

RIASSUNTO

L'ormone somatotropo (GH) ha effetti trascrizionali sulle cellule di molti organi, direttamente mediante l'attivazione del proprio recettore (GHR) o indirettamente attraverso induzione dell'IGF-1 o di altri mediatori. La presenza del GHR in quasi tutti i tessuti cellulari rende l'azione del GH sistemica anche se, ad oggi, ancora non ben caratterizzata. Il sistema immunitario è tra i distretti in cui è documentato l'effetto dell'ormone somatotropo mediante meccanismi tuttora poco conosciuti.

Obiettivo primario di questo studio è determinare l'effetto trascrizionale del GH sui monociti di sangue periferico. Queste cellule sono state scelte per la significativa espressione del GHR sulla propria superficie e perché facilmente accessibili. Sebbene la risposta trascrizionale all'ormone somatotropo sia tessuto specifica, lo studio degli effetti del GH sui monociti può servire da modello per altri tipi cellulari ed evidenziare differenze tra soggetti sani e affetti da deficit di GH (GHD).

La diagnosi di GHD, durante l'età evolutiva, si basa classicamente sulla valutazione clinica associata alle indagini laboratoristiche (test di stimolo asse GH-IGF-1) e radiologiche. Benché i test di provocazione rappresentino il *gold standard* diagnostico, presentano una scarsa riproducibilità e accuratezza e sono caratterizzati da un numero considerevole di falsi positivi e talvolta negativi.

Obiettivo secondario di questo studio è identificare quadri trascrizionali differenziali tra soggetti sani e con GHD.

A tale scopo, è stata confrontata l'espressione genica di monociti di bambini sani e con GHD, in coltura, in condizioni basali e dopo stimolo con GH ricombinante (rh-GH).

Sono stati selezionati due gruppi di 12 soggetti, *gruppo S*: bambini sani di sesso maschile con altezza e velocità di crescita normali e *gruppo D*: bambini di pari sesso ed età e affetti da GHD, non ancora in terapia sostitutiva. Sono stati purificati i monociti di sangue periferico per sottrazione con anticorpi monoclonali e il livello di purezza è stato determinato mediante citofluorimetria a flusso laminare con anticorpi monoclonali. I monociti sono stati coltivati per 24 ore con e senza rh-GH. L'RNA totale è stato estratto e congelato fino all'analisi che è stata eseguita contemporaneamente per tutti i punti sperimentali mediante metodologia *Next Generation Sequencing* su piattaforma Illumina. L'espressione differenziale di mRNA è stata analizzata confrontando i monociti di bambini sani e con GHD, stimolati in coltura con rh-GH o non stimolati: GHD non stimolati (*D-CNTR*) vs sani non stimolati (*S-CNTR*); sani non stimolati (*S-CNTR*) vs sani stimolati (*S-GH*); GHD non stimolati (*D-CNTR*) vs GHD stimolati (*D-GH*); GHD stimolati (*D-GH*) vs sani stimolati (*S-GH*).

L'analisi tra i gruppi *D-CNTR* vs *S-CNTR* individuava 58 geni con espressione differenziale. 23 geni, inoltre, risultavano modulati dal GH nei bambini sani e 4 geni nei bambini con GHD. L'analisi differenziale tra i gruppi *D-GH* vs *S-GH*, invece, identificava 150 geni con espressione differenziale. Infine, l'analisi mediante software *Ingenuity Pathway Analysis* evidenziava un aumento significativo dei pathways immunitari *NFAT* e di *maturazione delle cellule dendritiche* e un incremento coerente nell'espressione di marcatori dendritici (*HLA-A*, *HLA-C*, *CCR7*) nei monociti di bambini con GHD rispetto ai bambini sani, dopo stimolo in coltura con GH ricombinante.

In conclusione, i risultati di questo studio hanno dimostrato un chiaro effetto trascrizionale del GH sui monociti, diretto e indiretto attraverso mediatori intermedi, suggerendo di valutare più approfonditamente lo stato pro-infiammatorio dei bambini con deficit dell'ormone della crescita.

Inoltre, questo studio ha identificato un profilo di espressione genica dei monociti di bambini con GHD che, una volta verificato in un numero più ampio di pazienti, potrebbe rappresentare una alternativa ai test di stimolo e orientare la diagnosi del deficit di GH.

Il nostro studio, infine, apre prospettive future ad ulteriori lavori che abbiano, come obiettivo, quello di individuare, un profilo trascrizionale o singoli geni specifici per la condizione di GHD.

ABSTRACT

Somatotropic hormone (GH) has transcriptional effects on the cells of many organs, directly by activating its receptor (GHR) or indirectly through induction of IGF-1 or other mediators. The presence of GHR in almost all cellular tissues makes GH action systemic even if, to date, still not well characterized. The immune system is among the districts where the effect of the somatotropic hormone is documented by mechanisms that are still poorly understood. The primary objective of this study is to determine the transcriptional effect of GH on peripheral blood monocytes. These cells were chosen for the significant expression of GHR on their surface and because they are easily accessible. Although the transcriptional response to somatotropic hormone is specific tissue, the study of the effects of GH on monocytes can serve as a model for other cell types and highlight differences between healthy subjects and those with GH deficiency (GHD). The diagnosis of GHD, during the developmental age, is classically based on the clinical evaluation associated with radiological and laboratory investigations (GH-IGF-1 axis stimulus test). Although provocation tests represent diagnostic gold standard, they have poor reproducibility and accuracy and are characterized by a considerable number of false positives and sometimes negatives. The secondary objective of this study is to identify differential transcriptional profiles between healthy subjects and with GHD. For this purpose, the gene expression of monocytes from healthy children and with GHD was compared in culture, under basal conditions and after stimulation with recombinant GH (rh-GH). Two groups of 12 subjects were selected, group S: healthy male children with normal height and growth rate and group D: children of the same sex and age and suffering from GHD, not yet in replacement therapy. Peripheral blood monocytes were purified by subtraction with monoclonal antibodies and the purity level was determined by laminar flow cytofluorimetry with monoclonal antibodies. Monocytes were grown for 24 hours with and without rh-GH. Total RNA was extracted and frozen until the analysis was performed simultaneously for all the experimental points using the Next Generation Sequencing methodology on Illumina platform. Differential expression of mRNA was analyzed by comparing the monocytes of healthy children and with GHD, stimulated in culture with rh-GH or not stimulated: GHD not stimulated (D-CNTR) vs healthy not stimulated (S-CNTR); healthy non-stimulated (S-CNTR) vs healthy stimulated (S-GH); non-stimulated GHD (D-CNTR) vs stimulated GHD (D-GH); GHD stimulated (D-GH) vs healthy stimulated (S-GH). The analysis between D-CNTR vs S-CNTR groups identified 58 genes with differential expression. Furthermore, 23 genes were modulated by GH in healthy children and 4 genes in children with GHD. Differential analysis between D-GH vs S-GH groups, on the other hand, identified 150 genes with differential expression. Finally, analysis performed by Ingenuity Pathway Analysis software showed a significant increase in NFAT immune pathways and dendritic cell maturation and a consistent increase in the expression of dendritic markers (HLA-A, HLA-C, CCR7) in monocytes of children with GHD compared to healthy children, after stimulation in culture with recombinant GH. In conclusion, the results of this study have demonstrated a clear transcriptional effect of GH on monocytes, direct and indirect through intermediate mediators, suggesting to evaluate the pro-inflammatory status of children with growth hormone deficiency more in depth. Furthermore, this study identified a gene expression profile of monocytes in children with GHD which, once verified in a larger number of patients, could represent an alternative to stimulus tests and guide the diagnosis of GH deficiency. Finally, our study opens future perspectives in order to identify a transcriptional profile or specific genes specific to GHD condition.