

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN

“SPERIMENTAZIONE TECNOLOGICA, IMMUNOLOGICA ED IMMUNOGENETICA:

SUA APPLICAZIONE NEGLI XENOTRAPIANTI E

NEI PRELIEVI DI ORGANO PER TRAPIANTO UMANO”

XXIII CICLO

Dott.ssa FRANCESCA MARIA PEZZELLA

TESI

STUDIO EX VIVO DI RIGENERAZIONE EPATICA:
VALUTAZIONE BIOLOGICO-FUNZIONALE

Coordinatore: **Chiar.mo Prof. G.Vadalà**

Tutor: **Chiar.ma Prof.ssa E. Cacciola**

INTRODUZIONE

In condizioni fisiologiche, un epatocita su 2000 ÷ 3000 si divide per mantenere la massa fisiologica del fegato; tale capacità rigenerativa implicita dell'organo viene ampiamente stimolata quando tale massa si riduce a causa, ad esempio, di lesioni virali, tossiche o ischemiche ovvero dopo l'asportazione chirurgica di una porzione di tessuto epatico (1).

Il processo rigenerativo porta, quindi, a un'aumentata crescita cellulare (iperplasia controllata) e, in letteratura, diversi studi condotti sul ratto hanno dimostrato come, fino al 75% della massa epatica rimossa chirurgicamente, viene rigenerata entro una settimana (2).

Pertanto il trapianto degli epatociti potrebbe essere un possibile approccio clinico alternativo al trapianto di fegato nei pazienti con insufficienza epatica acuta e patologie a base metabolica (3).

Gli epatociti adulti hanno però un potenziale proliferativo limitato che probabilmente non è sufficiente per ripopolare il fegato dell'ospite.

Pertanto è stato preso in considerazione l'utilizzo di cellule staminali mesenchimali (MSCs), viste le loro singolari caratteristiche. Esse, infatti se

opportunamente stimulate, possono specializzarsi seguendo percorsi di differenziazione molto diversi tra loro (4-5).

Le MSCs sono quindi cellule pluripotenti che potrebbero essere impiegate con successo nel trattamento di patologie degenerative e/o di carattere autoimmune.

In particolar modo sono stati condotti numerosi studi volti ad evidenziare il potenziale terapeutico delle MSCs nelle patologie epatiche. I risultati ottenuti suggeriscono che il trattamento con le MSCs riduce il tasso di mortalità nei ratti con danno epatico CCL4 indotto, rispetto ai controlli (6-7-8).

E' anche importante sottolineare come il meccanismo di protezione contro il danno e la fibrosi epatica che si ottiene tramite le MSCs consista nella soppressione dell'infiammazione successiva al rilascio di citochine pro infiammatorie da parte dei macrofagi residenti epatici in risposta alla necrosi prodotta dal CCL4 (9-10). Il meccanismo di immunomodulazione con cui agiscono le MSCs deve essere chiarito tramite studi più approfonditi.

SCOPO

Lo scopo dello studio consiste nel verificare come le cellule staminali mesenchimali possano stimolare, tramite la loro capacità immunomodulatoria, la rigenerazione endogena garantendo una sopravvivenza maggiore dopo necrosi.

Abbiamo, pertanto, valutato la rigenerazione epatica in ratti dopo necrosi CCl₄-indotta e somministrazione di cellule staminali, misurando a differenti *time-points*, i livelli delle transaminasi (GOT, GPT) e della fosfatasi alcalina (FAL), la conta piastrinica (PLT) e dei globuli rossi (RBC), i tempi di coagulazione ed il fibrinogeno (FIB).

MATERIALI E METODI

Differenze di ordine anatomico-funzionale e metabolico esistono tra il sistema epato-biliare dell'uomo e quello dei più comuni animali da esperimento.

Nel ratto il fegato è suddiviso in una serie di lobi separati molto nettamente l'uno dall'altro.

Si distinguono tre lobi principali: uno mediano o centrale, uno laterale destro ed

uno laterale sinistro.

Il lobo mediano è normalmente il più voluminoso. Questo lobo e quello laterale sinistro rappresentano congiuntamente il 70% dell'intera massa epatica; il lobo laterale destro, il più piccolo, è invece proporzionale al lobo sinistro.

La ricostituzione della massa di fegato, non corrisponde ad una ricostituzione anatomica dei lobi, ma soltanto ad un aumento di volume per aumento del numero delle cellule della porzione residua.

ANIMALI

Per lo studio della rigenerazione tramite cellule staminali sono stati impiegati 100 ratti Wistar (peso 250-300 gr) di entrambi i sessi ottenuti dalla ditta Harlan Nossan e mantenuti nello stabulario del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Catania. Tutti gli esperimenti sono stati condotti nel rispetto delle normative vigenti (L116/92). Per tutta la durata degli esperimenti gli animali sono stati mantenuti ad una temperatura di 22 ± 2 °C sotto alternati cicli di luce-buio di 12h ciascuno, ed alimentati con mangime standard attualmente in commercio.

Gli animali sono stati suddivisi in 2 gruppi principali: Donatori e Riceventi.

GRUPPO DONATORI (composto da 20 esemplari)

Questi ratti costituiranno il pool dei donatori dai quali sono state prelevate le cellule staminali dalle epifisi delle ossa lunghe (femore e tibia) e sono stati effettuati prelievi di sangue carotideo per determinare i valori (controllo) degli esami del sangue AST, ALT, FAL, RBC, PLT, INR, FIB, previa induzione anestesiológica con Zoletil 100 (100mg/Kg) e mantenimento anestesiológico con Isoflurano (2-3%). Successivamente i ratti sono stati sacrificati mediante CO₂.

GRUPPO RICEVENTE A

Rappresenta il gruppo CCL₄ ed è costituito da un numero totale di 40 animali, suddivisi in tre sottogruppi: A0, A1, A2.

Tutti i gruppi hanno ricevuto una somministrazione intraperitoneale di CCL₄ (Fluka cod87030), in una dose di 2ml/Kg, previa diluizione con olio d'oliva in un rapporto di 1:1.

Gli animali sono stati sottoposti a induzione anestesiológica con Zoletil 100 (100mg/Kg) ed anestesia con Isoflurano (2-3%).

- **A0:** è il gruppo costituito da 8 ratti che hanno ricevuto il CCL4, senza alcuna somministrazione successiva né di MSC né di fisiologica. Rappresenta il time-point a 24h dalla sola somministrazione di CCL4.
- **A1:** rappresenta il gruppo di ratti a cui sono state trapiantate, attraverso l'arteria caudale, e dopo l'induzione del danno epatico acuto mediante la somministrazione del CCL4, le cellule staminali mesenchimali (MSC) in una concentrazione di 3×10^6 , risospese in 400 μ l di soluzione fisiologica NaCl 0,9%. E' costituito da un numero di 16 ratti, 4 per ogni time-point preso in considerazione dopo l'infusione delle MSC (2^a, 3^a, 4^a, 7^a giornata).
- **A2:** rappresenta il gruppo di controllo di ratti a cui è stata somministrata unicamente fisiologica NaCl 0,9%, in eguale volume di 400 μ l, dopo l'induzione del danno acuto epatico mediante CCL4. E' costituito da un numero di 16 ratti, 4 per ogni time-point preso in considerazione dopo l'infusione della fisiologica (2^a, 3^a, 4^a, 7^a giornata).

GRUPPO RICEVENTE B

Rappresenta il gruppo Olio, veicolo con cui è somministrato il CCL4, ed è costituito da un numero totale di 40 animali, suddivisi in tre sottogruppi: B0, B1, B2.

Tutti i gruppi hanno ricevuto una somministrazione intraperitoneale di olio, in una dose di 2ml/Kg.

Gli animali sono stati sottoposti a induzione anestesiológica con Zoletil 100 (100mg/Kg) ed anestesia con Isoflurano (2-3%) all'infusione carotidea delle cellule staminali mesenchimali (MSC).

- **B0:** rappresenta il gruppo di ratti che ha ricevuto l'Olio, senza alcuna somministrazione successiva né di MSC né di fisiologica. Rappresenta il time-point a 24h dalla sola somministrazione dell'olio.
- **B1:** rappresenta il gruppo di ratti a cui sono state trapiantate le cellule staminali mesenchimali(MSC), attraverso l'arteria caudale, e dopo somministrazione dell'olio d'oliva ed ad una concentrazione di 3×10^6 e risospeso in 400 μ l di soluzione fisiologica NaCl 0,9%. E' costituito da un numero di 16 ratti, 4 per ogni time-point preso in considerazione

dopo l'infusione delle MSC(2^a, 3^a, 4^a, 7^a giornata).

- **B2:** rappresenta il gruppo di controllo di ratti a cui è stata somministrata unicamente soluzione fisiologica NaCl 0,9%, in eguale volume di 400µl, dopo somministrazione dell'olio. E' costituito da un numero di 16 ratti, 4 per ogni time-point preso in considerazione dopo l'infusione della fisiologica (2^a, 3^a, 4^a, 7^a giornata).

L'infusione delle MSC è avvenuta a 24h dalla somministrazione del CCL4 e dell'olio (veicolo). Ciascuno dei sei gruppi sperimentali: A0, A1, A2, B0, B1, B2 è stato monitorato secondo questi time-point 1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 7^a giornata dall'avvelenamento di CCL4/Olio e infusione di MSC/fisiologica, considerando la variazione del peso dell'animale, e i parametri chimico-clinici di GOT, GPT, FAL, INR, FIB, RBC, PLT.

I campioni di sangue venoso sono stati raccolti in provette tipo *vacutainer* contenenti come anticoagulante EDTA per la valutazione di piastrine e dei globuli rossi (XE-2100 Sysmex Dasit) e Sodio Citrato per la valutazione dei test di coagulazione (BCS Dade Behering).

Per la ricerca delle transaminasi GOT e GPT e della FAL sono state utilizzate

provette da sierologia.

Successivamente al prelievo, tali campioni sono stati sottoposti alla centrifugazione a 4.000 rpm per 10 min a 10°C (MEGAFUGE 1.0R Heraeus Instrument), il surnatante è stato aliquotato in eppendorf da 1ml ed in seguito analizzato tramite saggi colorimetrici con misurazione dell'assorbanza a 340 nm per GOT e GPT e a 404 nm per FAL (ARCHITECT 8000).

RISULTATI

Le cellule staminali mesenchimali, MSC, sono state infuse nei gruppi di ratti riceventi A1 (CCL4 più cellule) e B1 (CCL4 più cellule), ai quali è stato prodotto un danno epatico da necrosi.

Alcuni tipi di danno tissutale, quale quello provocato dal CCL4, determinano il rilascio in circolo di fattori solubili (citochine, fattori di crescita) in grado di richiamare le cellule staminali a livello del sito del danno (11).

Secondo studi già condotti la necrosi epatica instaurata somministrando 2ml/Kg di CCL4 come soluzione al 50% in olio di mais, dovrebbe evidenziarsi a livello delle aree centrolobulari tra il primo ed il terzo giorno dopo l'intossicazione(9).

Per tale motivo le MSC verranno inoculate nel ratto a 24h dall'insulto con il CCL4.

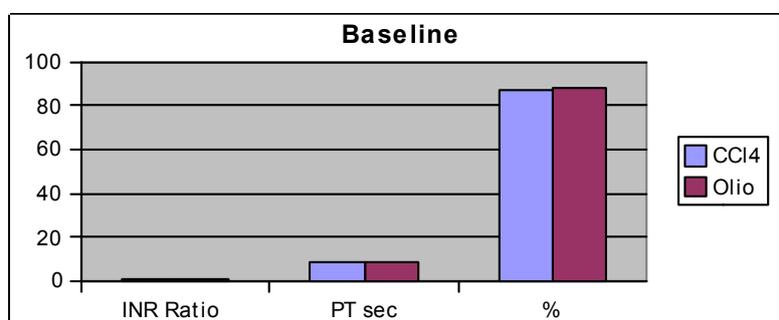
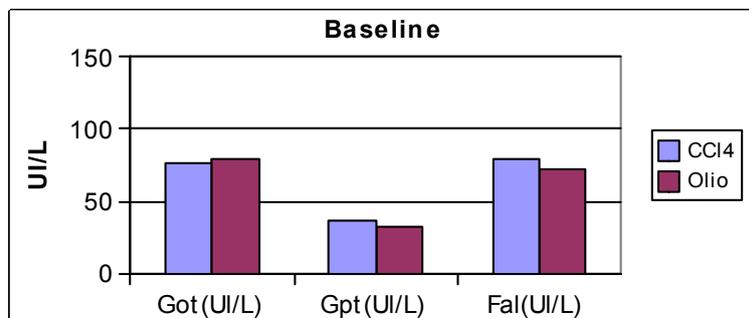
E' descritto che il fegato dovrebbe ritornare pressoché alla normalità già dal settimo giorno.

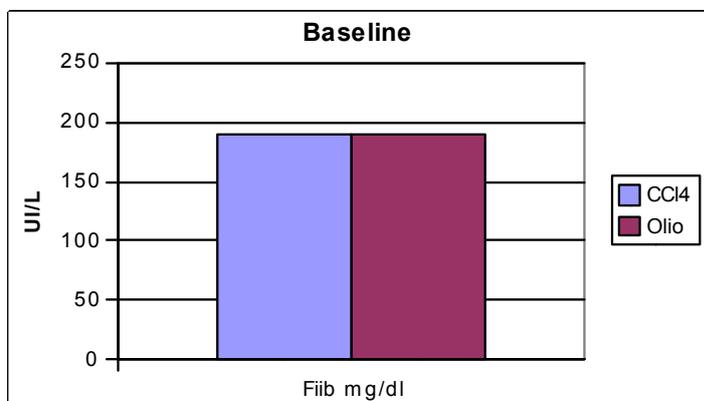
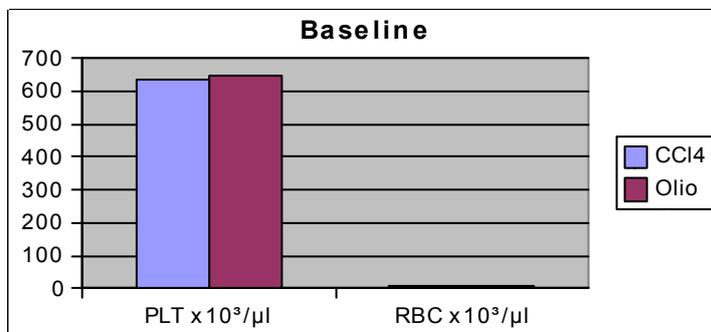
Il nostro studio vuole comparare l'eventuale ruolo delle MSC nella rigenerazione e nella immunomodulazione sia al momento della massima espressione del danno (fra il 1° ed il 3° giorno) sia nella fase di rigenerazione spontanea (7^a giornata). Pertanto a decorrere dal tempo zero sino alla 7^a giornata dalla somministrazione del CCL4 e dell'olio, per ciascun gruppo è stato effettuato un sacrificio, da considerarsi come il time-point giornaliero per valutare l'evoluzione del danno e l'eventuale effetto protettivo-rigenerativo delle MSC. L'evoluzione del danno acuto, dall'induzione alla normalizzazione, è stata monitorata tramite analisi chimico-cliniche (GOT, GPT, FAL, INR, PLT, RBC, FIB) e dopo epatectomia, indagini di immunoistochimica e indagini di immunofluorescenza.

Per l'analisi statistica sui parametri di laboratorio, è stato utilizzato il software SPSS (SPSS Inc, Chicago USA) e R (Copyright © 2009. The R Foundation for Statistical Computing).

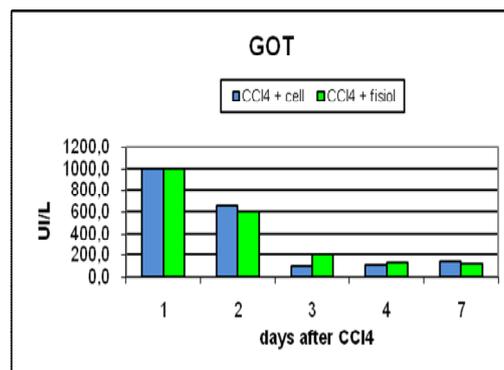
Sono state effettuate analisi chimico-cliniche anche sul gruppo dei 20 donatori per ottenere i valori al tempo zero di tutti i parametri necessari per valutare la funzionalità epatica.

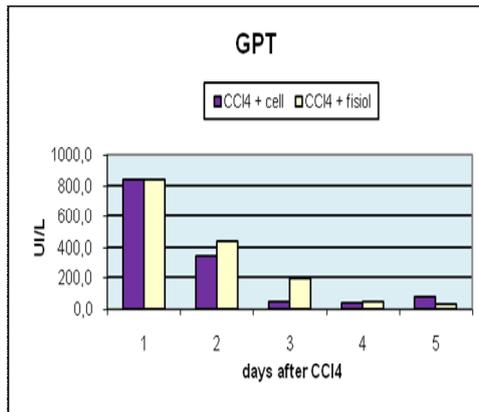
Tale gruppo è stato ulteriormente suddiviso in due sottogruppi da 10 elementi ciascuno, ognuno dei quali rappresenta il baseline per i gruppi riceventi A (CCL4) e B (Olio).



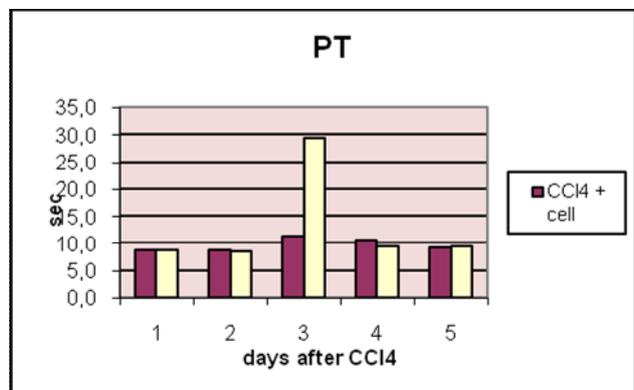
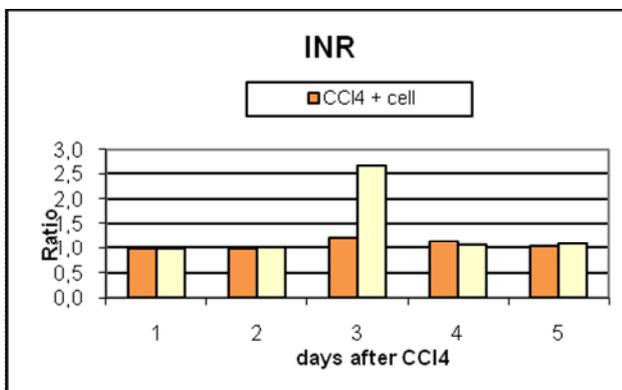


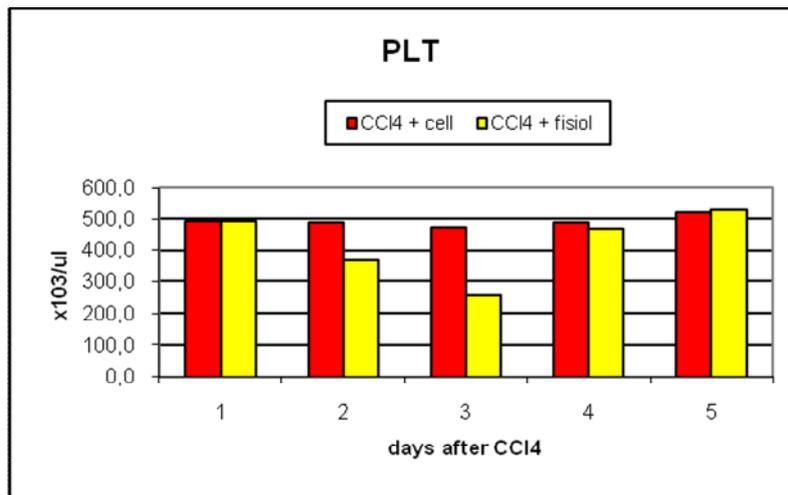
Nell'osservazione del processo di rigenerazione spontanea successiva alla necrosi CCL4 sono stati messi a confronto i gruppi A1 (CCL4+MSC) e A2 (CCL4 + sol. fisiologica). I dati ottenuti mettono in evidenza come già al terzo giorno dopo l'avvelenamento, nei ratti riceventi le MSCs si ha un recupero di funzionalità epatica. I valori delle transaminasi, infatti, mostrano una significativa divergenza con una media di 100.5 UI/L \pm 18.6 per la GOT e 48.5 UI/L \pm 15.1 U per la GPT nel gruppo A1, contro i 208UI/L \pm 36.7 per la GOT e 196.5UI/L \pm 27.3 per la GPT nel gruppo A2 (GOT p=0.002 GPT p=0.000).





Anche i valori della coagulazione (INR 1.2 ± 0.1 nel gruppo A1 vs. 2.7 ± 0.8 nel gruppo A2 $p=0.009$; PT $11.3 \text{ sec} \pm 1.0$ nel gruppo A1 vs $29.3 \text{ sec} \pm 6.3$ nel gruppo A2 $p=0.001$) e delle piastrine ($470.3 \times 10^3/\mu\text{l} \pm 58.81$ nel gruppo A1 vs. $257.8 \times 10^3/\mu\text{l} \pm 36.23$ nel gruppo A; $p=0.001$) sono significativamente differenti nei due gruppi e ciò conferma che il trattamento con le cellule staminali è capace di accelerare la rigenerazione del fegato danneggiato.





IMMUNOISTOCHIMICA

Le indagini Istochimiche e di Immunofluorescenza sono state condotte sui reperti autoptici dei fegati prelevati al momento del sacrificio.

Macroscopicamente il fegato dei ratti trattati con CCL4 si mostrava ingrossato e presentava placche bianche da intossicazione e numerose aderenze al peritoneo.



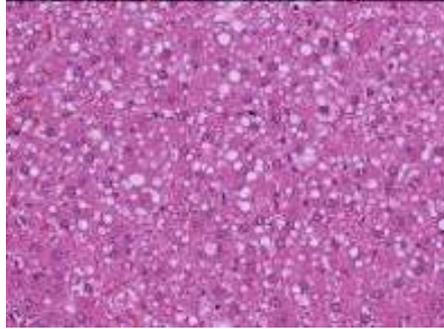
Fegato dopo intossicazione da CCL4

Nelle sezioni di fegato a 24h dalla somministrazione del CCL4, si osserva un danno acuto cellulare sottoforma di degenerazione balloniforme degli epatociti, soprattutto nella regione centrolobulare, associata a focale necrosi epatocitaria e ad infiltrato infiammatorio acuto di neutrofili e monociti.



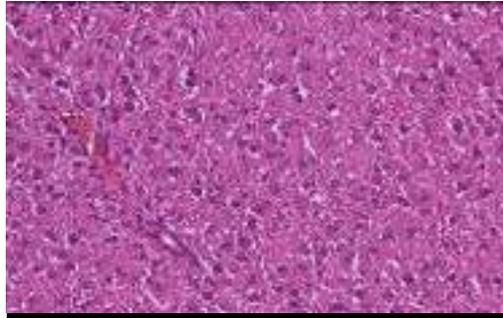
24h dal CCL4

Nelle sezioni di fegato a 48h dal CCL4 e 24h dall'infusione delle MSC, si osserva sempre un focale infiltrato linfocitario nello spazio portale. Persiste una vacuolizzazione citoplasmatica e degenerazione balloniforme degli epatociti, ma è assente la necrosi epatocitaria.



48h dal CCL4, 24h MSC

Già in 3^a giornata dal CCL4 e a 48h dalle MSC, l'architettura del parenchima epatico dà segni di rigenerazione epatica. Sono assenti aree di necrosi epatocitaria e di flogosi.



3^a giornata CCL4, 48h MSC

Nell'osservazione dei preparati istologici, si osserva chiaramente una rigenerazione accelerata; già in 3^a giornata, nei fegati trattati con MSC, rispetto ad una spontanea e fisiologica rigenerazione nei fegati trattati con il solo CCL4.

CONCLUSIONI

I dati ottenuti mostrano come tutti i parametri epatici di recupero funzionale siano significativamente più vicini alla norma nei ratti trattati con le cellule staminali rispetto ai controlli. Di particolare rilevanza è l'osservazione che i ratti a cui sono state infuse cellule staminali mostrano un anticipato recupero di funzionalità epatica al 3° giorno dopo l'avvelenamento con CCL4 rispetto ai ratti non riceventi le cellule staminali.

Questi risultati, se traslati nell'uomo, rappresentano una valida promessa per curare pazienti con epatopatia di natura infettiva, neoplastica o tossica ed assicurare una sopravvivenza "free-disease".

BIBLIOGRAFIA

1. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. *Liver regeneration*. Hepatology. 2006; 43(2 Suppl 1):S45-53.
2. Michalopoulos GK, DeFrances MC. *Liver regeneration*. Science.1997; 276(5309):60-6.
3. Dhawan A, Strom SC, Sokal E, Fox IJ Methods. *Human Hepatocytes transplantation*. Mol Biol.2010; 640:525-34.
4. Yagi K, Kojima M, Oyagi S, Ikeda E, Hirose M, Isoda K Kawase M, KondohM, OhgushiH. *Application of mesenchymal stem cells to liver regenerative medicine*. Yakugaku Zasshi 2008; 128(1):3-9
5. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegar O, HwangS, GardenerR et al. *Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell*.Cell 2001; 105:369-37
6. Isao Sakaida, Shuji Terai, Naoki Yamamoto, Koji Aoyama, Tsuyoshi Ishikawa, Hiroshi Nishina and Kiwamu Okita. *Trasplantation of bone marrow cell reduces CCL4-induced liver fibrosis in mice*. Hepatology 2004; 40(6):1301-11.
7. Dong-Chang Zhao, Jun-Xia Lei, Rui Chen, Wei-Hua Yu, Xiu-Ming Zhang, Shu-Ning Li, Peng Xiang. *Bone Marrow-derived masenchymal stem cell protect against experimental liver fibrosis in rats*. World J Gastroenterology 2005; 11(22):3431-3440
8. M.T. Abdel Aziz, H.M. Atta, S Mahfouz, H.H. Fouad, N.K. Roshdy, H.H. Ahmed, L.A. Rashed, D.Sabry, A.A. Hassouna, N.M. Hasan. *Therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells on experimental liver*

fibrosis. Clin Biochem. 2007 Aug; 40(12):893-9.

9. S. Pulavendram, J. Vignesh, C. Rose. *Differential anti-inflammatory and anti-fibrotic of transplanted mesenchymal vs. hematopoietic stem cells in carbony tetrachloride-induced liver injury in mice*. International Immunopharmacology 2010; in press.
10. Maciej M, Markiewsky, Dimitrios Mastellos, Ruxandra Tudoran, Robert A, De Angelis, ChristophW, Strey, Silvia Franchini, Rick A. Westel, Anna Erdei and John D. Lambris. *C3 and C4 Activation products of the third component of complement(C3) are critical for normal liver recovery after toxic injury*. J.Immunology 2004; 173:747-754.
11. Kode JA, SMukherjee, MV Joglekar and AA Hardikar. *Mesenchymal stem cells: immunobiology and role immunomodulation and tissue regeneration*. Cytotherapy 2009; 11:377-91.