

IV 516029

D. MIȘCALENCU

FLORICA MAILAT

G.A. SZEGLI

**CITOKINE**  
**(Factori de creștere)**  
**FAMILIA CITOKINELOR IL-6**

Editura Universității din București

- 1998 -



BIBLIOTECA CENTRALĂ  
UNIVERSITARĂ  
București

Cota IV 516 029

Inventar C 19980552

**D. MIȘCALENCU**

**FLORICA MAILAT**

**G. A. SZEGLI**

# **CITOKINE**

**(Factori de creștere)**

**FAMILIA CITOKINELOR IL-6**

**EDITURA UNIVERSITĂȚII DIN BUCUREȘTI**  
**1998**

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

BUCUREȘTI

LOTA IV 516029

14 609/98

Referenți științifici: Prof. univ. dr. IRINA TEODORESCU  
Prof. univ. dr. VIORICA MANOLACHE

© Editura Universității din București  
Șos. Panduri 90-92, București - 76235; Tel./Fax: 410.23.84

Tehnoredactare computerizată: Florian MIHALCEA

**B.C.U. București**



C199805552

---

Tiparul s-a executat sub cda 473/1998  
la Tipografia Editurii Universității din București

---

ISBN 973 - 575 - 260 - 3

## PREFAȚĂ

Răspunsul imunitar este rezultatul interacțiunii dintre limfocitele T/B și monocite/macrofage. Această cooperare poate induce proliferarea, și diferențierea celulelor, producția de anticorpi, creșterea activității antimicrobiene și a hematopoiezei.

Comunicarea intercelulară este asigurată de factori solubili numiți citokine, care astăzi reprezintă limbajul universal în dialogul dintre diferite celule ale organismului.

Citokinele, dincolo de faptul că au numeroase surse potențiale, vizează și un mare număr de ținte, implicând astfel un larg spectru de acțiune și activități.

Multitudinea surselor de elaborare, a variatelor ținte care pot fi și din afara sistemului imunitar, fac din citokine reprezentanți autorizați, aparținând grupului larg de proteine - factorii de creștere-. Aceasta cu atât mai mult, cu cât alterarea structurii moleculelor constitutive, modificări în producția lor sau a receptorilor lor, pot determina apariția de celule neoplazice în manieră asemănătoare cu modificările induse de factorii de creștere propriu-ziși.

Prima citokină descoperită în 1957 a fost numită interferondatorită activității ei antivirale, în urma deciziei specialiștilor în cadrul „International Lymphokine Workshop” (1979) aceste molecule sunt numite interleukine (IL-). Odată cu noile descoperiri privitoare la producția citokinelor recombinante, precum și la studierea activității lor biologice, s-a putut demonstra că acestea au acțiuni complexe, în sensul că, deseori, o celulă nu este ținta unei singure citokine, ci este expusă unui cocktail de citokine. Aceste observații presupun însă, o analiză amplă atât a fiecărei citokine și receptorului ei, cât și a interacțiunii lor reciproce.

Tentativele terapeutice cu citokine aduc numeroase informații privind complexitatea funcțiilor lor, frecvent sinergice sau antagonice, asupra unor celule țintă, precum și asupra complexității prin care transmit semnalele intracelulare.

Aceste observații generale privind citokinele se pot exemplifica și în cazul citokinelor aparținând familiei IL-6.

## Citokinele familiei IL-6.

Deși din punct de vedere structural, citokinele IL-6, LIF, OSM, CT-1, CNTF și IL-11 au puține similarități, funcțiile lor biologice sunt asemănătoare, uneori chiar sinergice, fapt, se pare, datorat unui receptor celular care are în structură, o componentă comună-gp130. Deci, pleiotropismul funcțional al receptorilor familiei citokinelor IL-6 este datorat subunității gp130 cu rol în stabilizarea citokinei cuplată la subunitatea de joasă afinitate a receptorului, ca și în transducția semnalului.

Celelalte subunități ale receptorului, subunități de înaltă afinitate, sunt lipsite de mecanismele care intervin în transducția semnalului, respectiv subunitatea accesorie, gp130.

OSM biologic activ este un heterodimer LIF-R-gp130, care este funcțional și în cazul lui LIF. Pe calea transductorului comun, gp130, OSM, IL-6 și LIF induc proliferarea celulelor plasmacitomului uman.

Celulele mielomului multiplu uman, care dețin IL-6R cu accesoriul său, gp130, răspund la acțiunea OSM, IL-6 și LIF, dar nu reacționează la IL-11.

CT-1R este un complex tripartit similar cu LIF-R. Pentru semnalizarea lui CT-1 este esențială gp130 în vederea formării heterocomplexului gp130-gp190, al treilea component al complexului receptor, fiind subunitatea alpha de 80kD.

Asemănarea IL-11R cu CNTF-R se pare că s-ar datora dispunerii alăturate a genelor lor în cromosomul 9, sugerându-se ideea evoluției dintr-un strămoși comun. Astfel, IL-1R alpha are omologii cu lanțul alpha din CNTF-R și IL-6R.

Toate aceste aspecte certifică asemănările dintre citokinele familiei IL-6, oferind posibilitatea prezentării lor ca o subgrupă a acestei familii de citokine.

## INTERLEUKIN-6 (IL-6)

IL-6 este o citochină polifuncțională produsă de un larg spectru de celule, cu rol în apărarea organismului. Expresia genei IL-6 este indusă de o varietate de citochine precum IL-1, TNF și IFN alpha, ca și de LPS, forbol esterii, sau agenți care cresc nivelul AMP ciclic intracelular.

Expresia genei IL-6 poate fi dereglată în afecțiunile autoimune și în unele malignități limfoide, precum mieloamele multiple (1). În condiții fiziologice normale, IL-6 se produce în cantități foarte mici în organism, dar când are loc o invazie virală, bacteriană sau se produc distrucții tisulare este indus rapid și tranzitoriu.

Denumirea de interleukin-6 a fost propusă în 1988 când s-a constatat identitatea între IFN-2 (p26kD) și BSF-2. Gena BSF-2 (B Stimulator Factor) (IL-6) s-a identificat în fibroblaste și codifică o proteină de 26 kD.

BSF-2 care s-a numit astfel pentru că stimulează limfocitele-B, pe care le maturează, s-a dovedit că poate induce și diferențierea celulelor nervoase. Celulele PC12 în prezența BSC-2/IL-6 își schimbă morfologia căpătând prelungiri asemănătoare neuronilor; acestea în prealabil exprimă tranzitoriu protooncogenul c-fos (2,3).

Sub numele de IFN beta2, IL-6 a fost folosit ca produs al celulelor stromale ale endometrului uman. Ca citochină numită încă IFN beta 2, IL-6 s-a demonstrat că se produce și ca răspuns la citochinele asociate cu inflamația cum sunt IL-1 alpha și IL-1 beta, TNF și IFN alpha (4). Interleukin-6 uman și murin sunt glicoproteine de 21-28 kD (în funcție de gradul de glicozilare). IL-6 uman are 212 resturi aminoacizi; activitatea biologică a acestuia poate fi pierdută complet prin deleția a 4 aminoacizi din terminusul-C, pe când îndepărtarea a 1-28 aminoacizi din terminusul-N, nu-i afectează activitatea biologică.



IL-6 murin este omolog la nivel DNA cu IL-6 uman în proporție de 65%. Este un polipeptid de 213 reziduuri aminoacizi cu o secvență lider de 24 aminoacizi. Translațional devine o gp de 19-26 kD. IL-6 uman și IL-6 murin pot suferi modificări post-translaționale ce pot avea specificitate de țesut, schimbându-și astfel acțiunea lor specifică.

IL-6 are similarității structurale și funcționale cu G-CSF iar receptorul său și proteina de transducție a semnalului (gp 130) ca și receptorul G-CSF arată un nivel înalt de identitate a secvențelor.

Genele IL-6 și G-CSF au de asemenea, structuri similare, fiind compuse din 5 exoni și 4 introni, cu dimensiuni strict similare, ceea ce a sugerat ideea că cele două gene provin din aceeași genă ancestrală.

### Receptorul IL-6 (IL-6)

IL-6R este compus din 468 aminoacizi inclusiv un peptid semnal din 19 resturi aminoacizi și un singur domeniu transmembranar. Proteina receptor matură are masa moleculară de 80 kD având 6 locuri potențiale de glicolizare; ea poate fi o proteină de membrană înalt glicozilată.

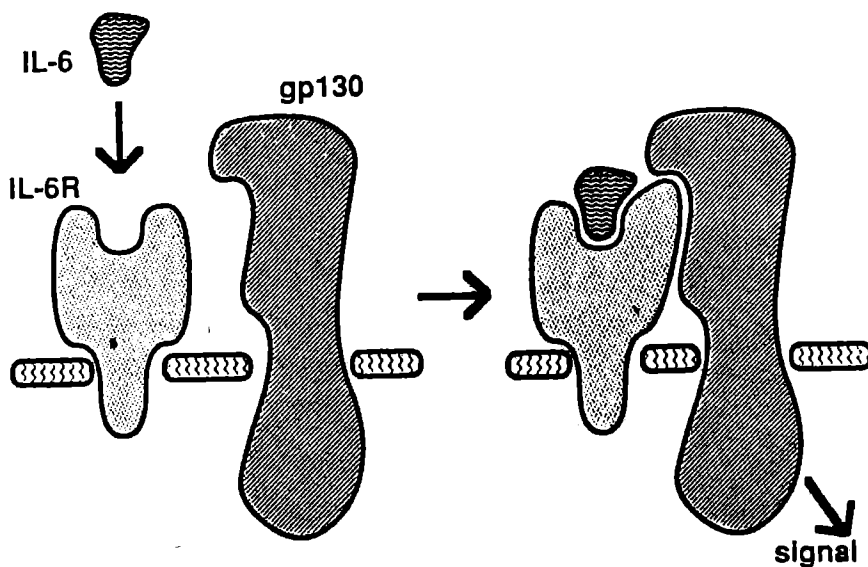
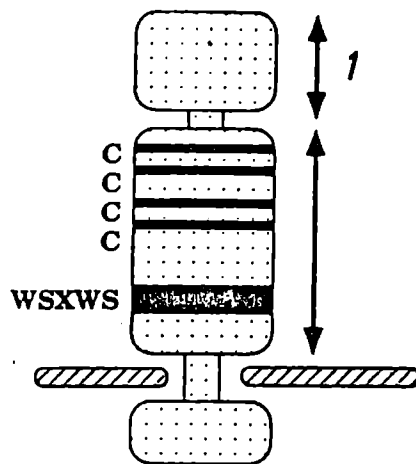
Regiunea dintre reziduurile de aminoacizi 20 și 110 deține criteriul pentru setul 2 constant (C2) al superfamiliei Ig. Deleția acestui domeniu nu afectează activitatea de cuplare IL-6 la IL-6R. Citochina receptor conservă 4 reziduuri de cisteină în capătul N-terminal și un motif extracelular Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS) dispus înaintea regiunii transmembranare.

Regiunea extracelulară a receptorului IL-6 prezintă două domenii: unul aparține superfamiliei Ig, iar celălalt, familiei citochinei receptor (fig. 1). Partea intracitoplasmatică a moleculei IL-6R, care constă din 82 aminoacizi nu conține secvențe asemănătoare domeniului tirozin-kinazei și nici nu deține posibilitatea transducției semnalului.

Dacă această parte a moleculei este deletată, molecula IL-6 totuși se cuplează la IL-6R mutilată și semnalul se transduce, ceea ce a sugerat existența unei molecule asociată receptorului, pentru transducția semnalului. Prin blocarea IL-6 cu anticorp anti-IL-6R s-a constatat că IL-6 declanșează transducția semnalului printr-un lanț polipeptidic secundar numit gp 130, asociat receptorului IL-6R. Această interacțiune dintre IL-6 și gp 130 are loc în domeniul lor extacelular. IL-6R uman se poate asocia și cu gp 130 de la șoarece (fig. 2).



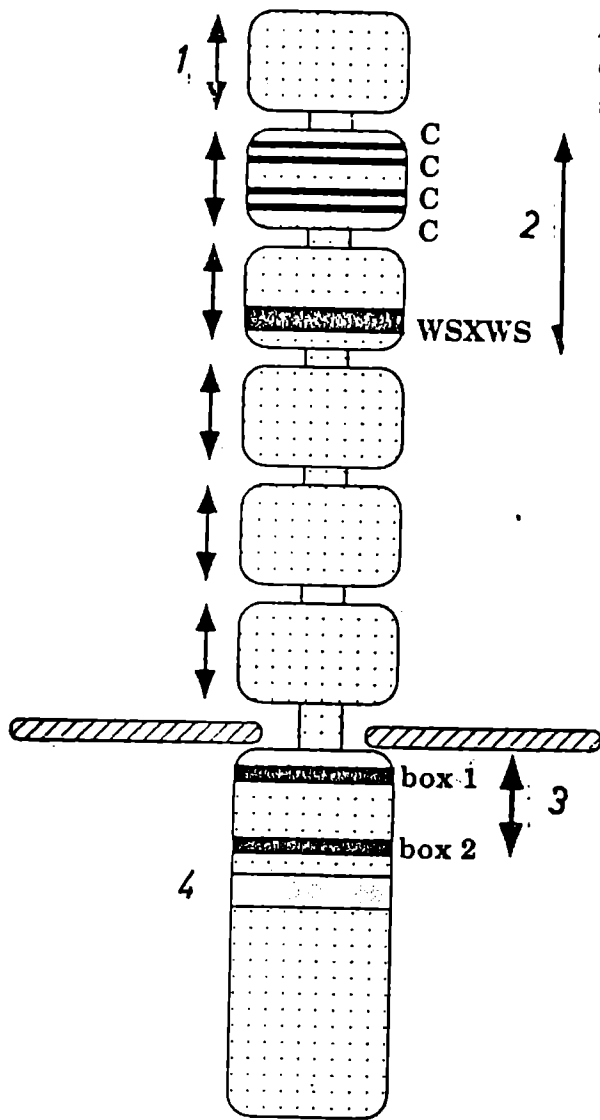
**Fig. 1.** Modelul structurii receptorului IL-6 (IL-6R), componentă de legare a lui IL-6, dedusă din secvențele aminoacid hIL-6R clonat și comparat cu membrii superfamiliei receptorilor de imunoglobuline. Domeniul Ig-like reprezintă regiunea dintre aminoacizii 20-100 (1). Conservarea a 4 reziduuri de cisteină © și motiful Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS) reprezintă asemănări cu alți membri ai receptorilor familiei de citokine.



**Fig. 2.** Ilustrarea schematică a sistemului receptorului IL-6. IL-6 cuplează la IL-6R, componenta de legare a receptorului. Aceasta permite asocierea IL-6R cu gp130, componetă a sistemului receptorului.

Gp130 este compusă din 918 aminoacizi cu un singur domeniu transmembranar. Regiunea externă conține 6 unități-un modul de fibronectină III și o regiune de 200 aminoacizi cu caractere tipice pentru familia receptorilor citokinelor (fig. 3). Cuplarea cu înaltă afinitate a IL-6 la IL-6R s-ar datora asocierii IL-6R cu gp130, care stabilizează cuplarea.

Astfel de molecule asociate la receptori de joasă afinitate au fost deja identificate pentru IL-3, GM-CSF, IL-5, NGF. Mai mult chiar, s-a stabilit că receptorii pentru IL-3, IL-5 și GM-CSF folosesc aceeași moleculă de transducție a semnalului. Acest mecanism al transducției ar explica pleiotropia funcțională și redundanța citochinelor.



**Fig. 3.** Modelul structurii glicoproteinei 130, componenta pentru transducția semnalului sistemului receptorului IL-6.

- 1 - modulul cu fibronectină tip III,
- 2 - domeniul de receptor comun familiei de citokine,
- 3 - regiune comună altor familii de receptori de citokine,
- 4 - regiune bogată în serine (după Kishimoto T. et al).

Gp 130 de șoarece arată înalte similarități cu gp130 umană; conține 116 aminoacizi cu un domeniu transmembranar. Transcriptele gp130 de șoarece sunt exprimate în toate țesuturile în care se găsesc IL-6R. Glicoproteina 130 are capacitate de transductor al semnalului, datorită a două boxe- reprezentând regiuni omoloage cu receptorii unor citochine. Ele se găsesc în regiunea citoplasmatică a gp130 (de 277 aminoacizi), în imediata vecinătate a domeniului transmembranar (fig. 3).

O secvență de 61 aminoacizi din boxa 1 și deci din imediata vecinătate a domeniului transmembranar este suficientă pentru a genera semnalul de creștere. În această boxă este inclusă o secvență prolină-x-prolină, care este prezentă la toți membrii familiei receptorilor citochinelor. Când cele două reziduuri de prolină sunt înlocuite cu serină, gp130 își pierde complet activitatea de transductor al semnalului.

Regiunea Ig este bogată în reziduuri de prolină care afectează flexibilitatea moleculară și abilitatea de a cupla complementul. Cealaltă regiune conservată (boxa 2), cu reziduurile aminiacidilor 50-61 este de asemenea, esențială pentru transducția semnalului; gp 130 își pierde activitatea când se introduce un codon terminal pentru reziduul 54.

După stimularea gp130, se constată fosforilarea unei TK asociată în complex, atât in vivo cât și in vitro. Studiul medierii semnalelor prin gp130 se poate executa pe hepatocite, deoarece IL-6 induce modificarea post-translațională a NF-IL-6 care se cuplează ulterior la elementul IL-6 responsabil al variațiilor gene ale proteinei fazei acute (fig.4) (5).

În condițiile în care IL-6 acționează asupra receptorului, gp 130 se homodimerizează. Dimerizarea induce fosforilarea intermoleculară și activarea Jak1, Jak2 și Tyk2, care apoi fosforilează tirozinele gp130.

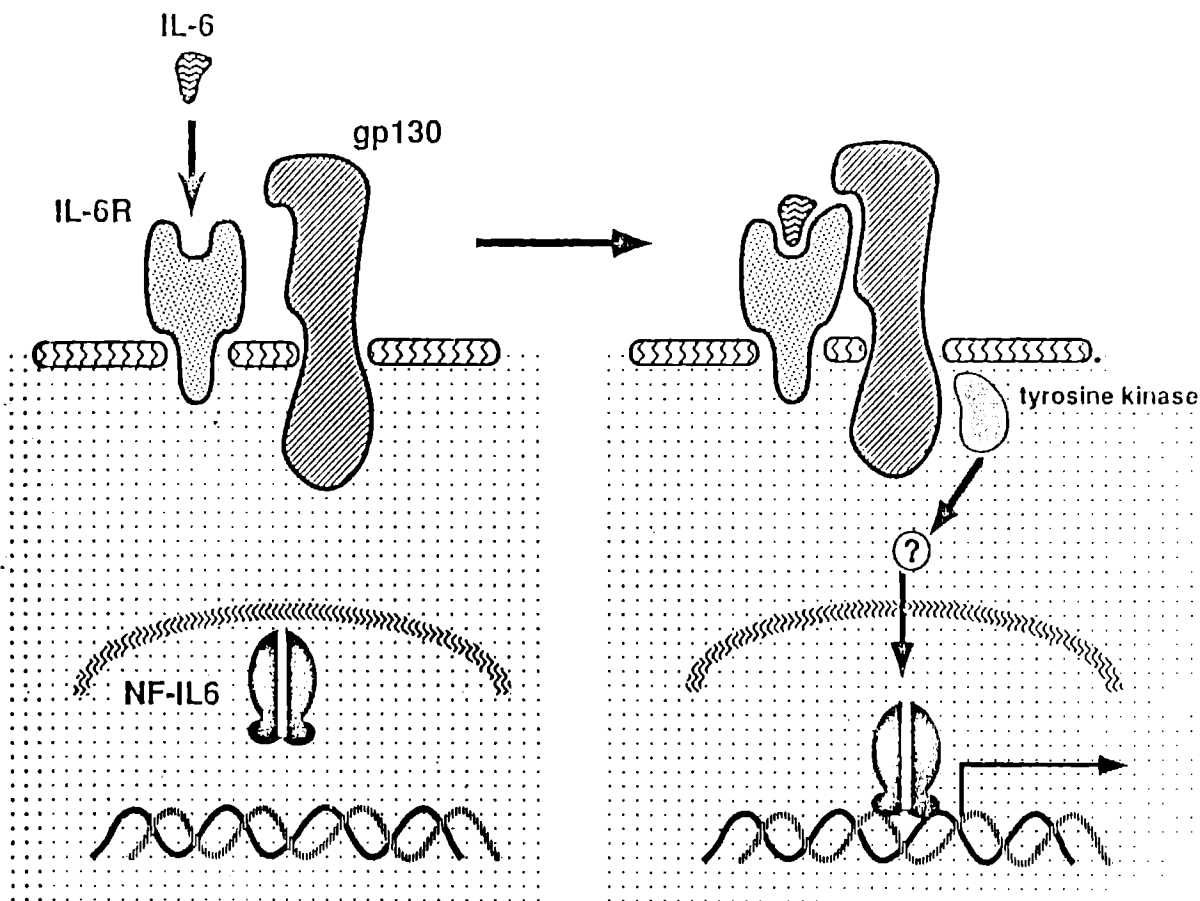
Regiunea box 3 a gp 130 conține motifs YXXQ și acționează ca un loc ce cuplează selectiv Stat 3; acesta la rândul lui, va acționa ca proteină de transcriere, ca răspuns la acțiunea IL-6.

Familia proteinelor STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) este formată dintr-o categorie de factori de transcriere ce conțin domenii SH2 și SH3-like și o tirozină de fosforilare în COOH-terminal. Kinazele Jak se asociază cu membrana citoplasmatică într-o regiune proximală a receptorului, fiind activate catalitic după cuplarea ligandului.

Kinazele Jak activate, fosforilează proteinele Stat la reziduul lor tirozinic. Proteina Stat homo- sau heterodimerizată și translocată în nucleu, acționează în procesul de transcriere pe secvențe DNA specifice (6).

Promotorul genei IL-6 este activat rapid și tranzitoriu de alte citochine precum IL-1, TNF, ca și de ester forbol și AMPc. În această regiune există o secvență unică ce conține un ritip invertit ACATTGCACAATCT, regiune care este recunoscută de factorul nuclear NF-IL-6 (fig. 4). NF-IL-6 uman are similarități cu C/EBP, un factor de transcriere hepatic specific, dar și pentru țesutul adipos. Cei doi factori C/EBF și NF-IL-6 recunosc aceeași secvență nucleotidică, dar au modele distincte ale expresiei.

În condiții normale, NF-IL-6 are un nivel scăzut, dar este rapid indus la administrarea LPS sau a citokinelor inflamatorii IL-1, TNF și IL-6. Condiția în care NF-IL-6 este identic cu IL-6 DBP (DNA Binding Protein-proteină ce poate cupla DNA) răspunde de inducția mediată de IL-6 a câtorva proteine de fază acută. Astfel, NF-IL-6 este un important factor de transcriere pe căile transducției semnalelor IL-1 și IL-6. Se sugerează că NF-IL-6 poate fi implicat în reglarea, atât a genei IL-6 cât și a altor gene (1).



**Fig. 4.** Un model al acțiunii IL-6 în hepatocite. IL-6 se cuplează la IL-6R, care în asociere cu gp130, activează un factor de transcriere-NF-IL-6-, inițiindu-se transcrierea variatelor gene ale proteinelor fazei acute (după Akira et al).

În reacția declanșată de IL-6 se produce homodimerizarea gp130 și activarea căii Jak-Stat a transducției semnalului. Se afirmă că și shc, care este omolog cu src, mediază semnalizarea IL-6 interacționând cu gp130 și Jak2-kinaza, în celulele De Few și în celulele limfomului B uman, care exprimă nivele înalte de IL-6R (p80) și subunitatea gp130.

Shc se asociază *in vivo* și *in vitro* cu gp130 și se cuplează cu Jak 2, folosind domeniul de interacțiune. Deci, proteina shc poate fi legătura funcțională pentru Jak2 în transducția semnalului IL-6 (7).

În formarea complexului IL-6/IL-6R la care se asociază gp130, IL-6R prezintă 1-2 locuri de cuplare pentru acesta. Dacă se abolesc aceste locuri de interacțiune, atunci acest receptor funcționează ca antagonist (IL-6RA), la care IL-6 tip-sălbatic, nu mai cuplează. IL-6RA este antagonist și pentru IL-11 (8).

## **Efectul IL-6 asupra unor tipuri celulare.**

IL-6 amplifică în diferite sisteme, producția de imunoglobuline de către limfocitele B primare. Deoarece s-a constatat că IL-6 este reclamat târziu în cultură, s-a admis ideea că el activează ca factor în diferențierea terminală. IL-6 amplifică puternic producția de IgM de către limfocite, efect ce poate fi blocat de anticorpii anti-IL-6.

IL-6 induce proliferarea limfocitelor T acționând sinergic cu IL-1, și având efecte în inducția citochinelor celulelor T, dar rolul pe care îl joacă în proliferarea și activarea T este minor. Se pare că T primare în cultură cu monocitele ar putea produce IL-6.

Dacă se blochează moleculele CD28 prezente pe majoritatea limfocitelor T mature implicate în relațiile celulă-celulă, prin asociere cu Ag. de activare a celulelor -B, se stimulează nivelele de producție a IL-6 de către T la fel ca în cazul monocitelor (9).

IL-6 stimulează megacariocitopoieza în măduva osoasă, determinând creșterea considerabilă a numărului plachetelor circulante. În combinație cu ligandul c-kit (factorul celulelor stem), creșterea celulelor stem este mai mare și nu a progenitorilor megacariocitelor.

În combinație cu doze mici de IL-3, IL-6 amplifică creșterea numărului megacariocitelor mature din formele imature. IL-6 în cultură celulară este de 10 ori mai activ pe megacariocite decât pe progenitorii acestora. El stimulează singur creșterea în conținut DNA și creșterea megacariocitelor, dar nu stimulează procesul eliberării plachetelor (10).

Un rol important în economia organismului privind coordonarea diferitelor gene ale hepatocitelor, au IL-6 și LIF. Acțiunea citokinelor asupra ficatului vizează răspunsul fazei acute a acestuia. Schimbările calitative și cantitative în expresia proteinelor plasmatice servesc drept criteriu definitoriu pentru unele citokine.

Experimentul pe celule hepatice de șobolan în fază acută și pe o sublinie de hepatom de șobolan- Reuber -H-35-, ca un model de cultură tisulară care răspunde la citochine la același nivel în 24 ore prin creștere și prin expresia genelor proteinelor majore în fază acută, se apreciază că IL-6 cu IL-1 și LIF stimulează genele proteinelor fazei acute.

IL-6 și LIF sunt reprezentanții unui grup de citokine care arată efecte similare în hepatocitele umane și de rozătoare. Genele care reglează proteinele plasmatică sunt de două categorii: proteinele tip 1 ale fazei acute-hepatoglobulina, gp acidă alpha , hemopexin, C3 și amiloidul seric A- depind de IL-1 și IL-6, pe când producția de proteine tip 2- fibrinogenul, macroglobulinele alpha 2, thiostatin, antitripsin alpha 1, antieliotrizin alpha, depind numai de IL-6 (11).

Inflamația acută este însoțită de schimbări în concentrația proteinelor fazei acute (APP). Se cunosc mediatorii implicați în inițierea inflamației dar nu se cunosc mediatorii implicați în rezoluția ei. Se sugerează recent că APP reglate de IL-6 sunt anti-inflamatorii și imunosupresive și că în consecință, pot regla negativ răspunsul fazei acute (12).

IL-6 poate inhiba creșterea unor linii de celule ale melanomului și carcinomului mamar și a unor linii mieloide. Pe de altă parte, IL-6 este un factor autocrin în unele malignități, în special în mieloame și limfoame. IL-6 are reacții similare cu IL-1 inducând proliferarea timocitelor. De asemenea ,induce eliberarea reacțiilor fazei acute din hepatocite. Este considerat factorul stimulator al hepatocitelor, răspuns specific care ar rezulta din inducerea unei proteine nucleare specifice ficatului, care se cuplează la regiunea promotor a genelor fazei acute.

### **Interleukin-6 și lipopolisaharidele (LPS)**

Lipopolisaharidele (LPS) sunt componente majore ale membranei externe a bacteriilor Gram-negative. Produc o varietate de efecte patofiziologice la animalele de experiență, efecte ce pot conduce la șoc endotoxic și chiar la moarte.

Efectele sunt mediate prin activarea sistemului imunitar al gazdei, în particular prin mononucleare activate de inductori ca IL-1, IL-6, TNF și NO. Factorul seric LPB (LPS-Binding Protein) care interacționează cu LPS este de importanță critică pentru activarea eficientă a fagocitelor mononucleare -macrofagele peritoneale murine.

Producția de IL-6 de către macrofagele peritoneale stimulate de LPS este supresată în prezența serului, pe când producția de NO reclamă prezența serului.

Amplificarea producției NO și supresia răspunsului IL-6 depind de concentrația serică. Aceste efecte ale serului, de potențare și inhibare, sunt mai slabe la un al doilea stimul microbial (*Staphylococcus ucis* prin căldură). Totuși, LPB din macrofagele de șoarece, nu are un rol major în răspunsul in vitro la LPS (13).

LBP este o glicoproteină de 60 kD sintetizată în hepatocite. Această proteină plasmatică cuplează la porțiunea A a lipidului din LPS și prezintă endotoxina macrofagelor diferențiate -Ag CD14-. Complexul LPS-LBP scade semnificativ concentrația LPS.

Recent, s-a descoperit o proteină de 80 kD care cuplează LPS cu specificitate pentru regiunea lipidică A. Evenimentele post receptor sunt mediate de proteinele G.

În cultură, interacțiunea LPS cu celulele țintă, hidroliza lipidului fosfatidil inozitol duce la formarea mesagerilor secunzi, inozitol polifosfați și digliceroli. De asemenea, LPS mobilizează acidul arahidonic și crește cantitatea prostaglandinelor, tromboxanilor și leucotrienelor.

Eliberarea IL-6 din macrofagele peritoneale poate fi obținută cu concentrații foarte mici de LPS și în absența serului. Deci, se sugerează existența unui mecanism care nu solicită prezența LBP. Un adaos de ser determină blocarea LPS prin LBP (14).

Citokina pleiotropă IL-6 este produsă și secretată la numeroase specii, și de celulele lobului anterior al hipofizei. Endotoxina bacteriană poate amplifica transcrierea și secreția IL-6 din celulele hipofizare de porc. Indomethacinul blochează stimularea endotoxinei și deci și producția de IL-6. Endotoxina stimulează astfel secreția IL-6, probabil prin celulele care exprimă CD14. Secreția IL-6 stimulată de endotoxină pare a fi mediată de produsele căii ciclooxygenazei (15).

## **Interleukin-6 în infecții.**

Înainte de a fi prezentate reacțiile la infecții, ale sistemului imunitar și în mod special a reacției genei IL-6, este foarte interesant de subliniat că însăși virusurile sunt în măsură să codifice polipeptide asemănătoare citokinelor. Astfel, genomul HHV-8 (Human Herpes Virus-8) codifică omologul structural al citokinei IL-6 care este implicată în patogenia sarcomului Kaposi și a altor maladii.



vIL-6, partenerul viral al IL-6 , conservă cisteina implicată în formarea punților S-S sau NH<sub>2</sub>-terminal. Regiunea implicată în cuplarea receptorului este înalt conservată în vIL-6 având capacitatea de a interveni astfel în patogeneza HHV-8.

HHV-8 este un gamma virus uman, secvențele genomului său fiind prezente în toate formele sarcomului Kaposi, în limfomul B și în boala multicentrică Castelman. Sarcomul Kaposi este o leziune multifocală influențată major de IL-6 și oncostatin M (16).

Macrofagele infectate cu *Mycobacterium bovis* Calmette Guerin sunt inhibitate în abilitatea lor de a activa limfocitele T. Cu supernatant filtrat provenit de la macrofagele infectate, această inhibiție se poate transfera la macrofagele neinfectate.

Inhibarea nu produce scăderea viabilității macrofagelor și nici nu înlătură de la suprafața celulei, MHC cl. II-a sau alte molecule accesorii necesare prezentării Ag. Efectul inhibitor a fost anulat prin Ac. neutralizanti anti-IL-6 și anti-IL-6R.

Macrofagele infectate cu *Mycobacterium* produc IL-6 de 10.000 ori mai mult decât cele neinfectate, nivele ce pot bloca răspunsul imun în infecția cu *Mycobacterii* (17). Infecția cu *Borrelia recurrentis* determină o considerabilă morbiditate LBRF (Relapsing Fever Louse Borne). Febra determinată de această spirochetă este asociată cu producerea mediatorilor inflamației, interacțiunea monocitelor cu *Borrelia* ducând la eliberarea de citokine care induc febra. IL-1, IL-6 și TNF sunt mediatorii inflamației și febrei (18).

Nivelele de IL-6 din fluidul amniotic se corelează cu infecții intra- și extraamniotice la femeile care au și contracții premature. În aceste situații, IL-6 este produs de membrana deciduală, corion și trofoblaste, ca răspuns la infecția bacteriană, astfel că, acesta devine un marker sensibil și specific pentru identificarea infecției intrauterine, intra- și extraamniotică la femei cu contracții pretimpurii. IL-6 este una din primele citochine care se eliberează în asemenea condiții (19).

În concluzie, IL-6 este implicat în numeroase procese patologice :inflamații acute și cronice, meningite, traume, arsuri, boli autoimune. Este considerat, așa cum menționam, ca unul din mediatorii inflamației. I s-a postulat chiar și un rol în neoplazie, deoarece producția lui în unele linii de celule tumorale este însemnată. Pe de altă parte, este citat și un rol antiproliferativ exercitat pe carcinomul mamar, cervical și pe melanom (20).

Infecția și alterările cauzează creșterea temperaturii ducând la eliberarea pirogenilor endogeni prin care citokina IL-1 este una din cele mai importante. Injectarea lui IL-1 beta induce, printr-o acțiune centrală, febră și creșterea termogenezei la animalele de experiență. IL-6 induce de asemenea, febră la rozătoare și deoarece concentrațiile lui circulante cresc în timpul febrei, s-a propus a fi un pirogen endogen.

Injectarea directă a IL-6 endogen în sistemul nervos central determină creșterea febrei, ceea ce susține implicarea lui în febra termogenă mediată central (21).

IL-6 are un rol în maturarea limfocitelor B pentru a produce anticorpi, contribuind astfel la răspunsul acut fiziologic la infecții și inflamații, la producerea proteinelor hepatice de fază acută și la activarea axului hipotalamo-hopofizo-adrenal (22, 23).

Citokinele IL-1 beta, IL-6 și TNF sunt efectori potenți ai secreției de ACTH. Șobolanii care au primit intrajugular rhIL-6 uman sau rmIL-6 murin au avut nivele plasmatic de ACTH, de 3-4 ori mai mari decât nivelele bazale. Administrarea separată a celor două citochine a demonstrat că IL-6 ridică producția de ACTH într-o manieră dependentă de doză și că IL-1beta este mult mai eficient. Când aceste două citochine (IL-1beta și IL-6) sunt administrate împreună, producția de ACTH are nivele semnificativ mai înalte, decât atunci când sunt administrate separat.

Incubarea celulelor pituitare cu IL-6, produce în două ore, o ușoară, dar semnificativă stimulare a secreției de ACTH, ca răspuns la dozele mai înalte. Injectarea IL-6 în ventriculul III la șobolan induce în 30 minute nivele înalte de ACTH plasmatic. Injectarea direct lângă eminența mediană produce o creștere semnificativă de ACTH. Administrarea adiacentă în nucleul paraventricular de IL-1 beta determină nivele de ACTH plasmatic elevate numai la doză mare.

IL-6 pare să inducă secreția CRF (Corticotropin Releasing Factor) și deci prin aceasta, a ACTH. El este mai puțin eficient decât IL-1 beta, dar este un aditiv important al acestuia, care este cunoscut a fi un CRF secretogen.

Axul pituitar-adrenal este stimulat de endotoxina bacteriană, demonstrându-se că IL-1 și TNF sunt stimulatori ai secreției de ACTH. Se apreciază că se acționează prin stimularea CRF hipotalamic, probabil via neuronilor eminenței mediane. TNF însă, nu acționează via unui loc cerebral. IL-6 (citochină secretogenă de ACTH) împreună cu IL-1 și TNF stimulează in vivo eliberarea lui IL-6 (24).

Ocluzia experimentală a arterei care irigă encefalul induce ischemie tisulară și apoi inflamație, inițiată la interfața microvaselor sanguine. Odată cu reducerea curentului sanguin cerebral, sunt induse citokinele care induc ischemie și inflamație.

TNF alpha, IL-1 beta, IL-6 și PAF sunt produse de parenchimul ischemic, contribuind la expresia de către celulele endoteliale, a unor receptori de adeziune ca de exemplu ICAM-1, P-Selectină și E-Selectină. Ca o consecință a alterărilor microvasculare sunt afectate relațiile endoteliilor cu astrocitele, urmate de hemoragii și injuria tisulară (25).

În încheiere, se poate afirma că IL-6 este o citochină multifuncțională cu rol în apărarea organismului datorită spectrului larg de activități imunologice și hematopoietice, dar și abilității de a induce în hepatocite, genele proteinelor de fază acută. Laolaltă cu IL-11, LIF, OSM, CT-1 și CNTF formează familia citokinelor IL-6. IL-6 prin receptorul specific ce folosește subunitatea de semnalizare gp 130 poate induce creșterea și diferențierea numeroaselor tipuri celulare.

Hiperexpresia IL-6 se poate observa în patologia unui număr de afecțiuni cum sunt mielomul multiplu, artritele reumatoide, boala Castelman, psoriasisul și osteoporaza post-menopauzală. În aceste cazuri, antagoniștii lui IL-6 pot avea efecte terapeutice (26).

## FACTORUL INHIBITOR AL LEUCEMIEI (LIF)

LIF este o citochină polifuncțională purificată din mediul condiționat de celulele L929 ce induc diferențierea celulelor M<sub>1</sub> din leucemia mieloidă murină a granulocitelor și macrofagelor. LIF a fost inclusă în familia citokinelor IL-6 respectiv, IL-6, G-CSF, OSM și CNTF (factorul neurotrofic ciliar).

LIF este o glicoproteină de 50-58 kD. Proteina pe deplin procesată are 179 aminoacizi și-i codificată de un transcript de 4 kb; este translatată cu o secvență lider N-terminală de 17 aminoacizi.

Reducerea completă a celor trei punți S-S din interiorul lanțului, duce la pierderea proprietăților biologice. Aproape jumătate din greutatea gp. este reprezentată de oligozaharide ; componenta carbohidrat a LIF nu pare a fi necesară pentru cuplarea la receptor sau pentru activitatea biologică atât in vitro cât și in vivo.

Gena LIF este localizată pe cromosomul uman 22q 12,1-12,2 și pe cromosomul -11 11 (11 A1) la șoarece, echivalent cu cel uman. În celulele sarcomului Ewing și ale neuroepiteliomului periferic, gena LIF umană este localizată și în banda t(11; 12)(q 24; q12), nivelul molecular al genei rămânând nealterat.

LIF codifică un mRNA de 4,8 kb care transcrie din trei exoni de aproximativ 8 p.b DNA. Exonul unu specifică primii 6 aminoacizi ai secvenței lider hidrofobă, restul fiind codificați de ceilalți doi exoni ai genei. LIF de la șoarece, om, oaie și porc, relevă că exonii sunt înalt conservativi, pe când intronii, cu excepția regiunii ce flanchează 5' de aproximativ 300 pb. sunt înalt neconservativi.

LIF este una din cele mai conservate citochine în sistemul hematopoietic; omologi ai genei LIF pot fi detectați în DNA de la

speciile de manifere euteriene, dar și de la câteva marsupiale. La patru specii (om, șoarece, oaie, porc), cele 6 reziduuri de cisteină din LIF sunt conservate în poziții identice sugerând că, punțile S-S intramoleculare sunt vitale pentru integrarea și activitatea moleculei LIF.

Al șaptelea reziduu cisteinic din locurile de glicozilare N-linked este menținut, cu excepția celui de la porc, sugerându-se importanța glicozilării moleculei. Cu excepția regiunii promotor, regiunile necodificante ale genei LIF a celor 4 specii de manifere nu sunt conservate.

Regiunea promotor este însă înalt conservată la om, șoarece și porc având o identitate de 84% și extinzându-se peste o regiune de 270 pb. 5' a locurilor de start transcripțional. Promotorul genei LIF la șoarece relevă 4 structuri TATA-like într-o regiune de 340 pb. 5'.

Gena LIF este transcrisă în țesuturi normale numai la nivele foarte scăzute, dar expresia ei poate crește după stimularea cu variați agenți precum LPS, TNF alpha și IL-1 beta. Transcripte LIF s-au detectat în celule embrionare, în linii de celule epiteliale, într-o linie megakariocitică și în populații de celule blaste (27).

Receptorul factorului inhibitor al leucemiei (LIF-R) este un membru al familiei receptorilor hematopoietici și deține o secvență semnal de 44 aminoacizi. Regiunea extracelulară are două domenii de hematopoietină și trei domenii de fibronectină tip III (789 aminoacizi).

Domeniul transmembranar este de 26 aminoacizi, iar cel citoplasmatic de 238 aminoacizi. LIF -R din celulele COS-7 este o glicoproteină de 190 kD ce cuplează LIF uman cu slabă afinitate, dar nu cuplează LIF de șoarece. Forma asociată gp130, care transduce semnalele este ca în receptorul IL-6 (IL-6R) (28).

Receptorul LIF s-a identificat pe celulele hematopoietice, pe celulele din măduva osoasă, timus, splină, țesut placentar, peritoneu. De asemenea, pe monocite din sânge, dar nu pe limfocite, NK, granulocite, hematii și plachete.

Celulele nehematopoietice ce exprimă LIF-R sunt celulele adipoase, hepatocitele, osteoblastele, celulele stem embrionare, celulele creștelor neurale și celulele carcinomatoase. LIF-R este asemănător cu cel al altor citochine precum IL-6, GM-CSF, IL-2 și IL-3 în care interconversia dintre starea de înaltă și joasă afinitate este caracteristică.

Astfel, o subunitate a receptorului se comportă ca o proteină ce cuplează ligandul specific de joasă afinitate, iar a doua subunitate (care

poate sau nu cupla ligandul) poate forma un complex cu ligandul ocupând prima subunitate și astfel producând un receptor de înaltă afinitate. Deci, asocierea subunităților secundare este dependentă de cuplarea ligandului la prima subunitate, determinând o rată foarte redusă a disocierii ligandului din complex.

Conversia indusă de ligand în afinitatea receptorului este rapidă și răspunde de transducția semnalelor. Dacă diferite celule produc diferite subunități - receptor, fiecare poate interacționa cu un lanț comun de cuplare LIF, ceea ce permite semnalizare calitativ diferită și oferă mecanismul ce mediază acțiunile pleiomorfe ale LIF asupra diferitelor celule (29).

Factorul inhibitor al leucemiei ar putea stimula proliferarea celulelor germinale primordiale murine *in vitro*, ceea ce permite în absența celulelor nutritive, creșterea pe scară mare ca populație de celule stem. LIF poate fi important în reglarea creșterii și în inițierea implantării blastocitelor.

Megakariocitele prezintă în membrană receptori pentru LIF, al căror număr crește odată cu maturarea celulelor. Injectarea LIF la șoareci normali induce creșterea numărului plachetelor ce ating de două ori valoarea normală, după două săptămâni de tratament. Creșterea numărului plachetelor este precedată de apariția predecesorilor megakariocitici în măduva osoasă și splină (30).

Efectul LIF *in vivo* determină cașexia și formarea excesivă a osului. Șoarecii cărora li s-au grefat celule cu înaltă producție de LIF suferă calcifierea miocardului, atrofia timusului și anomalii în cortexul adrenal.

LIF recombinat de șoarece și om stimulează resorbția *in vitro* a calvariei de la șoarece, fiind asociat cu creșterea numărului de osteoclaste active. Indometacinul, inhibitor al sintezei prostaglandinelor, folosit în același timp cu LIF, blochează creșterea resorbției osului, ceea ce demonstrează că LIF își exprimă activitatea de resorbție osoasă prin intermediul prostaglandinelor.

LIF nu stimulează direct osteoclastele. De altfel, nu este cunoscut nici un agent, care acționând direct pe osteoclaste, să resoarbă osul. Pentru promovarea formării osteoclastelor este necesară participarea celulelor stromale sau osteoblastice. Deci, acțiunea LIF pe osteoclaste este mediată de osteoblaste.

Osteoblastele au receptori pentru LIF și au capacitatea de a produce mRNA LIF în celulele calvariei, în celulele carcinomului

osteogen UMR 106 și în celulele preosteoblastice UMR 201. LIF elaborat de osteoblaste este blocat în matrice unde lipsesc factorii de creștere ai osului (TGF beta , IGF I și II , FGF și GM-CSF).

Independent de prostaglandine și deci de resorbția osoasă a calvariei de șoareci, LIF cauzează creșterea sintezei DNA în osteoblaste care, ca și precursorii acestora ,dețin receptori pentru LIF. Creșterea sintezei DNA este dependentă de doza LIF.

LIF inhibă sinteza DNA și replicarea celulelor sarcomului osteogen UMR 106, în care stimulează creșterea nivelului mRNA pentru osteopoietin, o gp.acidă prezentă în matricea extracelulară. TGF beta promovează de asemenea, sinteza DNA în osteoblaste normale, dar inhibă creșterea celulelor sarcomului osteogen.

La concentrații înalte, LIF produce o stimulare tranzitorie a sintezei DNA ce se poate constata în 24 de ore; la 72 de ore devine însă inhibitor. Acțiunea timpurie asupra osului determină stimularea replicării și diferențierii celulelor dintr-o subpopulație.

Nivele înalte circulante de LIF concordă la șoarece cu o creștere în masa trabeculară, deoarece se presupune că LIF este o citokină cu acțiune potențială asupra osului (31).

Diferite tipuri celulare exprimă constitutiv LIF în cultură: celulele epiteliale timice umane, celulele foliculare, celulele pituitare bovine, celulele carcinomului scvamos uman și o suită întreagă de celule tumorale cu proveniențe tisulare variate.

Celulele stromale ale măduvei osoase umane pot fi induse să secrete LIF în mediul de cultură, de către IL-1 alpha, IL-1 beta, TGF beta sau TNF. In vivo, LIF este exprimat abundent de glandele endometrului uterin de șoarece.

LIF, ca agent inhibitor al proliferației, se poate utiliza în tratamentul leucemiilor mieloid.



## BIBLIOGRAFIE

1. Akira, S., Isshiki, H., Nakajima, T., Kinoshita, S., Nishio Y., Natsuka S., Kishimoto, T., Regulation of expression of the interleukin-6 gene; structure and function of the transcription factor NF-IL-6, *Polyfunctional Cytokines, IL-6 and LIF*, 1992, 47-62.
2. Haegeman G., Content J., Fiers W., Localization of a putative intron in the genomic sequence of the 26kD protein (BSF-2 or, interleukin-6), *Arch. Int. Physiol. et Biochim*, 1987, 95, 5, 207.
3. Satoh T., Nokamura S., Taga T., Matsuda T., Hirano T., Kishimoto T., Kaziro Y., Induction of neuronal differentiation in PC-12 cells by B-cell stimulatory factor 2 (interleukin-6), *Mol. and Cell Biol.*, 1988, 8, 8, 3546-3549.
4. Tabibzadeh, S., Siamak-Santhanam, M., Uma-SB., Pravinkuma M., Lester T., Cytokine-induced production of IFN-beta 2/IL-6 by fresh explanted human endometrial stromal cells. Modulation by Estradiol 17 beta, *The Journal of Immunology*, 1989, 142, 9, 3134-3139.
5. Kishimoto T., Hibi M., Murakami M., Narazaki M., Saito M., Taga T., The molecular biology of interleukin-6 and its receptor, *Polyfunctional cytokines IL-6 and LIF*, 1992, 5-13.
6. Inone M., Minami M., Matsumoto M., Kishimoto T., Akira S., The Amino Acid Residues Immediately Carboxyl-terminal to the Tyrosine Phosphorylation site contribute to Interleukin-6 specific Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3, *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272, 14, 9550-9555.
7. Giordano V., De Falco G., Chiari R., Quinto I., Pelicci PG., Bartholomew L., Delmastro P., Gadina M., Scala G., Shc mediates IL-6 signaling by interacting with gp130 and jak2 kinase, *Journal of Immunology*, 1997, 158(9), 4097-4103.
8. Sun RX. et al., Interleukin-6 receptor antagoniste inhibit interleukin-11 biological activity, *European Cytokine Network*, 1997, 8(1), 51-56.
9. Aarden L A., van Kooten C., The action of interleukin-6 on lymphoid populations, *Polyfunctional Cytokines: IL-6 and LIF*, 1992, 68-73.
10. Williams N., Jackson BH., Arnold J., Kavnaudias H., The role of interleukin-6 in megakaryocyte formation, megakaryocyte development and platelet formation, *Polyfunctional Cytokines: IL-6 and LIF*, 1992, 160-170.

11. Baumann H., Marincovic-Pajovic S., Won KA., Jones VE., Campos SP., Jahreis GP., Morella KK., The activation of interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor on liver cells, Polyfunctional Cytokines IL-6 and LIF, 1992, Wiley, Chichester, Ciba Foundation Symposium, 1671, 100-124.
12. Tilg H., Dinarello CA., Mier JW., IL-6 and APP; anti-inflammatory and immunosuppressive mediators, Immunology Today, 1997, 18(9), 428-432.
13. Hirohashi N., Richards M., Morrison DC., Selective effects of serum on bacterial LPS-induced IL-6 and nitric oxide production in murine peritoneal macrophages, Journal of Endotoxin Research, 1996, 3(5), 395-405.
14. Wrigh RM., M., Holladay CS., Spangelo BL., Lipopolysaccharide Induces Interleukin-6.Release From Rat Peritoneal Macrophages. In Vitro Evidence for a Novel Mechanism, Circulatory Shock, 1993, 41, 131-137.
15. Abraham EJ., Oberst RD., Hays MP., Chapes SK., Minton JE., Effect of endotoxin on interleukin-6 secretion and messenger ribonucleic acid in porcine anterior pituitary cells. Domestic Animal Endocrinology, 1996, 13(6),491-501.
16. Neipel F et al., Human Herpesvirus 8 Encodes a Homolog of Interleukin-6, Journal of Virology, 1997, 71, 1, 839-842.
17. VanHeyningen TK., Collins H., Russel DG., IL-6 Produced by Macrophages Infected with Mycobacterium Species Suppresses T Cell Responses, The Journal of Immunology, 1997, 158, 330-337.
18. Cuevas LE., Borgnolo G., Hailu B., Smith G., Almaviva M., Hart CA., Tumour necrosis factor, interleukin-6 and C-reactive protein in patients with louse-borne relapsing fever in Ethiopia, Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 1995, 89, 1, 1-6.
19. Greig Ph.C.,Ernest JM., Teot Lisa., Mark Erikson BS.,Talley Russel MT., Amniotic fluid interleukin-6 levels correlate with histologic chorioamnionitis and amniotic fluid cultures in patients in premature labor with intact membranes, Am. J. Obstet. Gynecol., 1993, 169, 1935-1044.
20. Romero R., Sepulvedat W., Kenney JS., Archer LE., Allison C., Sehgal PB., Interleukin-6 determination in the detection of microbial invasion of the amniotic cavity, Polyfunctional Cytokines IL-6 and LIF, 1992, 205-223.
21. Matta SG., Weatherbee J., Sharp DM., A Central Mechanism is involved in the Secretion of ACTH in Response to IL-6 in Rats: Comparison to and interaction with IL-1 beta, Neuroendocrinology, 1992, 56, 516-525.
22. Rothwell NJ., Busbridge NJ., Lefevre RA., Hardwick AJ., Gauldie J., Hopkins SJ., Interleukin-6 is a centrally acting endogenous pyrogen in the rat, Can. J. Physiol. Pharmacol., 1991, 69, 1465-1469.
23. Johnson RW., Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines; an integrated view, Journal of Animal Science, 1997, 75(5), 1244-1255.
24. Abraham EJ., Minton JE., Cytokines in the hypophysis ; a comparative look at interleukin-6 in the porcine anterior pituitary gland, Comparative Biochemistry and Physiology, Part A,Physiology, 1997, 116(3), 203-207.
25. del Zoppo GJ., Microvascular response to cerebral ischemia/inflammation, Annals of the New York Academy of Sciences, 1997, 823, 132-147.

26. Simpson RJ., Hammacher A., Smith DK., Matthews JM., Ward LD., Interleukin-6; structure-function relationships, *Protein Science*, 1997, 6(5), 929-955.
27. Gough NM., Willson TA., Sthal J., Brown MA., Molecular biology of the leukemia inhibitory factor gene, *Polyfunctional Cytokines IL-6 and LIF*, 1992, 24-46.
28. Gearing DP., VandenBos T., Beckmann Patricia MP., Thut Chaterine J., Comeau MR., Mosley B., Ziegler SF., Reconstitution of high affinity leukaemia inhibitory factor (LIF) receptors in haemopoietic cells transfected with the cloned human LIF receptor, *Polyfunctional Cytokines IL-6 and LIF*, 1992, 245-259.
29. Hilton DJ., Nicola NA., Metcalf D., Distribution and binding properties of receptor for leukaemia inhibitory factor, *Polyfunctional Cytokines IL-6 and LIF*, 1992., 227-244.
30. Metcalf D., Waring P., Nicola NA., Actions of leukaemia inhibitory factor on megakaryocyte and platelet formation, *Polyfunctional Cytokines IL-6 and LIF*, 1992, 174-187.
31. Martin TJ., Allan EH., Evely RS., Reid IR., Leukaemia inhibitory factor and bone cell function, *Polyfunctional Cytokines IL-6 and LIF*, 1992, 141-150.

## **ONCOSTATIN M (OSM)**

Oncostatin M este o citokină cu structură și funcții asemănătoare cu ale citochinelor familiei IL-6. A fost identificat în 1986 datorită abilității lui de a inhiba replicarea celulelor melanomului A375 și a altor celule tumorale, dar nu a fibroblastelor umane normale.

S-a detectat în supernatantul unor tipuri de celule tumorale și în serul unor pacienți. A fost izolat din supernatantul celulelor histiocitice leucemice U937 induse cu forbol miristat acetat (PMA). De asemenea, s-a izolat din supernatantul limfocitelor T umane activate, constatându-se că acționează sinergic cu TGF beta 1 inhibând proliferarea celulelor melanomului A375.

OSM este o citokină de 28kD (prin electroforeza în gel) și de 18 kD (prin filtrare în gel). Transfecția în celulele COS a clonelor cDNA OSM izolate, conduce la producția proteinelor de 32kD și 36kD, proteine înrudite imunologic cu OSM nativ, izolat din celulele U937.

Prin procesarea proteolitică la C-terminal a 31 aminoacizi, propeptida OSM este convertită în forma matură, activă, proces care se desfășoară extracelular. Forma de 36kD are activitate scăzută in vitro față de forma 32kD.

cDNA uman OSM cuprinde 1814 pb., cu 3 exoni ce codifică o proteină de 255 reziduuri aminoacizi, care prin procesare este redusă la 228 aminoacizi. Molecula prezintă două punți -S-S- (C6-C127) și (C49-C167) - ultima fiind esențială pentru activitatea biologică. Reziduurile 100 și 277 sunt cele două locuri potențiale de N-glicozilare.

Au fost identificate similarități semnificative în organizarea generală a exonilor, în secvențele primare ale aminoacizilor și în structura secundară a OSM, cu LIF, G-CSF, IL-6 și CNTF, ceea ce sugerează evoluția acestora dintr-o origine comună cu divergență „apropiată”.

Gena OSM murină mOSM care se exprimă la nivele înalte în măduva osoasă este localizată lângă gena LIF, având activitate biologică similară cu hOSM. Gena mOSM imediat-timpurie poate fi indusă rapid și tranzitoriu cu nivele maxime la 30-60 minute, de către citochinele IL-2, IL-3 și EPO în liniile mieloide și limfoide.

La locul de inițiere a transcrierii genei, există un posibil situs de cuplare a STAT-5 care este esențial pentru activarea promotorului genei OSM, dependent de IL-2, IL-3 și EPO. Expresia dependentă de EPO-EPO-R a STAT-5 în celulele COS, conferă activarea promotorului OSM. OSM este astfel, una din cele mai comune ținte a subsetului de citokine care activează STAT-5(1).

OSM cuplează la celulele leucemice și la cele sanguine normale, deși mai puțin decât în cazul celor nehematopoietice.

## **Receptorul OSM.**

Studiile de cuplare a OSM arată existența receptorilor atât de înaltă cât și de joasă afinitate. Proteina majoră de cuplare pentru OSM este de 150kD, dar s-au identificat și două proteine minore de 68kD și 48kD, a căror semnificație nu este cunoscută.

După cuplarea la receptorul său, OSM este internalizat, proces care durează 30 minute. Activarea receptorului induce fosforilări la nivelul tirozinei și alterarea metabolismului fosfolipidelor

OSM-glicoproteină de 28kD, ca și ceilalți membri ai familiei IL-6, inițiază semnalizarea fie prin inducerea homodimerizării gp.130, fie prin heterodimerizarea acestora cu componentele LIF-R beta. Dimerizarea activează fosforilarea tirozinei PTK asociate la receptor. În celulele U266 B1 de mielom uman, OSM induce tirozin-fosforilarea și activarea kinazelor Jak 2, care interacționează direct cu Grb 2, proteină adaptor ce conține domeniul SH 2-SH 3.

Prezența lui Sos în complexul Jak 2-Grb 2 sugerează un rol al lui Ras în semnalizarea transdusă de OSM (2). Multe din citokinele familiei IL-6 utilizează gp.130 ca o subunitate receptor comună.

OSM-R biologic activ este descris ca un heterodimer al lui LIF-R și gp.130, heterodimer funcțional și pentru LIF. S-a clonat și o subunitate OSM-R beta pentru un complex OSM-R (un heterodimer gp.130/OSM-R beta) care este activat de OSM, dar nu de LIF. OSM și LIF induc fosforilarea tirozinei și activarea gp.130 (3).

OSM, LIF și IL-6 induc proliferarea celulelor plasmocitomului uman, via transductorului comun-gp.130. S-au izolat celule tumorale de la un pacient cu mielom multiplu, celule ce dețin IL-6R cu accesoriul său gp.130, și care au răspuns la OSM, IL-6, LIF, dar nu la IL-11.

Anticorpi anti-IL-6 și anti-IL-6R inhibă creșterea celulelor în prezența lui IL-6 exogen. Aceste celule tumorale eliberează IL-6 în supernatant, dar nu eliberează OSM sau LIF, ceea ce confirmă existența unui mecanism autocrin de creștere, mediat de IL-6 dar nu de OSM sau LIF.

Anticorpii anti-gp.130 inhibă complet proliferarea indusă de IL-6, OSM și LIF, de unde sugestia unei terapii a plasmocitomului cu anticorpi anti-gp.130 și anticorpi monoclonali anti-IL-6R (4).

Mai târziu s-a stabilit că OSM nu se produce autocrin în toate liniile celulare ale mielomului. Este produs de linia KAS-6/1 și de asemenea, s-a identificat în supernatantul liniei DP-6. Deci, OSM este produs în linii distincte ale mielomului uman. OSM amplifică intens secreția de Ig. fără să afecteze creșterea celulară. Natura răspunsului celulelor mielomului la acțiunea OSM este distinctă de efectele lui asupra limfocitelor B normale.

Expresia autocrină a oricărei citokine care utilizează gp.130 induce un potențial de creștere semnificativ a tumorii. IL-6 a fost de asemenea, detectat ca factor de creștere autocrin al celulelor mielomului-via IL-6R și gp.130 (5).

Toți membrii familiei de citokine IL-6 care folosesc acelaș lanț de transmitere a semnalului, respectiv gp.130 sunt implicați în afecțiuni inflamatorii și tumorale.

Liautard et al. (6) au obținut 18 anticorpi anti-gp130 demonstrând că abilitatea acestora de a inhiba proliferarea liniilor celulare de mielom nu este egală, de unde concluzia că gp130 conține diferiți epitopi implicați specific în semnalizarea indusă de citokinele familiei IL-6.

IL-6 și IL-11 induc homodimerizarea gp130, în timp ce LIF, OSM și CNTF îi determină heterodimerizarea. IL-6, IL-11 și CNTF reclamă de asemenea, subunitatea- alpha , specific determinată și implicată direct în semnalizare.

Linii celulare din calvaria și măduva osoasă murină, ca și linii de osteoblaste-like murine și umane dețin cele două subunități alpha și beta ale receptorilor familiei de citokine IL-6.

Celulele stromale/osteoblaste sunt ținte pentru acțiunea tuturor membrilor acestei familii ce au ca parte a receptorului transductorul semnalului gp130 (7). Existența gp130 s-a demonstrat și în neurolemă, în oligodendoglie și în zona subependimară, la toate etajele encefalului de șobolan, ceea ce permite citokinelor care folosesc acest receptor să intervină substanțial în reglarea activității specifice celulelor nervoase și gliale (8).

Gp130 se exprimă și în membrana celulelor mamare, în majoritatea cazurilor, alături de lanțul alpha al receptorului pentru IL-6, LIF, IL-11 și CNTF. Proliferarea liniilor celulare mamare este inhibată în proporție de 3% în cazul expunerii la OSM însă, IL-11 inhibă 2/4 din acestea, iar IL-6 și LIF, 1/4. Prezența în proporție de 95% a gp130 în membranele celulelor mamare tumorale sugerează că această moleculă are un rol deosebit și în reglarea creșterii celulelor mamare normale și tumorale (9).

IL-10 în celulele mielomului uman, prin inducția pe cale autocrină a OSM, poate fi factor de creștere, printr-un mecanism independent de IL-6. Deși IL-10 nu implică transductorul gp130-IL-6 uman, totuși el este blocat de anticorpul anti-gp130-IL-6.

În culturile de celule de mielom uman nu se produc citokinele IL-6, IL-11 și LIF, ci numai OSM. Acesta este inactiv în lipsa lui IL-10 datorită absenței unui receptor - OSM funcțional pe celulele mielomului. IL-10 induce apariția receptorului LIF care produce o buclă pentru OSM autocrin funcțional.

Trei din șase pacienți dețin linii celulare de mielom, linii care elaborează IL-10 autocrin și exprimă constitutiv LIF-R. Astfel, linia XG-7 produce IL-10, OSM și IL-6 și exprimă LIF-R. Linia XG-7 folosește OSM și IL-6 ca factori de creștere autocrini.

IL-10 ar putea induce IL-11R și în celulele mielomului, conferindu-le acestora sensibilitate la IL-11. Toți factorii de creștere ai celulelor mielomului implică activarea transactivatorului gp130-IL-6 (10).

## Efectele OSM

RhOSM, în funcție de doză, fie stimulează eliberarea proteoglicanilor, fie supresează sinteza acestora în explantele de cartilaj de porc și capră. Reacții similare declanșează și LIF, IL-11 și CNTF. Aceste similarități funcționale sunt puse și pe seama componentei gp130 comună receptorilor acestor citokine care însă, nu explică complet aceste asemănări funcționale (11).



Fibroblastele derivate din sinovia pacienților cu artrite reumatoide exprimă comparativ cu pacienții cu osteoartrite, nivele înalte de mRNA pentru IL-6, IL-11, LIF dar nu și pentru mRNA-OSM.

În lichidul sinovial, pe lângă IL-6, IL-11 și LIF se găsește și OSM, care însă, în artritele reumatoide este sintetizat de macrofagele țesutului sinovial (12). OSM activează celulele sinoviale fibroblast-like producând urokinaza 2 care activând plasminogenul se implică în patogeneza artritelor reumatoide.

În carilajele articulare umane, OSM are abilitatea de a stimula TIMP-1 (inhibitor tisular al matricei metaloproteinazelor) având astfel și un rol protectiv în distrucția cartilajelor articulare umane (13).

OSM modulează morfologia celulelor endoteliale și de asemenea, reglează și activitatea fibrinolitică in vitro. Creșterea celulelor endoteliale poate fi inhibată de OSM, LIF și TGF beta elaborate de celulele macrofag-like U937. Din cei 3 factori menționați, OSM este considerat, în funcție de doză, cel mai potent inhibitor (14).

OSM poate fi și un modulator al producerii citokinelor înrudite, din celulele endoteliale. Astfel, se susține că IL-6 indus de OSM este un inhibitor direct al creșterii carcinomului mamar uman, putând fi folosit pentru determinarea valorii proliferative a celulelor din cancerul mamar.

Koskela K. et al (15) au constatat că cele două linii de mielom uman multiplu analizate, secretă OSM și IL-6, dar nu IL-11 sau LIF, sugerând ideea că primele două citokine au un rol important în creșterea celulelor mielomului. Anticorpi monoclonali anti-OSM au efecte diferite asupra celulelor din liniile mielomului, fapt ce conduce la ideea că producția de OSM și răspunsul celulelor mielomului, depind de fenotipuri celulare distincte și nu întotdeauna de OSM. Anticorpul anti-OSM nu are efecte semnificative asupra creșterii celulelor KP-6 și DP-6, deși OSM a fost detectat în supernatantul liniilor murine DP-6. În cazul liniei KAS-6/1 are loc producția autocrină de OSM, anticorpi monoclonali anti-OSM inhibând creșterea acestor linii.

Expresia autocrină a oricărei citochine ce utilizează gp130, poate avea semnificativă amplificare în evoluția tumorii (5).

Terapia antitumorală cu OSM se bazează, în primul rând, pe creșterea producției locale de IL-6 care poate avea efect antiproliferativ direct. OSM poate activa și alte citokine cu efect stimulator asupra limfocitelor T citotoxice.

## BIBLIOGRAFIE

1. Yoshimura A., Ichihara M., Kinjyo I., Moriyama M., Copeland NG., Gilbert DJ., Jenkins NA., Hara T., Miyajima A., Mouse oncostatin M; an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT 5 pathway, *EMBO Journal*, 1996, 15(5), 1055-1063.
2. Chauhan D., Kharbanda SM., Ogata A., Urashima M., Frank D., Malik N., Kufe DW., Anderson KC., Oncostatin M induces association of Grb 2 with Janus kinase JAK 2 in multiple myeloma cells, *Journal of Experimental Medicine*, 1995, 182(6), 1801-1806.
3. Mosley B., De Imus C., Friend D., Boiani N., Thoma B., Park LS., Cosman D., Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative conferring OSM-specific receptor activation, *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271 (51), 32635-32643.
4. Nishimoto N. et al., Oncostatin M, leukemia inhibitory factor and interleukin-6 induce the proliferation of human plasmacytoma cells via the common signal transducer gp 130, *Journal of Experimental Medicine*, 1994, 179(4), 1343-1347.
5. Westendorff JJ., Jelinek DF., Growth regulatory pathways in myeloma. Evidence for autocrine oncostatin M expression, *Journal of Immunology*, 1996, 157(7), 3081-3088.
6. Liautard J., Sun RX., Cotte N., Gailard JP., Mani JC., Klein B., Brocher J., Specific inhibition of IL-6 signalling with monoclonal antibodies against the gp 130 receptor, *Cytokine*, 1997, 9(4), 233-241.
7. Bellido T. et al., Detection of receptors for interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, oncostatin M and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteoblastic cells, *Journal of Clinical Investigation*, 1996, 97(2), 431-437.
8. Watanabe D. et al., Characteristic localization of gp 130 ( The signal-transducing receptor component used in common for IL-6/IL-11/CNTF/OSM) in the rat brain, *European Journal of Neuroscience*, 1996, 8(8), 1630-1640.
9. Douglas AM. et al., Expression and function of members of the cytokine receptor superfamily on breast cancer cells, *Oncogene*, 1997, 14 (6) 661-669.
10. Gu ZJ et al., Interleukin-10 is a growth factor for human myeloma cells by induction of an oncostatin M autocrine loop. *Blood*, 1996, 88(10), 3972-3986.

11. Hui W., Bell M., Carroll G., Oncostatin M (OSM ) stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in porcine articular cartilage explants, *Cytokine*, 1996, 8 (6), 495-500.
12. Okamoto H. et al., The synovial expression and serum levels of interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor and oncostatin M in rheumatoid arthritis, *Arthritis and Rheumatism*, 1997, 40 (6) 1096-1105.
13. Nemoto O., Yamada H., Mukaida M., Shimmrei M., Stimulation of TIMP-1 production by oncostatin M in human articular cartilage, *Arthritis and Rheumatism*, 1996, 39 (4), 560-566.
14. Takashima S., Klagsbrun M., Inhibition of endothelial cell growth by macrophage-like U-937 cell-derived oncostatin M, leukemia inhibitory factor, and transforming growth factor beta 1, *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(40), 24901-24906.
15. Koskela K. et al., Serum oncostatin M in multiple myeloma; association with prognostic factor c, *British Journal of Haematology*, 1997, 96 (1), 158-150.

## CARDIOTROFIN-1 (CT-1)

Cardiotrofin-1 este o citokină pleiotropică cu potențial de a induce creșterea și diferențierea celulelor. Este un nou membru al familiei citokinelor IL-6, identificat dintr-un cDNA de embrion de șoarece, prin expresia clonării.

Astfel, din celulele stem s-a izolat această proteină de 21,5kD care induce in vitro, hipertrofia cardiomiocitelor, reacție pe care o determină prin utilizarea gp130-subunitate caracteristică a receptorului întregii familii de citokine IL-6.

Proteina de 201 reziduuri aminoacizi-CT-1- de la om este homoloagă în proporție de 80% cu cea de la șoarece. Partea codificantă a genei CT-1 deține 3 exoni localizați în cromosomul uman 16p11, 1-16p11,2.

mRNA-CT-1 de 1,7kb a fost detectat în inimă, mușchii scheletici, ovar, colon, prostată și testicule de adulți și în rinichii și plămâni fetali, iar mRNA-CT-1 de 1,4 kb, în inimă și câteva alte țesuturi de șoarece (1, 2, 3).

Cardiotrofin-1 induce hipertrofia cardiacă și in vivo; nu este o citokină specifică pentru inimă, deoarece stimulează și creșterea ficatului, rinichilor, splinei dar determină și atrofia timusului și creșterea plachetelor fără a le schimba volumul.

Deci, CT-1 are un spectru larg de activități biologice in vivo confirmând constatările făcute in vitro (4). cDNA CT-1 de la șobolan codifică o proteină care are identitate în aminoacizi, în proporție de 90% cu CT-1 de la șoareci.

Cantități semnificative de mRNA-CT-1 s-au detectat în ventriculul inimii de șobolan adult și de asemenea, în plămâni, rinichi, mușchi scheletici, stomac și vezica urinară. Nivelele de mRNA-CT-1 cresc semnificativ la șobolanii de 12 săptămâni însoțite fiind de hipertensiune spontană (5).

CT-1 este exprimat la nivele înalte în miocard. În timpul cardiogenezei induce proliferarea și supraviețuirea cardiomiocitelor embrionare. Cardiotrofin-1 activează gp130 în timpul cardiogenezei, ceea ce indică faptul că citokinele care semnalizează prin gp130 apar ca reglatori potenți ai dezvoltării inimii ca și ai hipertrofiei cardiace la adulți.

Este motivul pentru care se studiază evoluția miocitelor în timpul dezvoltării inimii, în ideea clarificării stării de hipertrofie cardiacă la adult. Cardiotrofin-1, activează câteva procese ale hipertrofiei cardiomiocitelor in vitro, printre care organizarea sarcomerului și expresia genei embrionare CT-1.

CT-1 relevă similarități structurale cu IL-6 și subunitatea gp130 din receptor, subunitate comună familiei IL-6; are de asemenea, similarități în special cu LIF-R. Receptorul cardiotrofin-1 (CT-1R) este compus dintr-un complex tripartit similar cu LIF-R.

CT-1R exprimat la suprafața celulelor neuronale umane este activat de CT-1 la nivelul gp130 și gp190/LIF-R beta. Pentru semnalizarea lui CT-1 este esențială gp130 în vederea constituirii heterocomplexului gp130-gp190.

Anticorpul anti-gp130 oprește semnalizarea lui CT-1. CT-1 induce și utilizează Jak-1, Jak2 și Tyk care, la rândul lor, utilizează factorul de transmitere STAT-3.

Cuplarea încrucișată a CT-1 iodată pe CT-R la suprafața celulelor a dus la identificarea unui al treilea component-subunitatea alpha de 80kD în adiție la gp130 și gp190. Îndepărtarea componentei alpha a carbohidratului legat la N- duce la formarea unei proteine alpha de 45kD. CT-1R este compus dintr-un complex tripartit asemănător cu receptorul de înaltă afinitate pentru CNTF (6).

Toate datele care relevă activitatea lui CT-1 și a membrilor familiei IL-6 susțin importanța în transmiterea semnalelor a subunității gp130 a receptorului. CT-1 induce fosforilarea gp130 și astfel acționează pe LIF-R în cultură de cardiomiocite.

Semnalele emise de gp130 și LIF-R sunt asociate hipertrofiei cardiomiocitelor. În mod asemănător, hiperexpresia IL-6 și IL-6R la șoarecii transgenici duce la o tirozinfosforilare constitutivă a gp130 în miocard și la hipertrofia cardiacă.

Mutații în gp130 determină hiperplazie ventriculară severă (7). În complexul CT-1R-gp130, lanțurile de cuplare specifice nu au domenii intrinseci TK, dar CT-1 se asociază la tirozinkinaze citoplasmatic.

Homo- sau heterodimerizarea gp130 conduc la activarea TK citoplasmatică și ulterior la modificarea factorilor de transcriere. Astfel, receptorul activat de la suprafața celulei, va transmite semnale genelor nucleare prin seria schimbărilor biochimice declanșate, schimbări care culminează cu tirozinfosforilarea și activarea unui factor de transcriere citoplasmatic latent STAT3 (Semnal Transducer și Activator al Transcrierii) (8, 9).

Blocarea gp130 cu un anticorp monoclonal inhibă complet inducția c-fos la acțiunea CT-1. În mod similar, c-fos este inactivat și prin blocarea lui LIF-R beta, astfel că și LIF-R beta este necesar în răspunsul hipertrofic al cardiomiocitelor. Stimularea cu CT-1 duce la creșterea în lungime a cardiomiocitelor.

CT-1 induce un model distinct de gene imediat-timpurii care reglează superior gena factorului atrial natriuretic (ANF) și nu afectează expresia actinei alpha sau a lanțului luminos de miozină-2v. În contrast cu stimularea alpha-adrenergică, CT-1 activează o formă distinctă de hipertrofie a cardiomiocitelor care, contribuie la asamblarea sarcomerelor în serie, via căilor de semnalizare dependente de gp130/Lif-Rbeta (10)

CT-1 este predominant exprimat în tubul cardiac al embrionului timpuriu (E8.5-10.5) este exprimat primar în celulele miocardului și nu se exprimă în endocard sau pericard. După E12,5, CT-1 se exprimă și în alte țesuturi. CT-1 și LIF care au aceeași receptori contribuie la supraviețuirea cardiomiocitelor neonatale, pe când IL-6 și CNTF nu au acest efect. CT-1 conduce creșterea de aproximativ două ori a proliferării cardiomiocitelor.

În timpul creșterii și morfogenezei inimii, CT-1 are rol autocrin în supraviețuirea și proliferarea miocitelor imature, via căilor de semnalizare dependente de gp130 (11). Embrionii de șoarece cu deficit de gp130 relevă în ziua a zecea, un miocard hipoplazic fără defect septal sau trabecular. În plus dețin un număr redus de progenitori hemopoietici pluripotenți. Embrionii cu deficit de gp130 au anemie datorată afectării liniei eritroide. În concluzie, gp130 are un rol crucial în dezvoltarea miocardului și hematopoiezei în timpul dezvoltării embrionare (12).

Testarea a 37 noi anticorpi monoclonali anti-gp130 a condus la clasificarea acestora în 10 grupe; ei recunosc 18 epitopi la gp130. S-a demonstrat că diferiți epitopi de gp130 ar fi implicați specific în semnalizarea indusă de citokinele familiei IL-6 (13).

Supraviețuirea cardiomiocitelor este de importanță centrală în menținerea funcției inimii, dereglările acesteia conducând la o mare varietate de afecțiuni cardiace. După deprivarea de ser se produce apoptoza

muşchiului cardiac. CT-1 este un potent factor de supraviețuire cardiacă, capabil să inhibe apoptoza cardiomiocitelor; el activează atât transductorul semnalului cât și căile dependente de STAT3 și MAP (Mitogen Activated Protein). Transfecția MAP-kinazei-1 (MEK-1), o mutantă cDNA negativ în celulele miocardice, blochează efectele antiapoptotice ale CT-1, reclamând calea MAP-kinazei pentru efectul de supraviețuire al acestuia.

Un inhibitor MEK-specific (PD098059), poate bloca activarea MAP-kinazei ca și efectul de supraviețuire a CT-1. Acest inhibitor nu blochează activarea STAT3, și nici nu are un efect asupra răspunsului hipertrofic, ce apare în urma stimulării cu CT-1. Astfel, CT-1 contribuie la supraviețuirea cardiomiocitelor via activării unei căi de semnalizare antiapoptozice, care reclamă MAP-kinazele, în timp ce hipertrofia indusă de CT-1 poate fi mediată prin căi alternative precum Janus-kinaza/STAT sau MEK-kinaza/c-jun NH2-terminal peptidinkinaza (14).

CT-1 poate inhiba producția TNF în inimă și ser, la animalele tratate cu LPS, iar in vitro, în celulele sanguine de șoarece. CT-1 de altfel, inhibă producția de TNF întocmai ca IL-6, LIF și CNTF. Deci, el poate juca un rol protector în unele boli mediate de TNF (15).

### **Cardiotrofin-1 și proteinele fazei acute**

CT-1, ca de altfel toți membrii familiei citochinelor IL-6/LIF/CNTF/OSM/IL-11, induce expresia genelor proteinelor hepatice ale fazei acute (APP). În funcție de doză, CT-1 declanșează la șobolan, elaborarea unui număr de proteine ale fazei acute de către hepatocitele primare de la șobolan. Sunt astfel produși : inhibitorul 1-cisteinproteinazei (alpha-1-CP-I), inhibitorul alpha 1-proteinază (alpha1Pi), alpha2-macroglobulina, alpha1 -glicoproteina acidă, care sunt marcat crescuți la 48 și 72 ore.

În celulele H35 de șobolan, CT-1 stimulează producerea de alpha1 Pi, alpha1-CPI și induce mRNA pentru alpha1-CPI. În celulele H35, CT-1 precum OSM și LIF induce nivele crescute ale proteinelor fazei acute, iar IL-6 induce nivelele cele mai înalte de alpha1-CPI și alpha1-Pi în aceste celule.

CT-1 pe celulele HepG2 de hepatom uman, produce în concentrații reduse, alpha1 chimotripsină și nu modifică producția de hepatoglobulina sau alpha1-Pi. OSM și IL-6 induc nivele mai înalte de sinteză a proteinelor fazei

acute, pe când acțiunea LIF este similară cu a CT-1. CT-1 uman este in vitro, un potent mediator al fazei acute pentru hepatocitele de șobolan, activitatea lui fiind similară cu a lui LIF pe celulele H-35 și HepG2. Celulele hepatomului de șobolan stimulate de CT-1 și LIF exprimă într-o măsură remarcabilă, mRNA de fibrinogen (16, 17).

IL-6 este privit ca cel mai potent inductor al sintezei proteinelor de fază acută (APP). IL-6 și citochinele familiei tip IL-6 activează calea JAK/STAT și în final reglează expresia APP în celulele hepatice. Incubarea hepatocitelor umane cu HGF/SF, ca și a celulelor hepatomului HepG2 duce la activarea factorului de transcriere STAT-3, activare care nu apare înainte de 5-7 ore și se menține până la 28 ore, ceea ce contrastează cu activarea rapidă și tranzitorie a STAT-1 și STAT-3, mediată de IL-6 (18).

### **Cardiotrofin-1 și neuronii**

Pentru supraviețuirea motoneuronilor embrionari sunt reclamați factori derivați din mușchi. CT-1 se exprimă la nivele înalte în mugurii embrionari ai membrilor, fiind secretați de miotubulii diferențiați. In vitro, CT-1 menține în stare viabilă timp de două săptămâni, 43% din motoneuronii de șobolani E14, iar in vivo protejează motoneuronii nervului sciatic de la nou-născut, contra efectelor axotomie. CT-1 poate fi important în dezvoltarea normală a motoneuronilor și de asemenea, ca un potențial remediu, în încetinirea sau stoparea unor afecțiuni (19).

CT-1 induce supraviețuirea neuronilor simpatici de șobolan și contribuie la supraviețuirea neuronilor dopaminergici și neuronii ciliari de pui. Deci, CT-1 are un larg spectru de activitate hematopoietică și neuronală, acționând via LIF-R prin subunitatea gp130 (20).



## BIBLIOGRAFIE

1. Pennica D., King KL., Shaw KJ., Luis E., Rullamas J., Luoh SM., Darbonne WC., Knutzon DS., Yen R., Chien KR et al., Expression cloning of cardiotrophin-1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92 (4), 1142-1146.
2. Pennica D., Swanson TA., Shaw KJ., Kuang WJ., Gray CL., Beatty BG., Wood WI., Human cardiotrophin-1; protein and gene structure, biological and binding activities and chromosomal localization, *Cytokine*, 1996, 8 (3), 183-189.
3. Pennica D., Wood WI., Chien KB., Cardiotrophin-1; a multifunctional cytokine that signals via LIF receptor gp130-dependent pathways, *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 1996, 7 (1), 81-91.
4. Jin H., Yang R., Keller GA., Ryan A., Ko A., Finkle D., Swanson TA., Li W., Pennica D., Wood WI., Paoni NF., In vivo effects of cardiotrophin-1, *Cytokine*, 1996, 8 (12), 920-926.
5. Ishikawa M., Saito Y., Miyamoto Y., Kuwahara K., Ogawa E., Nakagawa D., Harada M., Masuda I., Nakao K., cDNA cloning of rat cardiotrophin-1 (CT-1); augmented expression of CT-1 gene in ventricle of genetically hypertensive rats, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 219 (2), 377-381.
6. Robledo O., Fourcin M., Chevalier S., Guillet C., Auguste P., Pouplard-Barthelaix A., Pennica D., Gascon H., Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component, *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (8), 4855-4863.
7. Wollert KC., Chien KR., Cardiotrophin-1 and the role of gp130-dependent signaling pathways in cardiac growth and development, *Journal of Molecular Medicine*, 1997, 75 (7), 492-501.
8. Taga T., The signal transducer gp130 is shared by interleukin-6 family of haematopoietic and neurotrophic cytokines, *Annals of Medicine*, 1997, 29 (1), 63-72.
9. Taga T., Gp130, a shared signal transducing receptor component for haematopoietic and neurotrophic cytokines, *Journal of Neurochemistry*, 1996, 67 (1), 1-10.
10. Wollert KC., Taga T., Saito M., Narazaki M., Kishimoto T., Glembotski CC., Vernallis AB., Heath JK., Pennica D., Wood WI., Chien KR., Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy. Assembly of sarcomeric units in series via gp130-leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways, *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271 (16), 9535-9545.

11. Sheng Z., Pennica D., Wood WI., Chien KR., Cardiotrophin-1 displays early expression in the murine heart tube and promotes cardiac myocyte survival, *Development*, 1996, 122 (2), 419-428.
12. Yoshida K., Taga T., Saito M., Suematsu S., Kumanogoh A., Tanaka T., Fujiwara H., Hirata M., Yamagami T., Nakahata T., Hirabayashi T., Yoneda Y., Tanaka K., Wang WZ., Mori C., Shiota K., Yoshida N., Kishimoto T., Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin-6 family of cytokines, leads to a myocardial and hematological disorders, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93 (1), 407-411.
13. Liautard J., Sun RX., Cotte N., Gaillard JP., Mani JC., Klein B., Brochier J., Specific inhibition of IL-6 signalling with monoclonal antibodies against the gp130 receptor, *Cytokine*, 1997, 9 (4), 233-241.
14. Sheng Z., Knowlton K., Chen J., Hoshijima M., Brown JH., Chien KR., Cardiotrophin-1 (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. Divergence from downstream CT-1 signals for myocardial cell hypertrophy, *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (9), 5783-5791.
15. Benigni F., Sacco S., Pennica D., Ghezzi P., Cardiotrophin-1 inhibits tumor necrosis factor production in the heart and serum of lipopolysaccharide-treated mice and in vitro in mouse blood cells, *American Journal of pathology*, 1996, 149 (6), 1847-1850.
16. Richards CD., Sacco S., Pennica D., Ghezzi P., Gauldie J., Murine cardiotrophin-1 stimulates the acute-phase response in rat hepatocytes and H35-hepatoma cells, *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 1996, 16 (1), 69-75.
17. Peters M., Roeb F., Pennica D., Meyer zum Buschenfelde KH., Rose-John S., A new hepatocyte stimulating factor; cardiotrophin-1 (CT-1), *FEBS Letters*, 1995, 372 (2-3), 177-180.
18. Schaper F., Siewert E., Gomez-Lechon MJ., Gatsios P., Sachs M., Birchmeier W., Heinrich PC., Castell J., Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) signals via the STAT 3/APRF transcription factor in human hepatoma cells and hepatocytes, *FEBS Letters*, 1997, 405 (1), 99-103.
19. Pennica D., Arce V., Swanson TA., Vejsada R., Pollock RA., Armanini M., Dudley K., Phillips HS., Rosenthal A., Kato AK., Henderson CE., Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons, *Neuron*, 1996, 17 (1), 63-74.
20. Pennica D., Shaw KJ., Swanson TA., Moore MW., Shelton DL., Zioncheck KA., Rosenthal A., Taga T., Paoni NF., Wood WI., Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex, *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 (18), 10915-10922.

## **Factorul Neurotrofic Ciliar ( CNTF )**

Factorul neurotrofic ciliar este membru al familiei citokinelor neurotrofice. Este un monomer de 22kD care s-a izolat inițial din ganglionii ciliari ai embrionilor de pui, în 1979. În timpul dezvoltării embrionare, expresia CNTF este foarte scăzută.

CNTF determină *in vitro* supraviețuirea sau diferențierea neuronilor din sistemul nervos periferic și a multora din sistemul nervos central: induce creșterea axonilor. Transducția semnalului apare pe calea complexului CNTF-R, LIF-R, IL-6R și a transductorului semnalului- gp130 ( non-ligand binding). CNTF, LIF, OSM, IL-6 și IL-11 sunt citokine înrudite, având funcții asemănătoare. CNTF însă, contribuie la activitatea de supraviețuire a neuronilor ganglionilor spinali de nou născuți și de pui de șobolan, exercitând un efect trofic asupra acestora.

IL-11 uman și IL-6 murin nu contribuie la facilitarea supraviețuirii neuronilor. CNTF și LIF uman și murin au proprietăți neurotrofice speciale în comparație cu alte citokine (1).

Se presupune că CNTF are un rol local ca răspuns la traumele măduvei spinării. După secționarea hemilaterală a măduvei la nivelul vertebrei toracale 2, nivelele mRNA-CNTF-R alpha, cresc dramatic după o oră, în motoneuronii măduvei caudale, în timp ce nivelul mRNA-CNTF crește identic atât în partea cranială cât și caudală a măduvei. În zilele 1-5, nivelele de mRNA-CNTF-R alpha și CNTF declină, pentru ca în ziua a 10-a, să revină la normal (2).

Neuronii reclamă suport trofic nu numai în timpul dezvoltării ontogenetice inițiale, ci și în tot timpul vieții. Când neuronii sunt afectați metabolic sau toxic, moleculele ce contribuie la supraviețuirea lor sunt cruciale. Astfel, neurotrofina, TGF, IGF, EGF/TGF alpha, IL și CNTF, care în majoritate provin din striatum și substanța neagră, protejează neuronii agresați nigrostriatali dopaminergici atât în cultură cât și în modele de

Parkinson indus la animale. CNTF funcționează ca un factor de menținere și reparare a neuronilor motori adulți (3, 4).

Crestele neurale produc la doze mici de CNTF un număr mare de celule adrenergice, în timp ce la doze mari, numărul acestora scade față de control. Se concludde astfel că, CNTF poate afecta dezvoltarea adrenergică a creșterii neuronilor în cultură, într-o manieră bifazică dependentă de doză.

In vitro, reacțiile sunt asemănătoare atât asupra nervilor motori, cât și a celor sensitivi ceea ce înseamnă că, doza poate fi un indiciu pentru tratamentul anumitor boli ale sistemului nervos periferic (5, 6).

În cazul când survine moartea naturală a neuronilor la noii născuți, CNTF poate amplifica supraviețuirea acestora.

Motoneuronii nucleului spinal bulbo-cavernos mor în număr mult mai mare la embrionii târzii și la nou născuți femele, decât masculi. Însă tratați cu CNTF din a 22-a zi de viață intrauterină până la a 3-a zi postnatală, relevă 70 % mai mulți motoneuroni. Rezultă astfel că, CNTF are potențialul de a prezerva motoneuronii anulându-le apoptoza (7).

Celulele Purkinje derivate din fetusurile de 16 zile de șobolan tratate cu CNTF, răspund rapid prin inducția proteinei c-fos. Tratarea 8 zile cu doze mici de CNTF duce la creștere de 1,6 ori a numărului celulelor Purkinje. Se susține astfel, efectul distinct al CNTF asupra supraviețuirii acestor neuroni, dar de asemenea, se presupune că este posibil același efect pe alți nuclei cerebeloși (8).

În timpul dezvoltării urechii interne, celulele ganglionare ale nervului statoacustic cresc în prezența CNTF și a factorului derivat din otocist, însă acesta din urmă nu ar influența dezvoltarea urechii, în cazul în care este administrat singur (9).

CNTF și CNTF-R (mRNA și proteinele) se exprimă în fazele timpurii ale neurogenezei și a diferențierii retinei. Celulele gliale Muller specifice retinei reprezintă sediul elaborării CNTF, care acționează asupra neuronilor timpurii via CNTF-R alpha pe care îi dețin. Suplimentarea locală cu CNTF în cultură de neuroni, arată că această citokină are un rol regulator în dezvoltarea variatelor tipuri de celule retiniene, inclusiv asupra celor ganglionare. Se concludde astfel, că factorii neurotrofici pot acționa și local (10).

În mod normal, mRNA-CNTF este prezent la nivele foarte scăzute în sistemul nervos central de la șobolanul adult. Leziunile induse în creierul șobolanilor adulți secretă factorul neurotrofic ciliar. Astfel, în cortexul hipocampal lezat, nivelele de mRNA-CNTF sunt maxime la 3

zile și se mențin 20 de zile din momentul lezării. Celulele ce conțin mRNA-CNTF se găsesc la periferia leziunii (11).

In vitro, CNTF poate reprezenta pe termen scurt, suportul trofic și pentru neuronii simpatici ai embrionilor și nou născuților de șobolan. Administrat singur, CNTF susține supraviețuirea a peste 80% din neuroni timp de 6 zile și aceasta mai mult decât o face NGF combinat cu CNTF (12).

## **CNTF și nevroglia**

Citokina pleotropică CNTF este detectabilă la nivele foarte scăzute în sistemul nervos central la șobolanul adult, dar în urma unei leziuni la nivelul hipocampului dorsal, nivelele de mRNA-CNTF sunt dramatic crescute în astrocitele reactive.

În cultură, astrocitele hipocampului de șobolan exprimă CNTF (mRNA) la nivele înalte, asemănător astrocitelor reactive in vivo. Tratarea acestora cu izoproterenol și forskalin, care stimulează producerea de cAMP, modifică morfologia astrocitelor, și sinteza proteinelor acide fibrilare gliale și a mRNA NFG.

După adăugarea de forskalin, supresia mRNA-CNTF este menținută până în a 7-a zi. Scăderea producției de CNTF în astrocite determinată de izoproterenol și forskalin ajunge la 29% și respectiv 52% față de control (13).

Celulele Schwann din nervul sciatic, exprimă cantități mari de CNTF, dar la 7 zile după lezarea nervului, prezența citokinei scade dramatic. Cantitatea de CNTF și mRNA-CNTF scade treptat față de locul leziunii și se extinde centrifug timp de 7 zile.

Proximal față de leziune, expresia CNTF scade ușor, dar este detectabilă. În regenerarea nervului, mRNA și proteina CNTF sunt detectabile la 30 zile, iar la 60 zile proteina CNTF prezintă cantități normale. Prin urmare, expresia CNTF în celulele Schwann scade odată cu demielinizarea în timpul degenerării Walleriene și revine la normal după remielinizare. Expresia CNTF reclamă interacțiunea axon-celulă Schwann (14).

CNTF poate reduce afinitatea receptorului de creștere a nervilor și expresia CD4 din microglia sistemului nervos central. CNTF este asociat cu microglia corpului calos atât integru cât și agresat; determină schimbări morfologice în expresia NGF-R de joasă afinitate și în CD4, dar și o creștere a expresiei R3 de complement (C3-R).

Microglia de șobolan nou născut, tratată în cultură cu CNTF înalt purificat răspunde intens la această citokină (15).

CNTF protejează oligodendrocitele contra apoptozei naturale și a morții induse de TNF. O parte din oligodendrocitele în dezvoltare suferă moartea naturală, iar cele mature mor fie prin apoptoză, fie prin necroză, ca răspuns la acțiunile distructive ale citokinelor și complementului.

În cultură, CNTF din astrocitele SNC promovează supraviețuirea și maturarea oligodendrocitelor, protejându-le de moartea indusă de CNTF, dar nu de cea indusă de complement (necroză). Astfel, CNTF asigură supraviețuirea oligodendrocitelor în timpul dezvoltării și poate fi recomandat în acele boli degenerative ale SNC care implică distrucția oligodendrocitelor (16).

CNTF singur sau administrat cu receptorul său solubil, inhibă producerea de TNF indusă de LPS in vitro. În creier producerea de TNF este inhibată când CNTF și LPS sunt administrate central. Se sugerează că CNTF poate acționa ca o citokină protectoare contra efectelor patologice mediate de TNF, atât în sistemul nervos central cât și în cel periferic (17).

## Receptorul CNTF (CNTF-R)

În existența lor, neuronii depind de semnalele care le induce diviziunea, diferențierea, supraviețuirea sau moartea. Două noi clase de factori au activitate neurotrofică asupra celulelor nervoase, neurotrofinele și CNTF.

CNTF angajează un sistem de receptori care au în componență subunități din complexele receptorilor pentru citokinele hematopoietice. CNTF nu angajează căile de semnalizare neurotrofice inițiate de autofosforilarea Tyk-R, care sunt receptori pentru factori de creștere printre care și FGF. Totuși, aceste două clase de factori neurotrofici, cu căi de semnalizare distincte, pot interacționa în timpul neuropoiezei (18).

Complexul CNTF-R este compus din CNTF-R alpha, LIF-R beta și gp130 (moleculă de semnalizare ce se găsește și în receptorul IL-6 și LIF). Componenta alpha a receptorului pentru CNTF se deosebește de cea a altor receptori ai factorilor de creștere, prin faptul că este ancorată la membrana celulară printr-o legătură glicozil fosfatidil inozitol (GPI), care-i permite eliberarea din complexul receptorului.

Lanțul alpha al CNTF-R este o componentă importantă în complexul funcțional al receptorului, dar poate funcționa și în forma solubilă ca parte a unui ligand heterodimeric. Rolul potențial fiziologic al componentei solubile s-a demonstrat în lichidul cefalo-rahidian (19, 20).

Legătură de tip glicozil fosfatidil inozitol mai deține și proteina scrapie prion. Izoforma anormală PrP<sup>Sc</sup> găsită în creierul animalelor infectate cu scrapie este reclamată pentru replicarea prion, (agent infecțios care nu conține acid nucleic)- și se formează prin convertirea celeilalte izoforme PrP<sup>C</sup>.

Acest eveniment este probabil conformațional și nu de schimbare în compoziția chimică. Astfel că, prezența GPI ancorată la CNTF-R alpha este un aspect neobișnuit pentru o moleculă care să transmită un semnal spre interiorul celulei. CNTF-R alpha se cuplează cu CNTF și apoi interacționează cu alte două componente R beta pentru a iniția transducția semnalului.

Așa cum s-a arătat, spre deosebire de majoritatea receptorilor, CNTF-R alpha poate funcționa ca o moleculă solubilă pentru o potență activitate CNTF pe celulele ce conțin două corespondente beta. CNTF-R alpha se găsește în lichidul cefalo-rahidian și sânge și se poate elibera și din mușchii scheletici în urma denervării acestora (21).

S-a stabilit că CNTF are în componența receptorului său, pe lângă cele două componente ale LIF-R, o a treia componentă -CNTF-R alpha-, care este exprimată mai slab în sistemul nervos. S-a demonstrat indispensabilitatea ei prin transfectarea genei CNTF-R alpha într-o celulă hematopoietică normală, care răspundea numai la LIF. S-a arătat astfel că, CNTF-R alpha este o componentă a receptorului cu concursul căreia celulele răspund la acțiunea CNTF (22). CNTF-R alpha cuplează CNTF marcat cu <sup>125</sup>I, cu înaltă afinitate. Este deci subunitate importantă a receptorului de înaltă afinitate (23).

Cuplarea CNTF de șobolan la neuronii ciliari duce la mascarea specifică a 3 proteine de 153, 81 și respectiv 72kD. Numai componenta de 81kD este eliberată din celule după tratarea cu fosfolipaza C specifică hidrolizei fosfatidil inozitolului, sugerând o atașare și la membrană via unei legături glicozil fosfatidil inozitol. Stimularea cu CNTF, dar nu cu alte neurokine duce la rapida tirozinfosforilare a unei proteine de 90kD, ce poate fi inhibată prin pretratare cu fosfolipaza C (24).

Receptorul CNTF, receptor de înaltă afinitate pentru CNTF este un compus complex tripartit. Cartarea CNTF-R alpha din sistemul nervos central de la noul născut și adult de șobolan arată că populațiile neuronale

care exprimă mRNA-CNTF alpha se găsesc în diferite arii funcționale cum sunt: bulbul, neocortexul-stratul V, păturile piramidale, cortexul piriform, hipocampusul, pătura granulară a girului dentat, nucleii talamici, nucleii hipotalamici și trunchiul cerebral. Nucleul roșu și nucleul negru (partea reticulată) ca și nucleii cerebrali profunzi, o subpopulație de celule din stratul granular intern al cerebelului, sunt de asemenea marcați.

Expresia mRNA-CNTF-R alpha este mai ridicată la adult în bulbul olfactiv, cortexul cerebral și hipotalamus și este nedetectabilă în nucleii talamici, mezencefal și punte. Neuronii raportați răspund la CNTF exogen și sunt marcați în probele CNTF-R alpha ceea ce s-a observat și în neuronii striati și septali. Liganzii la CNTF-R alpha au funcții mai extinse acționând pe diferite populații neuronale atât în dezvoltare, cât și pe creierul matur (25).

Prin imunoreactivitate s-a stabilit că reacția cea mai intensă a CNTF-R alpha se detectează în pericarion, dendrite și numai ocazional, în axonii hipocampusului, în neuroni senzitivi și în unii neuroni motori. De asemenea, CNTF-R alpha este prezent în pericarioni, dendritele și axonii neuronilor motori din coarnele anterioare ale măduvei spinării de la șobolani adulți, ca și în neuronii ganglionilor spinali și în nervii periferici ai acestora.

Se sugerează că CNTF-R alpha servește în special neuronilor embrionari C în curs de diferențiere (26).

Investigarea, folosind un anticorp policlonal anti-CNTF-R alpha a distribuției CNTF-R alpha în sistemul nervos central de la maimuța Celeus, a stabilit că toți neuronii din coarnele anterioare ale măduvei spinării, ca și toți neuronii nucleilor motori ai nervilor cranieni sunt reactivi.

Imunoreactivitatea CNTF-R alpha s-a observat și în celulele Purkinje, în celulele din nucleul negru, din nucleul roșu, ca și în neuronii gigantici din neocortex și alți centrii (27).

CNTF activează căi de transducție a semnalelor, în mod asemănător cu altele citokine. Citokinele neurotrofice precum CNTF, LIF și IL-6 declanșează o largă varietate de efecte pe celulele sistemului nervos și imunitar.

Schimbările expresiei genelor sunt determinate de activitatea enzimelor specifice Jak-kinaze și proteinele STAT. Calea de semnalizare Jak-STAT se crede că interacționează cu alte cascade de semnalizare precum calea PK activată de mitogeni (28). Gena STAT-3 de la șoarece se găsește pe cromosomul 11, are 24 exoni și peste 37 kb. Este aproape identică cu gena STAT-2 de la om. Regiunea promotorială a genei STAT-3 de la șoarece deține elemente reglatoare potențiale precum locurile de cuplaere GATA, NF-IL-6, PEBP2, Sp1, AP-2, element de răspuns cAMP, boxa CAAT și boxa E(29).



## **CNTF în mușchii scheletici**

Inițial s-a crezut că activitatea CNTF este exclusiv prezentă pe sistemul nervos, dar descoperirea CNTF-R alpha în mușchii scheletici relevă că citokina are și activitate periferică. După secționarea nervului, expresia mRNA CNTF alpha în mușchii scheletici de pui, scade de 10 ori. Profilul în timp al schimbărilor în expresia CNTF alpha depinde de vârsta puiului și de tipul de mușchi. Nivelele joase ale expresiei în mușchii de pui denervați ating aproape pe cele de la control și din mușchii regenerați.

Pentru prima dată s-a semnalat faptul că, expresia mRNA CNTF-R alpha și subunitatea alpha a receptorului acetilcolinei în diferiți mușchi scheletici de pui, apare în urma injuriei nervului, dar și în timpul regenerării acestuia (30).

În mușchi sunt exprimate și componentele receptorului CNTF, LIF-R beta și gp130. Expresia acestor 3 componente ale CNTF-R este puternică în mușchiul denervat. Administrat in vivo, CNTF activează acești receptori din mușchii scheletici inducând fosforilarea lor și reacția genei imediat timpurii. Se afirmă astfel că, în plus la efectele sale neurotrofice, CNTF are și efecte miotrofice prin activarea schimbărilor morfologice și a funcțiilor asociate cu denervarea mușchilor scheletici de la șobolan.; astfel se poate preveni atrofia acestora indusă de denervare prin injectarea zilnică a anumitor doze de CNTF. Transducția semnalului este dependentă de doza de CNTF (31, 32).

Analiza prezenței CNTF în diferite țesuturi de la șobolan, imediat după naștere, relevă că citokina este detectată în mușchii scheletici la două săptămâni postnatal. Nivelul maxim este atins la 5 săptămâni în nervul sciatic măduvă și rinichi și la 8 săptămâni în trunchiul cerebral și cerebel (33).

## **Efectele CNTF**

Tratarea cu CNTF a hepatocitelor primare de șobolan, determină nivele crescute de mRNA fibrinogen și expresia proteinei în manieră dependentă de timp și doză. Există aproximativ 1.900 locuri de cuplare/celulă a CNTF, indicând astfel prezența CNTF-R specifici, în membrana hepatocitelor. Cuplarea CNTF la hepatocite poate fi în competiție cu IL-6 (34). Pe de altă parte, LIF și CNTF cresc, în funcție de doză, metabolismul trigliceridelor din ficatul de șobolan. Secreția de trigliceride hepatice poate media schimbări în metabolismul lipidic care acompaniază

răspunsul fazei acute (35). Asupra colesterolului însă, cele două citokine au efect redus, iar glucoza serică este neafectată.

CNTF cu LIF și OSM, citokine care mimează CNTF, au o largă arie de acțiune și pe alte tipuri celulare. Astfel, celulele stem embrionare exprimă complexe CNTF-R, așa încât CNTF are abilitatea de a menține pluripotențialitatea acestor celule (36).

Prin intermediul proteinelor STAT, CNTF poate regla expresia genei peptidului intestinal vasoconstrictor (VIP), în celulele sistemului nervos. Studiile efectuate pe linii celulare derivate din septum -SN-48- și în culturi primare de celule din SNC, relevă că inducția genei VIP dependentă de CNTF este mediată de un element responsiv de 180p.b (CyRE) din promotorul VIP.

CNTF induce proteina STAT pentru a cupla la un loc CyRE și de asemenea, induce o proteină secundară pentru a cupla la un loc C/EBP-like în CyRE. Inhibitorul serin/treonin kinază-H7-previne inducția dependentă de CNTF, a cuplării AP-1 și transcrierea mediată CyRE, sugerându-se că o kinază sensibilă, respectiv H7 este importantă pentru medierea efectelor CNTF în transcrierea VIP (37,38).

CNTF induce translocția tranzitorie a STAT-1 alpha/p91 în nucleu, urmată de activarea promotorului genei GFAP (proteina acidă fibrilară glială) reglând astfel, la nivel superior, mRNA acestei proteine. Nivelul mRNA-R alpha rămâne însă neafectat după adăugarea ligandului (39).

## **CNTF și cancerul**

rCNTF murin în concentrație picomolară, previne moartea celulelor carcinomului embrionar murin-P19-. CNTF stimulează diferențierea celulelor P19 inducând producția de neurofibrile. Celulele P19 prezintă locuri de cuplare de înaltă afinitate pentru CNTF, constatându-se cel puțin doi receptori de 78kD și respectiv 67kD (40).

În neuroblastomul uman NBFL, tratamentul cu CNTF induce creșterea mRNA-VIP și somatostatin, inducție dependentă de doză (41). Celulele neuroblastomului SH-SY5Y tratate cu acid retinoic și TPA, reglează CNTF-R determinând transcrierea genelor acestora și implicând mecanismele translației și posttranslației proteinelor respective (42).

Linia PC12 de șobolan, răspunde facil la NGF, dar slab la CNTF. Când aceste celule sunt tratate cu mixtura NGF-CNTF, cel din urmă îl potențează pe cel dintâi, sugerând astfel o interacțiune a acestor citokine (43).

Celulele neuroblastomului NB41A3 arată că transducția semnalelor inițiate de CNTF prin expresia CNTF-R alpha, implică cAMP, similar acțiunii forskalinului (44).

## **CNTF și boala Huntington**

Boala Huntington constă în degenerarea neuronilor nucleilor striatici, în special a celor care conțin acid gamma aminobutiric și, până în prezent nu există un tratament care să prevină, sau cel puțin să încetinească evoluția bolii. Coreea cronică Huntington este o afecțiune ereditară cu evoluție progresivă la adult. Se caracterizează prin mișcări coreice asociate cu tulburări psihice corelate cu leziuni neuronale la nivelul corpilor striati și al cortexului.

CNTF se dovedește un factor trofic pentru neuronii striatali și astfel, un potențial factor terapeutic al bolii Huntington.

Fibroblastele de pui de hamsteri, modificate genetic pentru a secreta CNTF uman, s-au plantat în striatul maimuței *Cynologus*; după o săptămână, maimuțele au fost injectate unilateral cu acid chinolinic, pentru a reproduce neuropatologia bolii Huntington. hCNTF se dovedește neuroprotectiv pentru celulele striatale destinate distrucției cu acid chinolinic, prevenind și atrofia retrogradă a neuronilor stratului V din cortexul motor.

Corelat cu nucleii striati se produce un efect protectiv și asupra părții reticulate din substanța neagră. De aici concluzia că, hCNTF poate contribui la prevenirea degenerării populațiilor de neuroni striatali și a circuitelor corpului striat cu alți centri neuronali(45,46). Experimente efectuate în aceeași manieră demonstrează efectul protectiv al neurotrofinei CNTF.

Injectarea bilaterală a acidului chinolinic în ventriculii laterali de la șobolani, determină pierderea semnificativă a greutatei corpului, cu inabilitatea folosirii membrilor anterioare pentru a se hrăni, culminând cu afectarea funcției cognitive și a memoriei.

Introducerea în ventriculii laterali a fibroblastelor renale de hamster (BHK) ce conțin gena hCNTF, previne atacul tuturor manifestărilor menționate, strategie care poate fi relevantă în tratarea sindromului Huntington (47).

## BIBLIOGRAFIE

1. Simon R. et al., Human CNTF and related cytokines effects on DRG, neurone survival, *Neuroreport*, 1995, 7(1), 153-157.
2. Oyesiku N.M., Wilcox J.N., Wigston D.J., Changes in expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF-receptor alpha after spinal cord injury, *Journal of Neurobiology*, 1997, 32(3), 251-261.
3. Uusicker K., Growth factors in Parkinson's disease, *Progress in Growth Factor Research*, 1994, 5(1), 73-87.
4. Kuzis K., Eckenstein F. P., Ciliary neurotrophic factor as a motor neuron trophic factor, *Perspectives on Developmental Neurobiology*, 1996, 4(1), 65-74.
5. Sun Y., Maxwell G.D., Ciliary neurotrophic factor (CNTF) has a dose-dependent biphasic effect on the number of adrenergic cells which develop in avian trunk neural crest cultures, *Neuroscience Letters*, 1994, 165(1-2), 1-4.
6. Apfel S.C., Arezzo J.K., Moran M., Keseler J.A., Effects of administration of ciliary neurotrophic factor on normal motor and sensory peripheral nerves in vivo, *Brain Research*, 1993, 604 (1-2), 1-6.
7. Forger N.G., Robert S.L., Wong V., Breedlove S.M., Ciliary neurotrophic factor maintains motoneurons and their target muscles in developing rats, *Journal of Neuroscience*, 1993, 13(11), 4720-4726.
8. Larkfors L., Lindsay R.M., Alderson R.F., Ciliary neurotrophic factor enhances the survival of Purkinje cells in vitro, *European Journal of Neurosciences*, 1994, 6 (6), 1015-1025.
9. Bianchi L.M., Cohan C.S., Effects of the neurotrophins and CNTF on developing statoacoustic neurons; comparison with an otocyst-derived factor, *Developmental Biology*, 1993, 159 (1), 353-365.
10. Kirsch M., Lee M. Y., Meyer V., Wiese A., Hofmann H. D., Evidence for multiple local functions of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in retinal development: expression of CNTF and its receptors and in vitro effects on target cells, *Journal of Neurochemistry*, 1997, 68 (3), 979-990.
11. Ip N. Y., Wiegand S. J., Morse J., Rudge J. S., Injury-induced regulation of ciliary neurotrophic factor mRNA in the adult rat brain, *European Journal of Neuroscience*, 1993, 5 (1), 25-33.

12. Burnham P., Louis J. C., Magal E., Varon S., Effects of ciliary neurotrophic factor on the survival and response to nerve growth factor of cultured rat sympathetic neurone, *Developmental Biology*, 1994, 161 (1), 96-106.
13. Rudge J. S., Morrissey D., Lindsay R. M., Pasnikowski E. M., Regulation of ciliary neurotrophic factor in cultured rat hippocampal astrocytes, *European Journal of Neuroscience*, 1994, 6 (2), 218-229.
14. Smith G. M., Rabinovsky E. D., McManaman J. L., Shine H. D., Temporal and spatial expression of ciliary neurotrophic factor after peripheral nerve injury, *Experimental Neurology*, 1993, 121(2), 239-247.
15. Hagg T., Varon S., Louis J. C., Ciliary neurotrophic factor (CNTF) promotes low-affinity nerve growth factor receptor and CD4 expression by rat CNS microglia, *Journal of Neuroimmunology*, 1993, 48(2), 177-187.
16. Louis J. C., Magal E., Takayama S., Varon S., CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death, *Science*, 1993, 259 (5095), 689-692,
17. Benigni F., Villa P., Demitri M. T., Sacco S., Sipe J. D., Lagunowich L., Panayotatos N., Ghezzi P., Ciliary neurotrophic factor (CNTF) inhibits brain and peripheral tumor necrosis factor production and when coadministered with its soluble receptor, protects mice from lipopolysaccharide toxicity, *Molecular Medicine*, 1995, 1 (5), 568-575.
18. Ip N. Y., Yancopoulos G. D., Neurotrophic factors and their receptors, *Annals of Neurobiology*, 1994, 35 suppl., 13-16.
19. Richardson P. M., Ciliary neurotrophic factor: a review, *Pharmacology and Therapeutics*, 1994, 63 (2), 187-198.
20. Davis S., Aldrich T.H., Ip N. Y., Stahl N., Scherer S., Farruggella T., Di Stefano P.S., Curtis R., Panayotatos N., Gascon H. et al., Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses, *Science*, 1993, 259 (5102), 736-739.
21. Stahl N., Boulton T. G., Ip N. Y., Davis S., Yancopoulos G. D., The tails of two proteins: the scrapie prion protein and ciliary neurotrophic factor receptor, *Brasilian Journal of Medical and Biological Research*, 1994, 27 (2), 297-301.
22. Ip N. Y., McClain J., Barrezueta N., Aldrich T. H., Pan L., Li Y., Wiegand S. J., Friedman B., Davis S., Yancopoulos G. D., The alpha component of the CNTF receptor is required for signaling and defines potential CNTF targets in the adult and during development, *Neuron*, 1993, 10 (1), 89-102.
23. Hubert J., Dittrich F., Phelan P., Characterization of high-affinity and low-affinity receptors for ciliary neurotrophic factor, *European Journal of Biochemistry*, 1993, 218 (3), 1031-1039.
24. Koshlukova S. et al., Identification of functional receptors for ciliary neurotrophic factor on chick ciliary ganglion neurons, *Neuroscience*, 1996, 72 (3), 821-832.
25. Lee M. Y., Hofmann H. P., Kirsch M., Expression of ciliary neurotrophic factor receptor alpha messenger RNA in neonatal and adult rat brain: an in situ hybridization study, *Neuroscience*, 1997, 77 (1), 233-246.

26. MacLennan AJ., Vinson EN., Marks L., McLaurin D.L., Pfeifer M., Lee N., Immunohistochemical localization of ciliary neurotrophic factor receptor alpha expression in the rat nervous system, *Journal of Neuroscience*, 1996,16 (2), 621-630.
  27. Kordower JH., Yaping-Chu, MacLennan AJ., Ciliary neurotrophic factor receptor alpha-immunoreactivity in the monkey central nervous system, *Journal of Comparative Neurology*, 1997, 377 (3), 365-380.
  28. Frank DA., Greenberg ME., Signal transduction pathways activated by ciliary neurotrophic factor and related cytokines, *Perspectives on Developmental - Neurobiology*,1996, 4 (1), 3-18.
  29. Shi W., Inoue M., Minami M., Takeda K., Matsumoto M., Matsuda Y., Kishimoto T., Akira S., The genomic structure and chromosomal localization of the mouse STAT 3 gene, *International Immunology*, 1996, 8 (8), 1205-1211.
  30. Ip FC., Fu AK., Tsim KW., Ip NY., Differential expression of ciliary neurotrophic factor receptor in skeletal muscle of chick and rat after nerve injury, *Journal of Neurochemistry*, 1996, 67 (4), 1607-1612.
  31. Helgren M.E., Squinto S.P., Davis H.L., Parry D.J., Boulton T.G., Heck CS., Zhu Y., Yancopoulos G.D., Lindsay R.M., DiStefano P.S., Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle, *Cell*, 1994, 76(3), 493-504.
  32. DiStefano PS., Boulton TG., Stark JL., Zhu Y., Adryan KM., Ryan TE., Lindsay RM., Ciliary neurotrophic factor induces down-regulation of its receptor and desensitization of signal transduction pathways in vivo: non-equivalence with pharmacological activity, *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271 (37), 22839-22846.
  33. Ohta M., Ohi T., Nishimura M., Itoh N., Hayashi K., Ohta K., Distribution of and age-related changes in ciliary neurotrophic factor protein in rat tissues, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1996,40(4),671-675.
  34. Fuentes NL., Fuller GM., Ciliary neurotrophic factor regulates fibrinogen gene expression in hepatocytes by binding to the interleukin-6 receptor, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993, 190(2), 544-550.
  35. Nonogaki K., Pan XM., Moser AH.,Shigenaga J., Stappaus I., Sakamoto N., Grunfeld C., Feingold KR., LIF and CNTF which share transduction system, stimulate hepatic lipid metabolism in rats, *American Journal of Physiology*, 1996, 271 (3 Pt.1 ),521-528.
  36. Conover JC., Ip N Y., Poueymirou WT., Bates R., Goldfarb M.P., DeChiara T.M., Yancopoulos G.D., Ciliary neurotrophic factor maintains the pluripotentiality of embryonic stem cells, *Development*, 1993,119 (3), 559-565.
  37. Rajan P., Symes AJ., Fink JS., STAT proteins are activated by ciliary neurotrophic factor in cells of central nervous system origin, *Journal of Neuroscience Research*, 1996, 43 (4), 403-411.
- Symes A., Gearan T., Eby J., Fink JS., Integration of Jak-Stat and AP-1 signaling pathways at the vasoactive intestinal peptide cytokine response element regulates ciliary neurotrophic factor-dependent transcription, *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (15), 9648-9654.

38. Symes A., Gearan T., Eby J., Fink J.S., Integration of Jak-Stat and Ap-1 Signaling pathways at the vasoactive intestinal peptide cytokine response element regulates ciliary neurotrophic factor - dependent transcription, *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (15), 9648 - 9654.
39. Kahn MA., Huang CJ., Caruso A., Barresi V., Nazarian R., Condorelli D.F., de Vellis J., Ciliary neurotrophic factor activates JAK/STAT signal transduction cascade and induces transcriptional expression of glial fibrillary acidic protein in glial cells, *Journal of Neurochemistry*, 1997, 68(4),1413-1423.
40. Gupta S.K., Haggarty AJ., Carbonetto S., Riopelle R.J., Richardson PM., Dunn RJ., Trophic actions of ciliary neurotrophic factor on murine embryonic carcinoma cells, *European Journal of Neuroscience*, 1993, 5 (8), 977-985.
41. Symes AJ., Rao MS., Lewis SE., Landis SC., Hyman SE., Fink JS., Ciliary neurotrophic factor coordinately activates transcription of neuropeptide genes in a neuroblastoma cell line, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993,90 (2), 572-576.
42. Malek RL., Halvorsen SW., Opposing regulation of ciliary neurotrophic factor receptors on neuroblastoma cells by distinct differentiating agents, *Journal of Neurobiology* , 1997, 32 (1), 81-94.
43. Zhong W., Zaheer A., Lim R., Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances the effects of nerve growth factor on PC 12 cells, *Brain Research*, 1994, 661 (1-2), %6-62.
44. Mac Lennan AJ., Gaskin AA., Viuson EN., Martinez LC., Ciliary neurotrophic factor receptor alpha mRNA in NB41A3 neuroblastoma cells : regulation by cAMP, *European Journal of Pharmacology*, 1996, 295 (1), 103-108.
45. Emerich DF., Winn SR., Hantraye PM., Peschanski M., Chen EY. Chu Y., McDermott P., Baetge EE., Kordower JH., Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease, *Nature*, 1997, 386 (6623), 395-399.
46. Emerich DF., Lindner MD., Winn SR., Chen EY., Frydel BR., Kordower JH., Implants of encapsulated human CNTF-producing fibroblast prevent behavioral deficits and striatal degeneration in a rodent model of Huntington's disease, *Journal of Neuroscience*, 1996, 16(16), 5168-5181.
47. Shelton DL., Are there more members of the CNTF-GPA family, *Perspectives on Developmental Neurobiology*, 1996, 4(1), 101-107

## **Interleukin-11 ( IL-11)**

IL-11 este o citokină multifuncțională cu acțiuni biologice înrudite cu IL-6, LIF, CNTF și OSM, aparținând astfel familiei citokinelor IL-6 care pot utiliza în comun, transductorul semnalului-gp130- din receptori. Principalmente, IL-11 este elaborat de celulele stromale, având multiple influențe atât asupra celulelor limfohematopoietice cât și hepatice, adipoase, neuronale și osoase.

Dintre principalele funcții pe care le exercită singur sau în combinație cu alte citokine menționăm:

- sinergie cu IL-13 stimulând rata de proliferare, cu scurtarea fazei G<sub>0</sub> a ciclului celular al progenitorilor hematopoietici timpurii,
- susține formarea și maturarea de colonii de megakariocite
- stimulează eritropoeza,
- induce sinteza proteinelor fazei acute,
- diferențiază adipocitele,
- promovează dezvoltarea neuronilor,
- induce creșterea unor tipuri celulare de plasmocitom și hibridom.

Funcțiile menționate și alte probleme privind IL-11 vor fi tratate separat.

Gena umană IL-11 se găsește în cromosomul 19 (19q13.3-13.4 ), având o lungime de 597 nucleotide,; ea codifică o proteină de 23kD formată din 199 reziduuri de aminoacizi și N-neglicozilată. Din punct de vedere al structurii moleculare, IL-11 este unic, deoarece nu deține locuri de glicozilare și nici reziduuri de cisteină (1,2,3 ).

Gena IL-11 a fost clonată din linia PU-34 de celule stromale de la Primate., linie selectată datorită abilității ei de a induce timp îndelungat în cocultură, progenitorul formator de colonii hematopoietice umane. IL-11 de la Primate este de asemenea, neglicozilat.



cDNA-IL-11 uman a fost izolat din linia MRC-5 de fibroblaste derivată din plămânul fetal uman. Secvența în nucleotide este identică în proporție de 97% cu gena de la Primate.

În diferite linii celulare s-au găsit două transcripte distincte: de 1.5 și 2,5kb cu secvențe diferite la capătul 3! Expresia transcriptelor a fost determinată de IL-1 în celulele PU-34 și PMA, și în fibroblastele umane MRC-5(4).

IL-11 este produs de numeroase tipuri celulare. La șoarece, proteina IL-11 s-a detectat în creier și testicule. La nivelul encefalului s-a detectat în pătura granulară a girului dentatus, în păturile piramidale din hipocamp și de asemenea în celulele coarnelor anterioare și laterale ale măduvei spinării.

În testicule, mRNA se exprimă în spermatozoidii rotunde din tubii seminiferi, aflate în stadiile VI-IX de evoluție. La șoareci cu deficiențe genetice nu se exprimă în celulele germinale și înaintea maturării sexuale.

IL-11 stimulează proliferarea in vitro a liniei de celule progenitoare neuronale de la nivelul hipocampului, iar in vivo accelerează refacerea spermatogenezei după terapia citotoxică. Se sugerează astfel că, IL-11 poate fi un important reglator al funcțiilor neuronale și testiculare (5).

### **Receptorul interleukin-11 (IL-11R) și transmiterea semnalului**

IL-11R deține două subunități: lanțul IL-11R alpha și gp130 (glicoproteina 130) care este o subunitate comună cu cea a receptorilor pentru citokinele IL-6, CNTF (factor neurotrofic ciliar), LIF, OSM (oncostatin M) și CT-1 (cardiotrophin-1).

Gena IL-11R este localizată în cromosomul 9 banda p13, împreună cu gena CNTF-R, sugerându-se ideea că au evoluat dintr-un strămoș comun. De aceea, lanțul IL-11R alpha are omologii cu lanțul alpha din receptorii CNTF și IL-6 (6).

cDNA IL-11R alpha uman din măduva osoasă, codifică o proteină de 422 reziduuri de aminoacizi, având o identitate de 84% cu proteina murină. Regiunea extracelulară prezintă o structură cu două domenii omoloage cu IL-6R și CNTF-R: unul hematopoietic cu reziduuri de cisteină conservate și un motif WSTWS. Regiunea transmembranară este urmată de o scurtă coadă citoplasmatică ce nu conține domeniul TK (tirozin kinază).

IL-11R uman prezintă o izoformă lipsită de domeniul citoplasmatic identificat în acord cu efectele pleiotrope ale IL-11 pe diferite linii celulare hematopoietice și pe celule medulare. De altfel, transcriptele IL-11R se întâlnesc și în diferite celule ale liniilor leucemice cum sunt: linia megakariocitică MO7E, linia mielogenă K-562, linia eritroleucemică TF-1, linia MG-63 și linia osteosarcomatoasă Saos-2 (7,8).

IL-11R alpha se exprimă în timpul dezvoltării embrionare, în toate țesuturile murine și în celulele stem totipotente diferențiate (9).

La șoareci s-a descoperit o genă care codifică o proteină ce cuplează IL-11, respectiv IL-11R beta. Structura acestei gene este înalt similară cu IL-11R alpha (99% identitate în secvențe la nivelul aminoacizilor). IL-11R beta se coexprimă cu IL-11R alpha la nivele scăzute în țesuturile embrionare și în diferite țesuturi adulte.

În mușchii scheletici sunt prezente transcripte de IL-11R alpha, iar în testicule sunt abundente cele de IL-11R beta. IL-11 cuplează cu înaltă afinitate la IL-11R beta in vitro, sugerându-se că genomul de șoarece conține un IL-11R secund, funcțional (10).

IL-11 acționează pe receptorul IL-11R alpha, subunitate (ligand-binding) de legare într-un complex funcțional multimeric transductor de semnale cu gp130. Numeroase cercetări demonstrează interacțiunea IL-11R alpha cu gp130.

Expresia IL-11R alpha uman cu gp130 în celulele murine M1 ce exprimă constitutiv gp130 murin (LIF-R murin), duce la generarea de situsuri de cuplare de înaltă afinitate pentru IL-11. Gp130 este indispensabilă pentru semnalizare (7) Lanțul alpha din IL-11R solicită deci lanțul gp130 atât pentru cuplare cât și pentru transducerea semnalului.

Clone cDNA din ficatul de șoarece, codifică un receptor numit NR-1 foarte similar în secvențe și în structură cu lanțul alpha al IL-6R. Expresia NR-1 în linia Ba/F3 manifestă o slabă afinitate de receptor pentru IL-11.

Cuplarea IL-11 cu înaltă afinitate reclamă coexpresia NR-1 cu gp130 care este, așa cum menționam, subunitate comună receptorilor IL-6, LIF, OSM și CNTF. Numai coexpresia celor două lanțuri în celulele Ba/F3 determină și proliferarea celulelor ca răspuns la acțiunea IL-11 (11).

IL-6 și IL-11 stimulează proliferarea celulelor TF-1 (eritroleucemice umane) inducând un mecanism similar de fosforilare protein-kinazică și activarea protooncogenei jun-B. Folosind același transductor-gp130-, cele două citokine acționează similar în evenimentele timpurii ale transmiterii semnalului. Anticorpi anti-gp130 împiedică legarea IL-11 și IL-6 și astfel inhibă proliferarea celulelor, fosforilarea proteinelor și expresia c-jun-B din celulele TF-1.

Anticorpul anti-IL-6R inhibă abilitatea IL-6, dar nu și a IL-11 de a transduce semnalul timpuriu în celulele TF-1, ceea ce înseamnă că cele două citokine cuplează diferit la receptor, dar au comun același instrument de transducere a semnalului, respectiv gp130 (12, 13).

Osteoblastele în cultură cu măduvă osoasă, produc IL-11 dacă sunt activate cu IL-1, TNF alpha, PGE2, PT-H. Osteoblastele primare exprimă constitutiv mRNA și pentru IL-11R alpha și gp130. Gp130 mediază semnale în dezvoltarea osteoblastelor reglată de IL-11 produs autocrin. Se subliniază rolul central al citokinelor cuplate la receptorii ce dețin gp130, în special a IL-11 în dezvoltarea osteoblastelor. Deoarece osteoblastele și osteoclastele exprimă mRNA-IL-11R alpha, celulele formatoare de os și celulele care resorb osul sunt ținte potențiale ale IL-11 (14).

Gp130 este transductor de semnale fiind implicată în formarea receptorilor de înaltă afinitate pentru IL-6, IL-11, LIF, OSM, CNTF și CT-1. Aceste citokine formează familia de citokine IL-6 care sunt grupate astfel datorită rolului gp130 în transducerea semnalului. OSM cuplează direct la gp130, pe când celelalte citokine ale familiei IL-6 se leagă la diferite subunități ale receptorilor (15, 16).

Acești receptori cu componentă comună pentru transducerea semnalului aparțin familiei clasa I de receptori de citokine solubile care funcționează în sistemul hematopoietic.

Gp130 și lanțurile specifice ale receptorilor nu posedă domenii TK intrinseci, dar sunt asociate cu membrii familiei de kinaze JAK ai TK citoplasmatic. Kinazele JAK devin active după homodimerizarea sau heterodimerizarea gp130 induse de ligand. Această activitate leagă receptorul de suprafață cu genele nucleare printr-o serie de reacții biochimice precum tirozin fosforilarea și activarea unor factori citoplasmatici latenți numiți transductori de semnale și activatori ai transcrierii (STAT) (17).

Yin T.și colab. (12) au identificat pentru prima dată o proteină de 130kD care la inducția IL-11 se fosforilează în celulele 3T3-Li și care se identifică cu JAK-2. Tirozin- kinaza Jak-2 se asociază cu gp130, transductorul de semnale. In vitro activitatea JAK-2 în celulele TF-1 și 3T3 este amplificată după stimularea acestora cu IL-11. JAK-2 se asociază fizic cu gp130, reacție care se constată și după acțiunea IL-6, LIF și OSM. În aceleași condiții nu s-a reușit însă, tirozin-fosforilarea JAK-1 sub acțiunea lui IL-11 de unde concluzia că TK-JAK-2 este una din TK implicate în transducția semnalului mediată de IL-11, IL-6, LIF și OSM (18).

În celulele de soarece 3T3-Li activate de mitogeni, PK și PK- S6 ribosomale sunt implicate în semnalizarea pe căile particulare ale IL-11, IL-6, LIF și OSM. Se arată în premieră că, citokinele menționate produse prin activarea celulelor cu mitogeni pot activa atât TK cât și PK ribosomală-S6 de 85-92kD ( pp 90 rsk). Pp 90 rsk este apreciată ca una din cele mai potente protein-kinaze pentru activarea genelor la aceste citokine (19).

JAK-2 formează complexe cu pp2A, P13K și yes, ca răspuns la acțiunea citokinei hematopoietice IL-11. Cuplajul JAK-2/pp2A și eliberarea lui poate avea relevanță în multe mecanisme de reglare serin/treonină cum este activarea STAT și MAPK ( Mitogen-Activated Protein Kinase). Aceste asocieri ale JAK-2 cu PK care intervine în transducerea semnalului IL-11 pot fi aplicabile și altor sisteme de transducție a semnalelor gp130 și JAK. Deci, semnalizarea IL-11 intracelular se face prin kinazele citoplasmaticice ale familiei Janus (20).

Tirozin-fosforilarea și defosforilarea Syp sunt de asemenea, parte a răspunsului la acțiunea IL-11 în celulele 3T3-Li de soarece. Se arată pentru prima oară, implicarea Syp în calea transducerii semnalului IL-11. IL-11 în celulele 3T3-Li induce fosforilarea tirozinei în Syp.

Experiențele de imunoprecipitare au arătat că Syp este asociat inductibil cu gp130 și JAK-2. Folosindu-se un fosfopeptid ce conține secvențe pentru un loc de cuplare cu Syp (YXXV), s-a constatat că asocierea acestuia cu gp130 și JAK-2 reduce acest fosfolipid. Syp are deci multiple acțiuni în transducerea semnalului IL-11.

IL-11 induce tirozin-fosforilarea lui Syp care copreciptă cu gp130, JAK-2 și alte proteine tirozin-fosforilate, ca răspuns la acțiunea IL-11. Se prefigurează existența a noi mecanisme în transducerea semnalului de către citokinele familiei IL-6 (21).

Tirozin-fosforilarea kinazelor Jak-Tyk este stimulată de către IL-11 și IL-6 și în celulele maligne de plasmocitom. Astfel, în celulele de plasmocitom murin B9E și T10D, IL-11 induce ca și IL-6 ,profile de tirozin-fosforilare ale Jak-Tyk. Aceleași linii celulare sunt activate de IL-6, menționându-se și activarea factorului STAT-91, esențial pentru semnalizare (22).

IL-11 induce formarea complexelor Grb-2, Fyn și Jak-2 în celulele 3T3-Li, prin activarea MAPK

Promotarea formei de activare care se exprimă prin cuplarea GTP-RAS sugerează ideia că parțial, activarea poate fi transdusă pe calea de semnalizare RAS/MAPK. Astfel, se relevă și asocierea tirozin-fosfoproteinei Grb-2 care servește ca o cheie în tandem pentru activarea RAS.

Fosfotirozinele implicate, Jak-2, Fyn, Syp, se asociază tranzitoriu cu Grb-2 (ca în cazul lui Jak-2 și Fyn) după stimularea cu IL-11, fiind astfel implicate în transducția semnalului de la gp130R-IL-11, la sistemul RAS, via Grb-2.

Se sugerează că interacțiunile lui Jak-2 și Fyn cu Grb-2 induse de IL-11 pot nu numai să ofere un nou mecanism pentru activarea sistemului RAS/MAPK, dar pot induce și interacțiunea dintre diferite căi de semnalizare (23).

### **Reglarea expresiei genei IL-11**

Tratarea cu IL-1 alpha a liniei stromale medulare PU-34 de la Primate crește tranzitoriu nivelul mRNA-IL-11. Rata transcrierii genei IL-11 nu este însă apreciabil afectată prin IL-1 alpha. La reacția de răspuns a genei IL-11 la inducția IL-1 alpha, colaborează și complexul jun D, AP-1 reacționând cu 10 baze în regiunea promotorială.

În contrast cu ipoteza că motivul AUUUA din regiunea 3' netranslatată, ar fi suficient pentru a regla stabilitatea mRNA citokinei, se sugerează că IL-1 alpha induce stabilitatea acestuia, cu participarea secvențelor din diferite regiuni ale mesajului IL-11 (24).

Sinteza IL-11 este indusă în celulele stromale și în fibroblaste, de IL-1 și TGF-beta. IFN-gamma reglează diminuarea lui IL-11 indusă de IL-1 în cultură de celule stromale din măduva umană, iar IFN alpha reduce expresia mRNA-IL-11 în funcție de doză (25).

Efectele rIL-1 și TGF-beta 1 și 2 asupra producției de IL-11 în fibroblastele pulmonare umane au fost comparate cu producția de IL-6. Fibroblastele nestimulate produc cantități ne semnificative de IL-11, pe când cele stimulate de rIL-1 alpha și TGF-beta determină o producție crescută de proteină IL-11 și o acumulare a transcriptelor genei acesteia. TGF-beta nu stimulează efectiv acumularea de mRNA-IL-6, în timp ce rIL-1 alpha stimulează producția de IL-6 la dimensiuni superioare producției de IL-11. De asemenea, și acumularea de mRNA-IL-6 indusă de IL-1 alpha este importantă.

rIL-1 și TGF-beta acționează sinergic în creșterea producției de IL-11 în fibroblaste, sinergie mediată de o cale de activare independentă de PK (26). TGF-beta 1 acționează sinergic și cu histamina determinând creșterea producției de IL-11 și acumularea de mRNA-IL-11 în fibroblastele pulmonare umane, acțiune neinfluențată de antagonistul H2R-cimetidina-.

Se susține că histamina este un important reglator al producției de IL-11 din fibroblaste; ea interacționează cu TGF-beta 1 în inducerea acestei citokine. Această interacțiune este mediată de un mecanism pretranslațional care este dependent de receptorii H1 și de activarea căii dependente de calciu/calmodulin (27).

### **Interleukin-11 și megakariocitopoieza**

IL-11 are numeroase efecte asupra sistemului hematopoietic. Astfel, in vitro amplifică creșterea progenitorilor timpurii ai megakariocitopoiezei și eritropoiezei. La animalele sănătoase, IL-11 stimulează maturarea megakariocitelor și crește numărul plachetelor din sângele periferic. De asemenea, accelerează eliberarea numărului neutrofilelor, eritrocitelor și plachetelor la șoarecii care au suferit tratamente citoablativ. La șoareci, IL-11 scade morbiditatea și mortalitatea așa cum se întâmplă și după terapia citoablativă datorată infecțiilor cauzate de microorganismele din intestin (28).

IL-11 acționează ca un factor de creștere autocrin pentru liniile celulare megakariocitice de la om. In vitro, el promovează megakariocitele normale, iar în funcție de doză determină proliferarea liniilor de megakarioblaste CMK și Meg-J (29).

La șobolanii cărora li s-a administrat IL-11 timp de 5 zile, se constată creșterea numărului plachetelor sanguine. Administrarea timp de 14 zile, determină creșterea numărului plachetelor până la peste 30% față de control, situație ce se menține încă 5 zile și după stoparea injectării. În același timp se constată o creștere marcată în dimensiunea și ploidia megakariocitelor medulare, dar nu a celor splenice. Modificările apar numai după 24 de ore de la prima injectare. Se afirmă că IL-11 are același efect în trombopoieză, ca IL-6. Poate fi de asemenea eficient și în trombocitopenie (30).

IL-11 sinergizează cu alte citokine în reglarea progenitorilor megakariocitici și în trombopoieză. În combinație cu IL-3, IL-11 induce maturarea megakariocitelor din măduva osoasă umană în cultură, crește numărul plachetelor la șobolan nou născut și formează colonii de megacariocite murine.

Megakariocitopoieza este de asemenea, amplificată prin acțiunea combinată a IL-11 cu IL-6, SCF și IL-3 (31). Nivelele de IL-11 pot fi reglate parțial de un feed-back negativ bazat pe numărul plachetelor circulante și, în parte, de o varietate de agoniști inflamatori.

Trombopoietina și IL-11 induc trombopoieza și parțial, megakariocitopoieza în trombocitopenii acute. Se sugerează că IL-11 poate fi un agent eficient în tratarea mielosupresiei și trombocitopeniei induse de chemoterapia aplicată în tratamentul bolilor canceroase și în transplantul de măduvă osoasă. În reglarea trombopoiezei se poate asocia activitatea rhIL-11 cu cea a trombopoietinei (32, 33).

Gena IL-11 poate fi suprareglată în timpul trombocitopeniei acute asociată cu sepsia bacteriană la șobolanii nou născuți. Această creștere a expresiei genei IL-11, pare să nu prevină trombocitopenia severă. Administrarea dozelor profilactice de rhIL-11 poate fi totuși potențial benefică în sepsia cu streptococ și trombopenia asociată acesteia (34).

Odată cu stimularea trombocitopoiezei IL-11 singur sau în combinație cu G-CSF modulează în vivo și granulocitopoieza la șobolanii noi născuți, cărora li s-a administrat 14 zile i.p. rhIL-11 și rhG-CSF. rhIL-11 singur nu are efect asupra numărului absolut de neutrofile, dar crește specific plachetele circulante.

IL-11 cu G-CSF secvențial sau simultan, crește semnificativ rezerva de neutrofile și numărul absolut al celor circulante, dincolo de cantitatea determinată de G-CSF administrat singur. IL-11 cu G-CSF reduce mortalitatea șoarecilor infectați cu streptococi. Administrat singur, crește semnificativ concentrația plachetelor, iar în combinație cu G-CSF induce o creștere a mielopoiezei la șobolanii nou născuți (35). rhIL-11 administrat la Primare și șoareci normali ridică numărul neutrofilelor circulante și al plachetelor și crește megakariocitopoieza (36).

Se sugerează că IL-11 ar putea regla în, parte, celulele maligne ale liniei megakariocitare, prin mecanisme autocrine. Liniile leucemice HL-60, U937, K562 prezintă transcripte de IL-11; creșterea lor însă nu este stimulată de acesta și nici inhibată de oligonucleotidele anti-sens IL-11 (37).

Celulele MC-1, linie de cancer pulmonar uman, produc un stimulator nou al megakariocitelor, o fracțiune proteică din supernatantul culturii de MC-1 care stimulează formarea coloniei de megakariocite. Efectul cel mai puternic vizează formarea de CFU megakariocitice și apoi de CFU - eritroide. Această fracțiune este o proteină de 23kD, care se deosebește structural de citokinele identificate până acum și care pot afecta megakariocitopoieza, cum sunt: IL-1, 2, 3, 6, 7, 11, M-CSF, GM-CSF, LIF, SCF și TNF.

Proteina MC-1 crește megakariocitele murine în prezența lui IL-3 murin, ca și activitatea acetilcolinesterazei obținute din megakariocitele murine. Se conchide că proteina MC-1 stimulează formarea de colonii de megakariocite umane și că este diferită molecular de citokinele identificate până acum (37).

## **Interleukin-11 și eritropoieza**

Numeroase combinații care s-au făcut în tratarea măduvei osoase murine pentru a stabili potențialul proliferativ al citokinelor, au demonstrat că IL-11, IL-6 și SCF (Stem Cell Factor) au efect sinergic asupra expresiei progenitorilor murini hematopoietici în culturi.

Combinația SCF, IL-11, IL-6 sau IL-1 alpha crește marcant numărul total de CFU (Unități Formatoare de Colonii), CFU-MIX (Unități Formatoare de Colonii Mixte) și HPP-CFC (Celule Formatoare de Colonii cu Potențial Proliferativ Înalt), comparativ cu combinația SCF și IL-3.

Adiția IFN alpha la cultura ce conține SCF + IL-11 conduce la o scădere eficientă a expresiei proliferării, dar adiția IFN alpha la o cultură cu SCF + IL-6 nu afectează expresia proliferării. Se demonstrează că diferitele combinații ale IL-11 cu SCF, IL-6, IL-1 alpha pot stimula eficient proliferarea progenitorilor hematopoietici murini in vitro (38).

Efectele sinergice ale lui IL-11 cu alți factori, asupra expansiunii progenitorilor hematopoietici și menținerea celulelor stem în cultură, s-a demonstrat prin combinațiile IL-11 cu alți factori de creștere, ca și în cazul megakariocitelor.

IL-11 sinergizează cu IL-3 și cu SF pentru a extinde producția progenitorilor în cultură de FU2-dBM, dar independent el nu menține supraviețuirea celulelor stem. IL-11 amplifică considerabil expresia progenitorilor din aceste culturi, când se adaugă în combinație 2-3 factori precum SF, IL-3 și IL-6. Se concludă că IL-11 este un factor sinergic potent pentru proliferarea celulelor stem și pentru expresia progenitorilor în culturi lichide (39).

Combinația dozelor înalte de IL-11 și de SCF crește eficient in vivo, amplificarea eritroidă indusă de EPO. (40). De asemenea, IL-4 și IL-11 au efecte sinergice asupra proliferării progenitorilor hematopoietici. Aceste două citokine sunt factori de creștere din măduva murină ce amplifică formarea de focare de colonii de progenitori normali în prezența CSF, dar nu duc la formarea coloniilor.

În prezența anticorpilor neutralizanți anti-TGE beta, IL-11 și IL-4 induc creșterea clonală a progenitorilor primitivi Lin-Sca-1. Ei sinergizează amplificând formarea de colonii induse de IL-3 și GM-CSF, dar și de G-CSF și CSF-1, atât în linia matură Lin-1 cât și în linia primitivă Lin-Sca-1.

IL-11 și IL-9 acționează pe BFU-E, de asemenea sinergic, cu adaosul de IL-3 și GM-CSF determinând creșterea clonogenică a celulelor derivate din CD34+ în prezența sau absența TGF beta-3 (41,42).



Adiția lui IL-11 sau IL-9 la CSF scade activitatea supresivă a TGF beta-3, (IL-11 și CSF în combinație -sunt inhibate 52,4% comparativ cu 90% când sunt utilizate separat): TGF beta-3 exercită o activitate inhibitorie mai mare asupra celulelor tinere, decât asupra celulelor CD34+ mature; nici una din citokhinele folosite nu abrogă complet activitatea acestuia. Se concluează că TGF beta-3 își exercită efectul supresiv pe progenitorii hematopoietici în acord cu starea de diferențiere a celulelor țintă. Factorii de creștere permisivi IL-11 și IL-9 par să contracareze, în parte, reglarea negativă a TGF beta-3(43)

IL-11 în combinație cu SCF și G-CSF sau GM-CSF mărește semnificativ expresia populației de celule CD34+ izolate din cordonul ombilical uman; poate menține efectiv progenitori multipotenți primitivi și poate stimula diferențierea mai mult a precursorilor aparținând cordonului ombilical, decât a celor din măduva osoasă adultă (44).

Folosirea IL-11 pentru stimularea eritropoiezei nu este suficient studiată, iar scăderea hematocritului in vivo nu-l recomandă pentru tratament (45). Progresele biologiei moleculare au condus la ideea că factorii de creștere hematopoietici influențează proliferarea in vivo și in vitro datorită accelerării ciclului celular prin scurtarea timpului afectat diviziunii.

Analiza ciclului celular arată că IL-11 are potențialul de a induce o scurtare a timpului ciclului celular al progenitorilor, fără să afecteze distribuția fazelor acestuia, pe când SF (Steel Factor) are potențialul de a reduce timpul ciclului celular prin scăderea timpului reclamat de progenitorii hematopoietici, pentru a trece în faza G1 (46).

### **IL-11/AGIF (Adipo Genesis Inhibitory Factor)**

IL-11 supresează activitatea lipoproteinlipazei (EC3.1.1.34 LPL) în adipocite. Incubarea adipocitelor 3T3-L1 cu IL-11/AGIF duce în 8 ore la o reducere cu 75% a activității LPL, iar nivelul mRNA-LPL scade sub 30% determinând astfel și scăderea sintezei enzimei.

Supresia LPL de către IL-11/AGIF în adipocitele 3T3 se apreciază a fi cel puțin unul din principalele mecanisme ale reglării adipocitelor (47). Adipocitele se pot diferenția integral într-o cultură mieloidă umană pe termen lung. Adăugarea IL-11 determină creșterea dramatică a celulelor stromale și macrofagelor, dar inhibă marcat

acumularea de adipocite din celulele aderente, prin blocarea parțială a diferențierii preadipocitelor în adipocite.

IL-11 stimulează progenitori multipotenți diferențiați din măduva osoasă cultivată pe termen lung, inhibând însă adipogeneza în linia de fibroblaste (48).

Stimularea expresiei genei P450 (CYP 19) din țesutul adipos uman (și de aici biosinteza estrogenă), este reglată de un promotor cu elemente de răspuns la glucocorticoid, de un loc Sp1 și de un element IFN gama (GAS).

Acțiunea stimulatorie a serului (în prezența dexametazonei) poate fi înlocuită cu IL-11, LIF, OSM și IL-6. Stimularea celulelor cu aceste citokine duce la o rapidă fosforilare a Jak-1 pe reziduu de tirozină și al STAT-3, care fiind fosforilat se cuplează la elementul GAS în regiunea promotorială.

Deoarece țesutul adipos este un loc major de biosinteză estrogenă la bărbați vârstnici și la femeile în postmenopauză, calea care implică mecanismul de semnalizare Jak/STAT ce acționează împreună cu glucocorticoizi și Sp1, pare a fi principala cale prin care sunt legate biosintezele de estrogen la vârstnici (49).

## **IL-11 și țesuturile cartilajinoase și osoase**

Osteoclastele prin resorbția țesutului osos joacă un rol crucial în remodelarea osoasă. Osteoblastele prin factorii pe care-i elaborează, precum IL-6, au rolul de a regla activitatea osteoclastelor.

IL-11 produs de celulele stromale medulare, induce formarea de osteoclaste cu grad înalt de ploidie, în cocultură de măduvă murină și celule din calvarie. Osteoclastele formate în prezența IL-11 pot resorbi osul dermal și astfel apar gropi de resorbție; are loc de asemenea, eliberarea  $Ca^{45}$  din calvaria murină premarcată.

Un anticorp neutralizant anti-IL-11 supresează dezvoltarea osteoblastelor indusă de 1,25-dihidro vitamin D3 (hormon paratiroidian), IL-1 sau TNF, pe când inhibitorii IL-1 sau TNF nu au efect asupra formării osteoclastelor stimulate de IL-11.

Efectele IL-11 în dezvoltarea osteoclastelor sunt blocate de indomethacin dar totuși, ele sunt independente de statutul estrogenilor donatorilor de măduvă (50).

Osteoblastele sunt o importantă sursă de IL-11.

Celulele nestimulate ale osteosarcomului SaOS-2 produc cantități modeste de IL-11, iar stimulate cu rIL-1, TGF beta-1, PHT produc IL-11 în cantități sporite și o importantă acumulare de mRNA IL-11, în funcție de doză și de timp. Produsul elaborat determină proliferarea celulelor plasmocitomului T10D.

Abilitatea acestor celule de a produce IL-11 nu este caracteristică lor, deoarece și osteoblastele osului trabecular primar uman produc cantități semnificative de IL-11 când sunt stimulate cu TGF beta 1.

Deci, osteoblastele umane și celulele asemănătoare lor stimulate adecvat sunt producătoare de IL-11, concluzionându-se că IL-11 derivat din acestea are un rol important în medierea relațiilor osteoblast-osteoclast și în remodelarea osoasă normală și patologică (51).

Hughes F.S și colab. (52) arată că, IL-11 este o citokină osteotropică ce poate fi un important inhibitor al formării osului normal sau patologic. El poate fi indus și în condrocitele articulațiilor, ca și în sinoviocite, în care se acumulează mRNA IL-11 ca răspuns la acțiunea TGF beta 1 și IL-1 beta.

La acțiunea IL-6 sau a factorilor de creștere precum FGF, LIF, PDGF, răspunsul genei IL-11 este slab sau chiar nedetectabil. IL-11 inhibă metalo-proteinazele în condrocite și sinoviocite, dar nu afectează proliferarea condrocitelor sau creșterea activității stromilizinei. El nu contribuie la degradarea țesutului conjunctiv și induce efecte protective asupra țesutului articular (53).

## **IL-11 și celulele epitelului intestinal**

Proliferarea celulelor epiteliale ale intestinului subțire poate fi reglată și de semnale provenite din micromediu, semnale care conduc la diferențierea celulelor precursor în criptele intestinale. Administrarea IL-11 în micromediul creat șoarecilor care au suportat radio/chimioterapie, conduce la o semnificativă creștere a supraviețuirii acestora și la o rapidă refacere a mucoasei intestinale sever lezată de agenții toxici; refacerea este asociată cu o creștere a indexului mitotic al celulelor criptelor (54). IL-11 protejează animalele de dozele letale de agenți citotoxici, reducând în parte, nivelul agresiunii asupra epitelului intestinal. Poate fi un adjuvant terapeutic ideal, în protejarea celulelor normale fiind implicat și în controlul creșterii normale a epitelului intestinal (55).

RhIL-11 reface zonele lezate de acidul acetic la nivelul colonului șobolanilor Sprague-Dawley și transgenici Fischer 344, care exprimă beta 2-microglobulina și HLA-B27 (56).

Lezarea acută a mucoasei intestinului subțire în urma chimio- sau radioterapiei rozătoarelor, determină moartea celulelor. Urmează migrarea celulelor epiteliale din criptele intestinale spre vilozități, fără însă să se producă la baza criptelor o activitate mitotică compensatorie adecvată.

Administrarea IL-11 stimulează repararea rapidă a structurii vilozităților intestinale, la șoarecii asupra cărora s-a acționat cu chimioterapie și radioterapie, prin creșterea indexului mitotic al celulelor criptelor și prin alungirea microvilozităților (57). IL-11 administrat cu 24 și 48 ore înaintea testării, facilitează absorbția gastro- intestinală a fierului marcat din hrană (58).

### **IL-11 și ficatul**

Toți membrii familiei citokinei IL-6 (IL-6, LIF, CNTF, IL-11, OSM și CT-1) induc expresia genelor proteinelor fazei acute hepatice (APP). Analiza contribuției IL-11 și LIF asupra proteinelor fazei acute hepatice asupra hepatocitelor primare umane (privind în special producția proteinei reactive-C (CRP), a fibrinogenului și hepatoglobulinei), s-a comparat cu reacțiile determinate de aceste citokine la pacienții cu artrite reumatoide și spondiloartropatii

S-a demonstrat că IL-11 și LIF induc numai o stimulare minimală a producției de APP de către hepatocitele primare de la om, comparativ cu IL-6, cunoscut ca un inductor major, iar la pacienții cu afecțiunile menționate, nivelele de IL-11 și LIF din circulație nu contribuie semnificativ la producția de APP in vivo și că ele nu contează semnificativ în aceste afecțiuni (59).

Funcția de semnalizare a formei membranară și solubilă IL-11R de la șoarece, în celulele hepatomului de șoarece și uman este slabă la acțiunea IL-11 endogen. Celulele Hep G2 sintetizează constitutiv IL-11 rezultând o stimulare autocrină a expresiei genei.

Adiția la culturi de hepatom a receptorului IL-11R derivat din celulele COS amplifică marcat reglarea IL-11, costimulând expresia genelor proteinelor plasmatică ale fazei acute. Celulele care sunt natural deficiente ca răspuns la IL-11, sunt activate prin complexul IL-11R.

IL-11, ca răspuns la IL-11R mediază un semnal de tip IL-6, fapt verificat prin activarea STAT-1 și STAT-3. Se demonstrează astfel că, IL-11R poate fi un substituent al IL-6R în celulele hepatomului de șoarece și om (60).

IL-11 și mai puțin LIF sunt mediatori potențiali în sinteza metalotioninei în cultură de hepatocite de șobolani (61).

Cardiotrofin-1 (CT-1), membru al familiei de citokine IL-6 determină în hepatocitele primare de șobolan și în celulele hepatomului uman, expresia mRNA a macroglobulinei alpha2 la șobolan și a hepatoglobulinei la om. Răspunsul fazei acute depinde de doză (62).

## **IL-11 și inflamația**

rhIL-11 (IL-11 recombinat uman) alterează răspunsul inflamator prin scăderea reglării eliberării citokinelor proinflamatorii și scăderea producției oxidului nitric. Activitatea anti-inflamatorie a rhIL-11 reduce nivelele serice ale mediatorilor inflamatori precum TNF alpha, IL-1 beta, IL-12 și IFN gama la șoarecii tratați cu LPS și diminuează funcțiile macrofagelor în cultură.

La șoareci cu endotoxemie pretratați cu rhIL-11 se blochează nivelele serice de TNF alpha, IL-1 beta și IFN gamma, induse de LPS, dar fără efect pe nivelele serice ale IL-12 (p40), IL-6 sau IL-10. Efectele in vivo ale rhIL-11 asupra producției de mediatorii ai inflamației apar în parte, prin interacțiunea directă cu macrofagele.

Pretratarea macrofagelor peritoneale cu rhIL-11 duce la inhibarea cu peste 60% a producției indusă de TNF alpha, IL-1 beta, IL-12 (p40) și de oxid nitric indusă de LPS. Activitatea rhIL-11 nu este mediată prin inducția IL-10, IL-6 sau TGF beta 1. Deci, abilitatea rhIL-11 de a modula răspunsul inflamator nu este dependentă de citochinele anti-inflamatorii cunoscute și argumentează un rol al acestei citokine în atenuarea condițiilor inflamatorii (63).

IL-11 arată și activități termogene când acționează la nivelul ariei preoptice hipotalamice. În diferite doze el evocă febra, fără schimbare semnificativă a temperaturii corpului. Un tratament prealabil cu 5 mg/Kg de indomethacin (inhibator al sintezei prostaglandinei) administrat la șobolan, atenuează semnificativ răspunsul febril indus de 250 microni grame de IL-11. De aici aprecierea că IL-11 posedă proprietăți termogene când acționează la nivelul hipotalamusului (64).

În căile aeriene murine IL-11 cauzează inflamație limfocitică care determină obstrucția bronhiilor; inflamație evidențiată prin focare în care s-au infiltrat mononucleare. Focarele inflamatorii conțin un număr mare de B 220(+) și MHC cl II (+) și un număr mai mic de CD3(+), CD4(+), CD8(+).

Răspunsul fibrotic este reprezentat de cantități crescute de colagen tip III și tip I, fibre de actină alpha și celule musculare netede. IL-11 poate juca de asemenea, un important rol inflamator cu răspuns fibrotic în afecțiunile virale sau non-virale ale căilor aeriene umane (65).

## **IL-11 și celulele tumorale**

Liniile celulare de mielom multiplu uman (HMCL) dependente de IL-6 pot fi susținute și de IL-11. Liniile care răspund la IL-11 exprimă gena IL-11R și produc IL-1 autocrin. Toate HMCL exprimă IL-10R și astfel IL-10 induce expresia genei IL-11R, conferindu-i lui IL-11 posibilitatea de a activa HMCL care, în caz contrar nu răspund la IL-11. IL-10 produs de celulele HMCL sau cel din plasma pacienților, poate activa și celulele mielomului care nu exprimă IL-11R (66).

Proliferarea celulelor leucemiei mieloide acute (AML) umane, în urma acțiunii IL-3, GM-CSF și CSF este amplificată prin preincubarea cu IL-11, efect reversibil în blocarea cu anticorpi monoclonali anti-IL-11. IL-11 singur, are numai un efect slab asupra proliferării celulelor AML primare, dar combinarea IL-11 cu SCF și IL-3 duce la formarea optimă de colonii de celule leucemice. IL-11 este exprimat în celulele leucemice mieloide, activitatea lui proliferativă depinzând de citokine care acționează sinergic (67).

Hu J.P. și colab. (68) arată de asemenea, că la pacienții cu AML și în liniile celulare de AML, IL-11 administrat singur este insuficient pentru creșterea celulelor leucemice mieloide, dar creșterea poate fi amplificată de IL-3, GM-CSF și SF. Trei linii de alele pre-B și două linii de alele T nu răspund la IL-11 administrat singur și nici în combinație cu alte citokine; totuși, o amplificare a creșterii AML poate depinde de doză.

Tratarea cu dexametazonă a 3 linii de mielom uman (LP, OPM 2 și L 363) care elaborează IL-6 autocrin, în prezența sau absența citokinelor ce aparțin familiei gp130, respectiv IL-6, LIF, OSM și IL-11. Cu doze farmacologice determină o drastică stopare a creșterii în toate liniile celulare. LIF și OSM au efect clar de promovare a creșterii numai pe celulele OPM 2 (69).

Liniile de melanom (3 derivate din leziuni primare timpurii și 4 din tumori metastazice) produc nivele scăzute de mRNA-LIF și IL-11. Unele din aceste linii dețin cantități neînsemnate de proteine IL-11, care însă nu acționează ca factorii de creștere. Se susține că totuși, producția de LIF și IL-11 de către melanom, ar influența tumorile în cursul progresiei lor (70).

Glioblastoamele murine U373 și U87 exprimă IL-11 și mRNA când sunt stimulate cu IL-1 beta sau forbol ester, dar linia SH-SY5Y nu exprimă mRNA IL-11, ca răspuns la acești agenți. Expresia de către celulele gliale a IL-11 la nivel cerebral este importantă deoarece intervine în electrofiziologia neuronală, funcție suprapusă cu funcția citokinei neuroactivatoare IL-6 (71).

Șoarecii singeneici iradiați, cărora li s-a transplatat celule medulare de șoareci, dotate cu un retrovirus recombinat (MSCV IL-11- Murine Stem Cell Virus IL-11) cu gena IL-11 umană, manifestă efecte sistemice cum sunt pierderea țesutului adipos, atrofia timusului, unele alterări la nivelul proteinelor plasmatică, inflamarea pleoapelor și frecvent o stare hiperactivă. De asemenea, între 4-17 săptămâni se constată și creșterea de 1,5ori, a nivelului plaketelor din sângele periferic.

## BIBLIOGRAFIE

1. Kobayashi S., Teramura M., Oshimihi K., Mizoguchi H., Interleukin-11 (IL-11), a stromal cell-derived cytokine, has been known to act widely in hematopoietic and non-hematopoietic systems, *Leukemia and Lymphoma*, 1994, 15(1-2), 45-49.
2. Yang YC., Interleukin-11; an overview, *Stem Cells*, 1993, 11 (6), 474-486.
3. Neben S., Turner K., The biology of interleukin-11, *Stem Cells*, 1993, 11 Suppl. 2, 156-162.
4. Quesniaux VFJ., Interleukins 9,10,11,12 and kit ligand; a brief overview, *Res. Immunol.*,1992, 143, 385-400.
5. Du X.,Everett ET.,Wang G.,Lee WH.,Yang Z.,Williams DA., Murine interleukin-11 (IL-11) is expressed at high levels in hippocampus and expression is developmentally regulated in the testis, *Journal of Cellular Physiology*, 1996, 168 (2), 362-372.
6. Cherel M.,Sorel M, Apiou F.,Lebeau B, Dubois S., Jacques Y., Minvielle S., The human interleukin-11 receptor alpha gene (Il-11RA); genomic organization and chromosome mapping, *Genomics*, 1996, 32 (1), 49-53,
7. Nandurkar HH., Hilton DJ., Nathan P., Willson T., Nicola N., Begley CG., The human IL-11 receptor requires gp130 for signalling ; demonstration by molecular cloning of the receptor, *Oncogene*, 1996, 12 (3), 585-593.
8. Cherel M., Sorel M., Lebeau B., Dubois S., Moreau JF., Bataille B., Minvielle S., Jacques Y., Molecular cloning of two isoforms of a receptor for the human hematopoietic cytokine interleukin-11, *Blood*, 1995, 86 (7), 2534-2540.
9. Davidson AJ.et. al.(4), Expression of murine interleukin-11 and its receptor alpha-chain in adult and embryonic tissues, *Stem Cells*, 1997, 15 (2), 119-124.
10. Bilinski P.et al.(5), Two differentially expressed interleukin-11 receptor genes in the mouse genome, *Biochemical Journal*, 1996, 320 (2), 359-363.
11. Hilton DJ., Hilton AA., Raicevic A.,Rakar S., Harrison-Smith M., Gough NM., Begley CG., Metcalf D., Nicola NA., Willson TA., Cloning of a murine IL-11 receptor alpha-chain ; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction, *EMBO Journal*, 1994, 13 (20), 4765-4775.
12. Yin T., Taga T., Tsang ML., Yasukawa K., Hishimoto T., Yang YC., Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11-mediated signal transduction, *Journal of Immunology*, 1993, 151 (5), 2555-2561.



13. Fourcin M., Chevalier S., Lebrun JJ., Kelly P., Pouplard A., Wijdenes J., Gascan H., Involvement of gp130/interleukin-6 receptor transducing component in interleukin-11 receptor, *European Journal of Immunology*, 1994, 24 (1), 277-280.
14. Romas E., Udagawa N., Zhou H., Tamura T., Saito M., Taga T., Hilton DJ., Suda T., Ng KW., Martin TJ., The role of gp130-mediated signals in osteoclast development regulation of interleukin-11 production by osteoblasts and distribution of its receptor in bone marrow cultures, *Journal of Experimental Medicine*, 1996, 183 (6), 2581-2591.
15. Chevalier S., Fourcin M., Rolledo O., Wijdenes J., Pouplard-Barthelaix A., Gascon H., Interleukin-6 family of cytokines induced activation of different functional sites expressed by gp130 transducing protein, *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271 (21), 14764-14772.
16. Grotzinger J., Kurapkat G., Wollmer A., Kalai M., Rose-John S., The family of the IL-6 type cytokines ; specificity and promiscuity of the receptor complexes, *Proteins*, 1997, 27 (1), 96-109.
17. Taga T., Gp130, a shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuropoietic cytokines, *Journal of Neurochemistry*, 1996, 67 (11), 1-10.
18. Yin T., Yasukawa K., Taga T., Hishimoto T., Yang YC., Identification of a 130-kilodalton tyrosine-phosphorylated protein induced by interleukin-11 as JAK 2 tyrosine-kinase, which associates with gp130 signal transducer, *Experimental Hematology*, 1994, 22 (8), 467-472.
19. Yin T., Yang YC., Mitogen activated protein kinases and ribosomal S6 protein kinases are involved in signaling pathways shared by interleukin-11, interleukin-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M in mouse 3T3-L1 cells, *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269 (5), 3731-3738.
20. Fuhrer DK., Yang YC., Complex formation of JAK 2 with PP2A, P13K and yes in response to the hematopoietic cytokine interleukin-11, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 22 (2), 289-296.
21. Fuhrer DK., Feng GS., Yang YC., Syp associates with gp130 and Janus kinase 2 in response to interleukin-11 in 3T3-L1 mouse preadipocytes, *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 (42), 24826-24830.
22. Berger LC., Hawley TS., Lust JA., Goldman SJ., Hawley RG., Tyrosine phosphorylation of JAK-TYK kinases in malignant plasma cell lines growth-stimulated by interleukins 6 and 11, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1994, 202 (11), 596-605.
23. Wang XY., Fuhrer DK., Marshall MS., Yang YC., Interleukin-11 induces complex formation of Grb 2, Fyn, and JAK 2 in 3T3-L1 cells, *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 (4), 27999- 28802.
24. Yang L., Yang YC., Regulation of interleukin-11 (IL-11) gene expression in IL-1 induced primate bone marrow stromal cells, *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269 (5), 32732-32739.
25. Aman MJ., Bug G., Aulitzky WE., Huber C., Peschel C., Inhibition of interleukin-11 by interferon-alpha in human bone marrow stromal cells, *Experimental Hematology*, 1996, 24 (8), 863-867.

26. Elias JA., Zheng T., Whiting NL., Trow TK., Merrill WW., Zitnik R., Ray P., Alderman EM., IL-1 transforming growth factor-beta regulation of fibroblast-derived IL-11, *Journal of Immunology*, 1994, 152 (5), 2421-2429.
27. Zheng T., Nathanson MH., Elias JA., Histamine augments cytokine-stimulated IL-11 production by human lung fibroblasts, *Journal of Immunology*, 1994, 153 (107), 4742-4752.
28. Teramura M., Kobayashi S., Yoshinaga K., Iwabe K., Mizoguchi H., Effect of interleukin-11 on normal and pathological thrombopoiesis, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1996, 38 Suppl, 99-102.
29. Kobayashi S., Teramura M., Sugawara I., Oshimi K., Mizoguchi H., Interleukin-11 acts as an autocrine growth factor for human megakaryoblastic cell lines, *Blood*, 1993, 81 (4), 889-893.
30. Yonemura Y., Kawakita M., Masuda T., Fujimoto K., Takatsuki K., Effect of recombinant human interleukin-11 on rat megakaryopoiesis and thrombopoiesis in vivo ; comparative study with interleukin-6, *British Journal of Haematology*, 1993, 84 (1), 16-23.
31. Suen Y., Chang M., Lee SM., Buzby JS., Cairo MS., Regulation of interleukin-11 protein and mRNA expression in neonatal and adult fibroblasts and endothelial cells, *Blood*, 1994, 84 (12), 4125-4134.
32. Chang M.et.al, Differential mechanisms in the regulation of endogenous levels of thrombopoietin and interleukin-11 during thrombocytopenia; insight into the regulation of platelet production, *Blood*, 1996, 88 (9), 3354-3362.
33. Goldman SJ., Preclinical biology of interleukin-11 ; a multifunctional hematopoietic cytokine with potent thrombopoietic activity, *Stem Cells*, 1995, 13 (5), 462-471.
34. Chang M., Williams A., Ishizawa L., Knoppel A., van de Ven C., Cairo MS., Endogenous interleukin-11 (IL-11) expression is increased and prophylactic use of exogenous IL-11 enhances platelet recovery and improves survival during thrombocytopenia associated experimental, group B Streptococcal sepsis in neonatal rats, *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 1996, 22 (1), 57-67.
35. Cairo MS., Plunicett JM., Nguyen A., Schendel P., van de Ven C., Effect of interleukin-11 with and without granulocyte colony-stimulating factor on in vivo neonatal rat hematopoiesis ; induction of neonatal thrombocytosis by interleukin-11 and synergistic enhancement of neutrophilia by interleukin-11 + granulocyte colony-stimulating factor, *Pediatric Research*, 1993, 14 34(1), 56-61.
36. Quesniaux VF., Interleukin-11, *Leukemia and Lymphoma*, 1994, 14 (3-4) 241-249.
37. Kuriya S., Ogata K., An E., Hamaguchi H., Yokose N., Anzai Y., Nomura T., A novel megakaryocyte potentiator produced by MC-1 human lung cancer cell line, *Pathobiology*, 1993, 61 (5-6), 256-267.
38. Aryama Y., Misawa S., Sonoda Y., Synergistic effects of stem cell factor and interleukin-6 or interleukin-11 on the expansion of murine hematopoietic progenitors in liquid suspension culture, *Stem Cells*, 1995, 13 (4), 404-413.
39. Neben S., Donaldson D., Sieff C., Mauch P., Bodine D., Ferrara J., Yetz-Adape J., Turner K., Synergistic effects of interleukin-11 with other growth factors on the expansion of murine hematopoietic progenitors and maintenance of stem cells in liquid culture, *Experimental Hematology*, 1994, 22 (4), 353-359.

40. de Haan G., Dontje B., Engel C., Loeffler M., Nijhof W., In vivo effects on interleukin-11 and stem cell factor in combination with erythropoietin in the regulation of erythropoiesis, *British Journal of Haematology*, 1995, 90 (4), 783-790.
41. Jacobsen FW., Keller JR., Ruscetti FW., Veiby OP., Jacobsen SE., Direct synergistic effects of IL-4 and IL-11 on proliferation of primitive hematopoietic progenitor cells, *Experimental Hematology*, 1995, 23 (9), 990-995.
42. Neben S., Donaldson D., Fitz L., Calvetti J., Neben T., Turner K., Kirayama F., Ogawa M., Interleukin-4 (IL-4), in combination with IL-11 or IL-6 reverses the inhibitory effect of IL-3 on early B lymphocyte development, *Experimental Hematology*, 1996, 24 (7), 783-789.
43. Lemoli RM., Fogli M., Fortuna A., Tura S., Interleukin-11 ( IL-11 ), and IL-9 counteract the inhibitory activity of transforming growth factor beta 3 ( TGF beta 3 ) on human primitive hematopoietic progenitor cells, *Haematologica*, 1995, 80 (1), 5-12.
44. van de Ven C., Ishizawa L., Law P., Cairo MS., Il-11 in combination with SLF and G-CSF or GM-CSF significantly increases expansion of isolated CD34 cell population from cord blood vs adult bone marrow, *Experimental Hematology*, 1995, 23 (12), 1289-1295.
45. Ratajczak J., Ratajczak M., Kuczynski W., In vitro studies for evaluating the influence of recombinant interleukin-11 on human erythropoiesis. Potential clinical implications, *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej J.*, 1995, 93 (6), 461-467.
46. Tanaka R., Katayama N., Ohishi K., Mahmud N., Itoh R., Tanaka Y., Komada Y., Minami N., Sakurai M., Shirakawa S., et.al., Accelerated cell-cycling of hematopoietic progenitor cells by growth factors, *Blood*, 1995, 86 (1), 73-79.
47. Ohsumi J., Miyadai K., Kawashima I., Sakakibara S., Yamaguchi J., Itoh Y., Regulation of lipoprotein lipase synthesis in 3Tr-Li adipocytes by interleukin-11 adipogenesis inhibitory factor GIF), *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1994, 32 (4), 705-712.
48. Keller DC., Du XX, Srour EF., Hoffman R., Williams DA., Interleukin-11 inhibits adipogenesis and stimulates myelopoiesis in human long term marrow cultures *Blood*, 1993, 82 (5), 1428-1435.
49. Zhao Y., Nichols JF., Bulun SE., Mendelson CR., Simpson ER., Aromatase P450 (CYP 19) gene expression in human adipose tissue. Role of a jak/STAT pathway in regulation of the adipose specific promoter, *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 (27), 16449-16457.
50. Girasole G., Passeri G., Jilka RL., Manolagas SC., Interleukin-11 ; a new cytokine critical for osteoclast development, *Journal of Clinical investigation*, 1994, 93 (4), 1516-1524.
51. Elias JA., Tang W., Horowitz MC., Cytokine and hormonal stimulation of human osteosarcoma interleukin-11 production, *Endocrinology* 1995, 136 (2), 489-498.
52. Hughes FJ., Howells GL., Interleukin-11 inhibits bone formation in vitro, *Calcified Tissue International*, 1993, 53 ( 5), 362-364.
53. Maier R., Ganu V., Lotz M., Interleukin-11, an inducible cytokine in human articular chondrocytes and synoviocytes, stimulates the production of the tissue inhibitor of metallo-proteinases, *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268 (29), 21527-21532.

54. Du XX., Doerschuk CM., Orazi A., Williams DA., A bone marrow stromal-derived growth factor interleukin-11, stimulates recovery of small intestinal mucosal cells after cytoablative therapy, *Blood*, 1994, 83 (1), 33-37.
55. Booth C., Potten CS., Effects of IL-11 on the growth of intestinal epithelial cells in vitro, *Cell Proliferation*, 1995, 28 (1), 581-594.
56. Keith JC.Jr., Albert L., Sonis ST., Pfeiffer CJ., Schaub RG., IL-11, a pleiotropic cytokine ; exciting new effects of IL-11 on gastrointestinal mucosal biology, *Stem Cells*, 1994, 12, suppl.1, 79-89.
57. Orazi A., Du XX., Yang Z., Kashai M., Williams DA., Interleukin-11 prevents apoptosis and accelerates recovery of small intestinal mucosa in mice treated with combined chemotherapy and radiation, *Laboratory Investigation*, 1996, 75 (9), 33-42.
58. Baynes RD., Cook JD., Keith J., Interleukin-11 enhances gastrointestinal absorption of iron in rats, *British Journal of Haematology*, 1995, 91 (1), 230-233.
59. Gabay C., Singwe M., Genin B., Meyer O., Mentha G., Le Coultre C., Vischer T., Guerne PA., Circulating levels of IL-11 and leukemia inhibitory factor (LIF) do not significantly participate in the production of acute-phase proteins by the liver, *Clinical Experimental Immunology*, 1996, 105 (2), 260-265.
60. Baumann H., Wang Y., Morella KK., Lai CF., Dams H., Hilton DJ., Hawley RG., Mackiewicz A., Complex of the soluble IL-11 receptor and IL-11 acts as IL-6 type cytokine in hepatic and nonhepatic cells, *Journal of Immunology*, 1996, 157 (1), 284-290.
61. Coyle P., Philcox JC., Rofe AM., Metallothionein induction in cultured rat hepatocytes by arthritic rat serum, activated macrophages, interleukin-6, interleukin-11 and leukemia inhibitory factor, *Inflammation Research*, 1995, 44 (1), 475-481.
62. Peters M., Roeb E., Pennica D., Meyor zum Buschenfelde KH., Rose-John S., A new hepatocyte stimulating factor cardiotrophin-1, *FEBS Letters*, 1995, 372 (2-3), 177-180.
63. Trecicchio WL. et. al., Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production, *Journal of Immunology*, 1996, 157 (8), 3627-3634.
64. Lopez-Valpuesta FJ., Myers RD., Fever produced by interleukin-11 (IL-11) infected into the anterior hypothalamic pre-optic area of the rat is antagonized by indomethacin, *Neuropharmacology*, 1994, 33 (8), 989-994.
65. Tang W. et. al., Targeted expression of IL-11 in the murine airway causes lymphocytic inflammation bronchial remodeling and airways obstruction, *Journal of Clinical Investigation*, 1996, 98 (12), 2845-2853.
66. Lu ZY., Gu ZJ., Zhang XG., Wijdenes J., Neddermann P., Rossi JF., Klein B., Interleukin-10 induces interleukin-11 responsiveness in human myeloma cell lines *FEBS Letters*, 1995, 377 (3), 515-518.
67. Lemoli RM., Fogli M., Fortuna A., Amabile M., Zucchini P., Grande A., Martinelli G., Visani G., Ferrari S., Tura S., Interleukin-11 (IL-11) acts as a synergistic factor for the proliferation of human myeloid leukaemia cells, *British Journal of Haematology*, 1995, 91 (2), 319-326.
68. Hu JP., Cesano A., Santoli D., Clark SG., Hoang T., Effects of interleukin-11 on the proliferation and cell cycle status of myeloid leukemic cells, *Blood*, 1993, 81 (6), 1586-1592.

69. Juge-Morineau N., Francois S., Puthier D., Godard A., Bataille R., Amiot M., The gp130 family cytokines IL-6, LIF and OSM but not IL-11 can reverse the anti-proliferative effect of dexamethasone on human myeloma cells, *British Journal of Haematology*, 1995, 90 (3), 707-710.
70. Paglia D., Oran A., Lu C., Kerbel RS., Sauder DN., McKenzie RC., Expression of leukemia inhibitory factor and interleukin-11 by human melanoma cell lines ; LIF, IL-6 and IL-11 are not coregulated, *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 1995, 15 (5), 455-460.
71. Murphy GM. Jr., Bitting L., Majewska A., Schmidt K., Song Y., Wood CR., Expression of interleukin-11 and its encoding mRNA by glioblastoma cells, *Neuroscience Letters*, 1995, 196 (3), 153-156.
72. Hawley RG., Fong AZ., Ngan BY., deLanux VM., Clark SC., Hawley TS., Progenitor cell hyperplasia with rare development of myeloid leukemia in interleukin-11 bone marrow chimeras, *Journal of Experimental Medicine*, 1993, 178 (4), 1175-1188.

VERIFICAT  
2007

---

Tiparul s-a executat sun c-da nr. 473/1998 la  
Tipografia Editurii Universității din București

---



VERIFICAT  
2017



ISBN: 973 - 575 - 260 - 3

Lei 5500