end products stimulate interleukin-6 production by human bone-derived cells. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 439-46.
36. Katayama Y, Akatsu T, Yamamoto M, Kugai N, Nagata N. Role of nonenzymatic glycosylation of type I collagen in diabetic osteopenia. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 931-7.
37. Miyata T, Notoya K, Yoshida K, Hone K, Maeda K, Kurokawa K, et al. Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 260-70.
38. Ensrud KE, Cauley JA, Zhou L, Mason TM, Bowman PJ, Harper KD. Effect of raloxifene hydrochloride (RLX) on bone mineral density (DMO) and bone turnover markers in diabetic women: the Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Trial. *J Bone Miner Res* 2001; 16: S415.
39. Jude EB, Selby PL, Burgess J, Lilleystone P, Mawer EB, Page SR, et al. Bisphosphonates in the treatment of Charcot neuroarthropathy: a double-blind randomized controlled trial. *Diabetologia* 2001; 44: 2032-37.
40. Kleerekoper M. Osteoporosis in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 2457-8.
41. Fuchs E. and Segre G., (2000). Stem cells: a new lease on life. *Cell press*. 100, 143-155.

42. Herzog EL, Chai L & Krause DS (2003). *Blood* 102, 3483–3493
43. Evans, M.J. and Kaufman, M.H., (1981) *Nature* 292, 154-156
44. Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78,7634-7638
45. J. A. Thomson and V. S. Marshall, *Curr. Top. Dev. Biol.* **38**, 133 (1998).
46. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. *Genes Dev.* Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. 1998 Jul 1;12(13):2048-60
47. Smith PD, Patterson Merkel cell carcinoma (neuroendocrine carcinoma of the skin). *JW. Am J Clin Pathol.* 2001 Jun;115 Suppl:S68-78.
48. Keller R, Keist R, Joller P, Groscurth P. Mononuclear phagocytes from human bone marrow progenitor cells; morphology, surface phenotype, and functional properties of resting and activated cells. *Clin Exp Immunol.* 1993 Jan;91(1):176-82.
50. Drab M, Haller H, Bychkov R, Erdmann B, Lindschau C, Haase H, Morano I, Luft FC, Wobus AM. From totipotent embryonic
52. Watt FM. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1998 Jun 29;353(1370):831-7.
53. Gage F.H. and Fisher L.J. (1995). Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* 18: 159.

- 54.Schultz E. and McCormick K.M.(1994). Skeletal muscle satellite cells. Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol. 123: 213.
- 55.Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res. 1961 Feb;14:213-22.
- 56.Friedenstein AJ, Lalykina KS.Thymus cells are inducible to osteogenesis.
- 57.Alison M. and Sarraf C. (1998). Hepatic stem cells. J.Hepatol. 29: 676.
- 59.Al-Awqati Q. and Oliver J.A. (2002). Stem cell in the Kidney. Kidney Int. 61: 387- 395.
- 60.Brittan M., Hunt T., Jefferey R. et al. (2002). Bone marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. Gut 50: 752-757.
- 61.Lemoli RM, Bertolini F, Cancedda R, De Luca M, Del Santo A, Ferrari G, Ferrari S, Martino G, Mavilio F, Tura S. Stem cell plasticity: time for a reappraisal? Haematologica. 2005 Mar;90(3):360-81.
- 62.Frisen J. (2002). Stem cell plasticity? Neuron 35: 415-418
63. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L. et al. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 418: 41-49.
- 64.[Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao](#). Effects of different cooling rates on cryopreservation of hematopoietic stem cells from cord blood] 2003 Jul;19(4):489-92.
- 65.Del Rio-Tsonis K. and Tsonis P.A. (2003). Eye regeneration at the molecular age. Dev.Dyn. 226: 211-224.

66. Clarke D., Johansson C., Wilbert Z.J. et al. (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288: 1660-1663
67. Nye H.L., Cameron J.A., Chernoff E.A. and Stocum D.L. (2003). Regeneration of the urodele limb: a review. *Dev. Dyn.* 226: 280-294.
68. Nishimura E.K., Jordan S.A., Oshima H. et al. (2002). Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 416: 854-860.
69. Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G. and Mavilio F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279: 1528
70. Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C.D., Buzney E.A., Khan M.K., Flint A.F., Kunkel L.M., Mulligan R.C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401: 390-394.
71. Theise N., Badve S., Saxena R. et al. (2000). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 31: 234-240.
72. Austin T.W. and Lagasse E. Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells. (2003). *Mech. Dev.* 120: 131-135.
73. Ianus A., Holz G.G., Theise N.D. and Hussain M.A. (2003) In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J. Clin. Invest.* 111: 843-850.
74. Gupta S., Verfaillie C., Chmielewski D. et al. (2002). A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. *Kidney Int.* 62: 1285-1290.

75. Krause D.S., Theise N.D., Collector M.I. et al. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105: 369.
76. Okamoto R., Yajima T., Yamazaki M., Kanai T., Mukai M. Okamoto S., Ikeda Y., Hibi T., Inazawa J. and Watanabe M. (2002). Damage epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat.Med.* 8: 1011.
77. Orlic D., Kajstura J., Cimenti S. et al. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410: 701-705.
78. Anversa P. and Nadal-Ginard B. (2002). Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature* 415: 240-243
79. LaBarge M.A. and Blau H.M. (2002). Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber to response to injury. *Cell* 111: 589.
80. Castro R.F., Jackson K.A., Goodell M.A., Robertson C.S., Liu H. and Shine H.D. (2002). Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science* 297: 1299
81. Wright D.E., Wagers A.J., Gulati A.P., Johnson F.L. and Weissman I.L. (2001). Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* 294: 1933.
82. Camargo F.D., Chambers S.M. and Goodell M.A. (2004). Stem cell plasticity: from transdifferentiation to macrophage fusion. *Cell Prolif.* 37: 55-65.
83. Vassilopoulos G., Wang P.R. and Russell D.W. (2003). Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422: 901

84. Mintz B. and Baker W.W. (1967). Normal mammalian muscle differentiation and gene control of isocitrate dehydrogenase synthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 58: 592-598
85. Scheven B.A., Burger E.H., Kawilarang-de Haas E.W., Wassenaar A.M. and Nijweide P.J. (1985). Effects of ionizing irradiation on formation and resorbing activity of osteoclasts in vitro. *Lab.Invest.* 53: 72-79.
86. Kliman H.J., Nestler J.E., Sermasi E., Sanger J.M. and Strauss J.F. (1986). Purification, characterization and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118: 1567-82.
87. Parwaresch M.R., Kreipe H. and Radzun H.J. (1986). Human macrophage hybrid forming spontaneous giant cells. *Virchows Arch. B Cell Pathol.Incl.Mol.Pathol.* 51: 89-96.
88. Wang X., Willenbring H., Akkary Y. et al. (2003). Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422: 897-901
89. Weimann J.M., Johansson C.B., Trejo A. and Blau H.M. (2003). Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat.Cell.Biol.* 5: 959-966.
90. Caplice N.M., Bunch T.J., Stalboerger P.G. et al. (2003). Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 100: 4754-4759.

91. Ianus A., Holz G.G., Theise N.D. and Hussain M.A.(2003) In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J.Clin.Invest.* 111: 843-850.
92. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L. et al. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-49.
93. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–147.
94. Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, et al. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 2001;7:729-41.
95. Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 1998;13:828-38.
96. Asakura, M. Komaki, M. A. Rudnicki. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* 68, 245-253, 2001.
97. Allen TD, Dexter TM, Simmons PJ. Marrow biology and stem cells. *Immunol Ser* 1990;49:1-38.
98. Zipori D. (2004). Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. *Blood Cells Mol Dis.*33.211-5.

99. [Gregory KE](#), [Ono RN](#), [Charbonneau NL](#), [Kuo CL](#), [Keene DR](#), [Bachinger HP](#), [Sakai](#) The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *J Biol Chem*. 2005 Jul 29;280(30):27970-80. Epub 2005 Jun 1.
100. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–147.
101. Deschaseaux F, Gindraux F, Saadi R, Obert L, Chalmers D, Herve P. Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45^{med}, low phenotype. *MEN EA* 2284 .
102. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissue. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):71-4.
103. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1969; 244(23):6388-6394.
104. Abraham N.G., J.H. Lin, M.L. Schwartzman, R.D. Levere, S. Shibahara, The physiological significance of heme oxygenase, *Int. J. Biochem.* 20 (1988) 543–558.
105. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37:517-554.
106. [Yoshida T](#), [Kikuchi G](#). Reaction of the microsomal heme oxygenase with cobaltic protoporphyrin IX, and extremely poor substrate. *J Biol Chem*. 1978 Dec 10;253(23):8479-82.

108. [Yoshinaga T](#), [Sassa S](#), [Kappas A](#). The oxidative degradation of heme c by the microsomal heme oxygenase [J Biol Chem](#). 1982 Jul 10;257(13):7803-7.
109. Dore S, Takahashi M, Ferris CD, Zakhary R, Hester LD, Guastella D, Snyder SH. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(5):2445-2450.
110. Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Kaur H, Green CJ, Motterlini R. Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278(2):H643-H651.
111. Mayer M. Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease. *Clin Chem* 2000; 46(11):1723-1727.
112. Asad SF, Singh S, Ahmad A, Hadi SM. Inhibition of L-DOPA-Cu(II)-mediated DNA cleavage by bilirubin. *Toxicol In Vitro* 2000; 14(5):401-404.
113. Baranano DE, Wolosker H, Bae BI, Barrow RK, Snyder SH, Ferris CD. A mammalian iron ATPase induced by iron. *J Biol Chem* 2000; 275(20):15166-15173.
114. Andrews NC. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat Rev Genet* 2000; 1(3):208-217.
115. Alkadhi KA, Al Hijailan RS, Malik K, Hogan YH. Retrograde carbon monoxide is required for induction of long-term potentiation in rat superior cervical ganglion. *J Neurosci* 2001; 21(10):3515-3520.
116. Poss KD, Thomas MJ, Ebralidze AK, O'Dell TJ, Tonegawa S. Hippocampal long-term potentiation is normal in heme oxygenase-2 mutant mice. *Neuron* 1995; 15(4):867-873.

117. Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* 1993; 259(5093):381-384.
118. Thom SR, Fisher D, Xu YA, Garner S, Ischiropoulos H. Role of nitric oxide-derived oxidants in vascular injury from carbon monoxide in the rat. *Am J Physiol* 1999; 276(3 Pt 2):H984-H992.
119. Hartsfield CL, Alam J, Cook JL, Choi AM. Regulation of heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle cells by nitric oxide. *Am J Physiol* 1997; 273(5 Pt 1):L980-L988.
120. Wang R, Wu L. The chemical modification of KCa channels by carbon monoxide in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1997; 272(13):8222-8226.
121. Wang R. Resurgence of carbon monoxide: an endogenous gaseous vasorelaxing factor. *Can J Physiol Pharmacol* 1998; 76(1):1-15.
122. Otterbein LE, Zuckerbraun BS, Haga M, Liu F, Song R, Usheva A, Stachulak C, Bodyak N, Smith RN, Csizmadia E, Tyagi S, Akamatsu Y, Flavell RJ, Billiar TR, Tzeng E, Bach FH, Choi AM, and Soares MP. Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nature Med* 9: 183-190, 2003.
123. Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, Soares MP. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 2000; 192(7):1015-1026.
125. McCoubrey WK, Jr., Ewing JF, Maines MD. Human heme oxygenase-2: characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting

- that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. Arch Biochem Biophys 1992; 295(1):13-20.
126. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1997; 37:517-554.
127. 127a.b.c. Shibahara S, Muller R, Taguchi H, Yoshida T. Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. Proc Natl Acad Sci U S A 1985; 82(23):7865-7869.
- 128.128a. Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86(1):99-103.
129. [Vile GF, Tyrrell RMJ Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. Biol Chem.](#) 1993 Jul 15;268(20):14678-81.
130. Keyse SM, Tyrrell RM. Both near ultraviolet radiation and the oxidizing agent hydrogen peroxide induce a 32-kDa stress protein in normal human skin fibroblasts. J Biol Chem 1987; 262(30):14821-14825.
131. Ewing JF, Maines MD. Rapid induction of heme oxygenase 1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: heme oxygenase 2 is not a heat shock protein. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88(12):5364-5368.
132. Lautier D, Luscher P, Tyrrell RM. Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UVA radiation/hydrogen peroxide inducible expression of the human heme oxygenase gene. Carcinogenesis 1992; 13(2):227-232.

133. Lee PJ, Washer LL, Law DJ, Boland CR, Horon IL, Feinberg AP. Limited up-regulation of DNA methyltransferase in human colon cancer reflecting increased cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(19):10366-10370.
134. Eysen-Hernandez R, Ladoux A, Frelin C. Differential regulation of cardiac heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor mRNA expressions by hemin, heavy metals, heat shock and anoxia. *FEBS Lett* 1996; 382(3):229-233.
135. Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AM. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* 1997; 272(9):5375-5381.
136. Camhi SL, Alam J, Wiegand GW, Chin BY, Choi AM. Transcriptional activation of the HO-1 gene by lipopolysaccharide is mediated by 5' distal enhancers: role of reactive oxygen intermediates and AP-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18(2):226-234.
137. Carraway MS, Ghio AJ, Carter JD, Piantadosi CA. Expression of heme oxygenase-1 in the lung in chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278(4):L806-L812.
138. [Matsuura Y](#), [Watanabe H](#), [Fukuda T](#), [Yoshida T](#), [Kuroiwa YA](#) a sustained increase of microsomal heme oxygenase activity following treatment of rats with Bacillus Calmette-Guerin and Corynebacterium parvum: its possible relation to the decrease of cytochrome P-450 content. [J Pharmacobiodyn.](#) 1985 Aug;8(8):669-78.
139. [Stout DL](#), [Becker FF](#). Heme enzyme patterns in genetically and chemically induced mouse liver tumors. [Cancer Res.](#) 1986 Jun;46(6):2756-9.

140. [Lutton JD](#), [Levere RD](#), [Abraham NG](#). Department of Medicine, New York Medical College, Valhalla 10595.
141. [Alam J](#), [Den ZJ](#) [Distal AP-1 binding sites mediate basal level enhancement and TPA induction of the mouse heme oxygenase-1 gene.](#) [Biol Chem.](#) 1992 Oct 25;267(30):21894-900.
143. [Mitani K](#), [Fujita H](#), [Fukuda Y](#), [Kappas A](#), [Sassa S](#). The role of inorganic metals and metalloporphyrins in the induction of haem oxygenase and heat-shock protein 70 in human hepatoma cells. [Biochem J.](#) 1993 Mar 15;290 (Pt 3):819-25.
144. Al-Awqati Q. and Oliver J.A. (2002). Stem cell in the Kidney. [Kidney Int.](#) 61: 387- 395.
145. Rizzardini M, Terao M, Falciani F, Cantoni L. Cytokine induction of haem oxygenase mRNA in mouse liver. Interleukin 1 transcriptionally activates the haem oxygenase gene. [Biochem J](#) 1993; 290(Pt 2):343-347.
- 146.146a. Choi AM, Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. [Am J Respir Cell Mol Biol](#) 1996; 15(1):9-19.
147. Durante W, Kroll MH, Christodoulides N, Peyton KJ, Schafer AI. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. [Circ Res](#) 1997; 80(4):557-564.
148. Agarwal A, Shiraishi F, Visner GA, Nick HS. Linoleyl hydroperoxide transcriptionally upregulates heme oxygenase-1 gene expression in human renal epithelial and aortic endothelial cells. [J Am Soc Nephrol](#) 1998; 9(11):1990-1997.

149. Fogg S, Agarwal A, Nick HS, Visner GA. Iron regulates hyperoxia-dependent human heme oxygenase 1 gene expression in pulmonary endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20(4):797-804.
150. Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A, Abraham NG. Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(13):5987-5991.
151. Takeda K, Ishizawa S, Sato M, Yoshida T, Shibahara S. Identification of a cis-acting element that is responsible for cadmium-mediated induction of the human heme oxygenase gene. *J Biol Chem* 1994; 269(36):22858-22867.
152. Schwartz AV, Sellmeyer DE, Ensrud KE, Cauley JA, Tabor HK, Schreiner PJ, et al. Older women with diabetes have an increased risk of fracture: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 186: 32-8.
153. Nicodemus KK, Folsom AR. Type 1 and type 2 diabetes and incident hip fractures in postmenopausal women. *Diabetes Care* 2001; 24: 1192-7.
154. Forsen L, Meyer HE, Midthjell K, Edna TH. Diabetes mellitus and the incidence of hip fracture: results from the Nord-Trondelag Health Survey. *Diabetologia* 1999; 42: 920-5.
155. Meyer HE, Tverdal A, Falch JA. Risk factors for hip fracture in middle-aged Norwegian women and men. *Am J Epidemiol* 1993; 137: 1203-11.
156. Ottenbacher KJ, Ostir GV, Peek MK, Goodwin JS, Markides KS. Diabetes mellitus as a risk factor for hip fracture in Mexican American older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002; 57: M64853.

157. Keegan TH, Kelsey JL, Sidney S, Quesenberry CP. Foot problems as risk factors of fractures. *Am J Epidemiol* 2002; 155: 926-31.
158. Tuominen JT, Impivaara O, Puukka P, Ronnema T. Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22: 1196-200.
159. Thomas T, Burguera B, Melton LJ, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL, et al. Role of serum leptin, insulin, and estrogen levels as potential mediators of the relationship between fat mass and bone mineral density in men versus women. *Bone* 2001; 29: 114-20.
160. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Anderson JJ. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 567-73.
161. Lenchik L, Register TC, Hsu FC, Lohman K, Nicklas BJ, Freedman BI, et al. Adiponectin as a novel determinant of bone mineral density and visceral fat. *Bone* 2003; 33: 646-51.
162. Li M, Kim DH, Tsenovoy PL, Peterson SJ, Rezzani R, Rodella LF, Aronow WS, Ikehara S, Abraham NG 2008 Treatment of obese diabetic mice with a heme oxygenase inducer reduces visceral and subcutaneous adiposity, increases adiponectin levels, and improves insulin sensitivity and glucose tolerance. *Diabetes* 57:1526-1535
163. Wagener FA, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ, Figdor CG 2003 Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev* 55:551-571

164. Maines MD 1997 The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases.
Annu Rev Pharmacol Toxicol 37:517-554
165. Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH 2003 Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. Trends Immunol 24:449-455
166. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR 1999 Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284:143-147
167. Marie PJ, Fromigue O 2006 Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. Regen Med 1:539-548
168. Barbagallo I, Tibullo D, Di RM, Giallongo C, Palumbo GA, Raciti G, Campisi A, Vanella A, Green CJ, Motterlini R 2008 A cytoprotective role for the heme oxygenase-1/CO pathway during neural differentiation of human mesenchymal stem cells. J Neurosci Res 86:1927-1935
169. Armour KE, Armour KJ, Gallagher ME, Godecke A, Helfrich MH, Reid DM, Ralston SH (2001) Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. Endocrinology 142:760-766
170. Strotmeyer ES, Cauley JA, Schwartz AV, Nevitt MC, Resnick HE, Bauer DC, Tylavsky FA, de Rekeneire N, Harris TB, Newman AB (2005) Nontraumatic fracture risk with diabetes mellitus and impaired fasting glucose in older white and black adults: the health, aging, and body composition study. Arch Intern Med 165:1612-1617
171. Garrett IR, Gutierrez G, Mundy GR (2001) Statins and bone formation. Curr Pharm Des 7:715-736

172. Abraham NG, Kappas A (2008) Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev* 60:79–127
173. Kruger AL, Peterson SJ, Schwartzman ML, Fusco H, McClung JA, Weiss M, Shenouda S, Goodman AI, Goligorsky MS, Kappas A, Abraham NG (2006) Up-regulation of heme oxygenase provides vascular protection in an animal model of diabetes through its antioxidant and antiapoptotic effects. *J Pharmacol Exp Ther* 319:1144–1152
174. Kruger AL, Peterson S, Turkseven S, Kaminski PM, Zhang FF, Quan S, Wolin MS, Abraham NG (2005) D-4F induces heme oxygenase-1 and extracellular superoxide dismutase, decreases endothelial cell sloughing, and improves vascular reactivity in rat model of diabetes. *Circulation* 111:3126–3134
175. Botolin S, Faugere MC, Malluche H, Orth M, Meyer R, McCabe LR (2005) Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor- γ 2 expression in type I diabetic mice. *Endocrinology* 146:3622–3631
176. Kinobe RT, Ji Y, Vlahakis JZ, Motterlini R, Brien JF, Szarek WA, Nakatsu K (2007) Effectiveness of novel imidazole-dioxolane heme oxygenase inhibitors in renal proximal tubule epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 323(3):763–770
177. Berger AJ, Itzkan I, Feld MS (1997) Feasibility of measuring blood glucose concentration by near-infrared Raman spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 53A: 287–292
178. Morigi M, Angioletti S, Imberti B, Donadelli R, Micheletti G, Figliuzzi M, Remuzzi A, Zoja C, Remuzzi G (1998) Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF- κ B-dependent fashion. *J Clin Invest* 101:1905–1915

179. Chang SH, Barbosa-Tessmann I, Chen C, Kilberg MS, Agarwal A (2002) Glucose deprivation induces heme oxygenase-1 gene expression by a pathway independent of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 277:1933–1940
180. Quan S, Kaminski PM, Yang L, Morita T, Inaba M, Ikehara S, Goodman AI, Wolin MS, Abraham NG (2004) Heme oxygenase-1 prevents superoxide anion-associated endothelial cell sloughing in diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 315:509–516

