

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

SCUOLA DI DOTTORATO IN : BIOLOGIA E MEDICINA DELLA
RIGENERAZIONE

INDIRIZZO: INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRAPIANTI
CICLO XXIII

**INGEGNERIA DEI TESSUTI E CELLULE STAMINALI
ADULTE. TECNICHE PER LA RICOSTRUZIONE IN VITRO DI
TESSUTI GHIANDOLARI**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Pierpaolo Parnigotto

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Pierpaolo Parnigotto

Supervisore : Ch.ma Prof.ssa Roberta Cortivo

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche

Dottoranda : **LISA MICHELOTTO**

SOMMARIO

RIASSUNTO	pag. 1
ABSTRACT	pag. 2
1. INTRODUZIONE	pag. 3
1.1 Il fegato	pag. 3
1.1.1 Struttura del fegato	pag. 4
1.1.2 Cellule del fegato	pag. 8
1.1.3 Funzioni del fegato	pag.11
1.1.4 Cellule staminali del fegato	pag. 12
1.1.5 Capacità rigenerativa del fegato	pag. 13
1.2 Il pancreas	pag. 19
1.2.1 Anatomia macroscopica	pag. 19
1.2.2 Anatomia microscopica	pag. 20
1.2.3 Regolazione	pag. 23
1.2.4 Diabete mellito	pag. 24
1.3 Ingegneria dei tessuti	pag. 26
1.3.1 Biomateriali	pag. 27
1.3.2 Componente biologica	pag. 32
1.4 Cellule mesenchimali staminali (MSC)	pag. 34
1.4.1 Caratteristiche colturali	pag. 36
1.4.2 Applicazioni	pag. 37
1.5 Array CGH	pag. 40
2 SCOPO DELLA TESI	pag. 42

3 MATERIALE E METODI	pag. 43
3.1 Materiali	pag. 43
3.1.2 Biomateriali	pag. 43
3.2 Isolamento e colture cellulari	pag. 43
3.2.1 Isolamento e coltura di HLSC di ratto	pag. 43
3.2.2 Isolamento delle cellule Ito	pag. 44
3.2.3 Isolamento delle cellule mesenchimali staminali umane (MSC)	pag.44
3.2.4 Isolamento di cellule Beta di ratto	pag. 46
3.2.5 Isolamento di fibroblasti umani	pag. 46
3.2.6 Semina su biomateriale di HLSC e cellule Ito e caricamento su bioreattore	pag. 47
3.2.7 Semina su biomateriale di fibroblasti umani, MSC e cellule Beta	pag. 48
3.3 Test di proliferazione MTT	pag. 49
3.4 Analisi dei marcatori epatici e pancreatici	pag. 50
3.4.1 Estrazione e quantificazione dell'RNA	pag. 50
3.4.2 Sintesi di cDNA	pag. 51
3.4.3 RT-PCR	pag. 51
3.5 Analisi morfologica	pag. 52
3.5.1 Inclusioni in OCT	pag. 52
3.5.2 Inclusione in paraffina	pag. 53
3.5.3 Analisi immunoistochimica	pag. 54
3.5.4 Analisi istologica	pag. 55
3.6 Array CGH	pag. 56

4 RISULTATI	pag. 58
4.1 Differenziamento in vitro delle cellule staminali epatiche	pag. 58
4.1.1 Analisi morfologica	pag. 51
4.1.2 Test di proliferazione MTT	pag. 60
4.1.3 Produzione di albumina	pag. 61
4.1.4 Array CGH	pag. 62
4.2 Induzione in vitro del differenziamento di cellule mesenchimali adulte in Isole di Langerhans	pag. 67
4.2.1 Scelta del biomateriale: MTT e analisi morfologica	pag. 67
5 DISCUSSIONE	pag. 69
5.1 Studio del differenziamento in vitro delle cellule staminali epatiche	pag. 69
5.2 Induzione in vitro del differenziamento di cellule mesenchimali adulte in Isole di Langerhans	pag. 72
BIBLIOGRAFIA	pag. 74

RIASSUNTO

Nella prima parte del dottorato è stato effettuato lo studio e il miglioramento delle condizioni del differenziamento in vitro di cellule staminali pluripotenti presenti nel fegato, le HLSC, in senso epatico. Dopo aver valutato che la semina in condizioni statiche di tali cellule in spugne di collagene non permetteva una buona distribuzione in tutto lo scaffold e queste rimanevano per lo più indifferenziate, sono state effettuate delle colture dinamiche utilizzando un bioreattore per garantire una corretta perfusione del terreno di coltura. Inoltre sono state effettuate sia delle co-culture di HLSC con le cellule Ito del fegato sia semina in un terreno normalmente utilizzato per la coltura di epatociti e in un medium per cellule staminali, per valutare come la variazione di un terreno di coltura potesse influire sulla staminalità delle cellule. Sono state effettuate analisi morfologiche, istologiche, di proliferazione cellulare e di espressione genica delle colture. Queste hanno dimostrato come l'utilizzo di un bioreattore e di un terreno per cellule staminali possa permettere l'organizzazione delle HLSC in clusters tipici del fegato fino a strati profondi della spugna e l'aumento del differenziamento funzionale in una popolazione di epatociti maturi.

Un'altra parte del dottorato è stata improntata nello studio del differenziamento in vitro di cellule staminali in Isole di Langerhans all'interno di biomateriali. Durante una prima fase di studio si sono utilizzate cellule Beta del pancreas per capire in quale forma di scaffold a base dell'estere benzilico dell'acido ialuronico potessero crescere meglio. La situazione migliore riguardava l'uso di spugne. Avendo però le cellule una scarsa capacità proliferativa, si è deciso di utilizzare come alternativa le Cellule Staminali Mesenchimali (MSC) e sono state effettuate prove di co-culture con cellule Beta utilizzando terreni diversi per valutare lo stato differenziativo delle MSC. Tali prove sono ancora in corso.

ABSTRACT

The aim of the first part of the PhD was the study and the improvement of the in vitro differentiation conditions of pluripotent human liver stem cells, HLSCs, into hepatocytes. After the evaluation that these cells cultivated in collagen sponge and in static conditions do not allow a good distribution in all the scaffold and that cells remain in an indifferential status, dynamic cultures were performed by using a bioreactor to assure a correct medium perfusion. Moreover, we performed co-cultures of HLSCs with hepatic stellate cells (Ito) in a medium for hepatocytes and in a medium for stem cells to investigate how the variation of a medium can influence the stem condition of cells. Morphological, histological, cells proliferation and genic expression analysis demonstrated how the use of a bioreactor and the employment of a stem cells medium, guarantee first of all HLSC's organization in typical liver clusters up to the sponges deepest layers and the increase of the functional differentiation in a population of mature hepatocytes.

In the second part of the PhD, the in vitro stem cells differentiation in Langerhans Islet by using biomaterials was studied. During the first step of the study we used Beta cells in order to understand in which form of benzilic ester scaffold cells can grow better. The more appropriate conditions concerns the use of sponges. However, cells showed a low proliferation rate and so we used Mesenchymal Stem Cells (MSC). Co-cultures of MSC with Beta cells by using different medium are still in progress to evaluate the differential status of Mesenchymal Stem Cells.

1. INTRODUZIONE

1.1 *IL FEGATO*

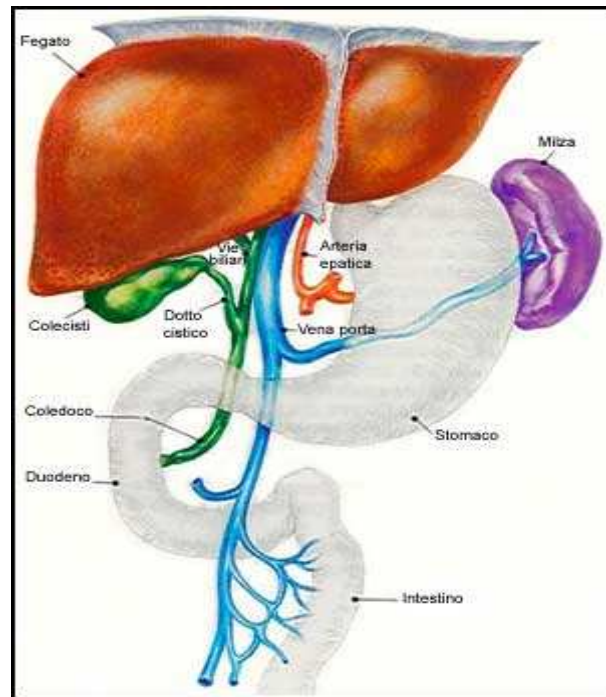


Figura 1.1 Il fegato

Il fegato è la ghiandola più voluminosa del corpo umano: il suo peso è di 1,5 Kg nel cadavere, a cui si aggiunge il peso del sangue che circola al suo interno nel vivente, pari a circa 500g. Si trova al di sotto del diaframma che lo separa dai polmoni, dal cuore, dallo stomaco e il colon trasverso. L'organo presenta due facce, una antero-posteriore o diaframmatica e una postero-inferiore o viscerale. La faccia diaframmatica è convessa e con la superficie liscia; presenta un lungo solco sagittale che la divide in due parti o lobi: il lobo destro e il lobo sinistro, quest'ultimo di minori dimensioni. La faccia viscerale è leggermente concava e presenta tre solchi disposti a formare un H: un solco trasverso e due solchi sagittali, destro e sinistro. Nel solco trasverso, che corrisponde all'ilo dell'organo, si trovano l'arteria epatica, la vena porta e i dotti epatici, oltre ai vasi linfatici e ai nervi, che costituiscono il peduncolo epatico.

1.1.1 Struttura del fegato

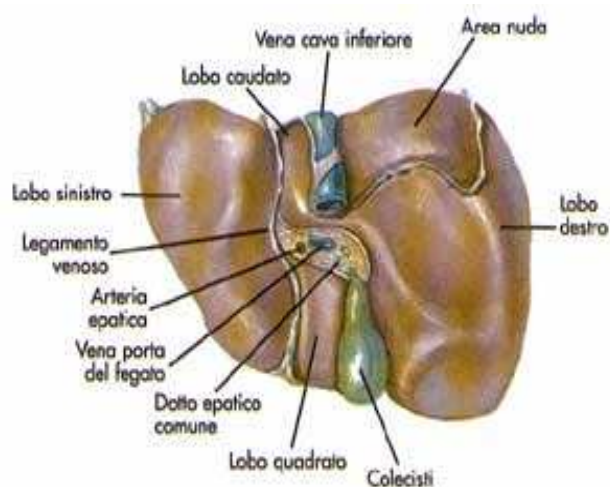


Figura 1.2 Struttura del fegato

Il fegato è intercalato fra il circolo portale e quello della vena cava inferiore: il sangue lo raggiunge attraverso due correnti di afflusso, l'arteria epatica e la vena porta, e lo lascia attraverso le vene epatiche che confluiscono nella vena cava inferiore. L'arteria epatica e la vena porta penetrano nel fegato in corrispondenza dell'ilo e le vene epatiche si aprono nella vena cava inferiore a livello della faccia posteriore dell'organo. L'arteria epatica, che porta al fegato il sangue ossigenato proveniente dall'aorta e che si origina dal tronco celiaco, si divide in prossimità dell'ilo in un tronco destro e uno sinistro che all'interno del parenchima epatico si diramano ulteriormente in tre rami ciascuno. Ognuna di queste prime suddivisioni dà origine ad esili rami destinati all'irrorazione dei vasi maggiori stessi, delle vie biliari e della capsula del fegato e prosegue poi nelle arteriole interlobulari che decorrono negli spazi portalì e vanno poi a gettarsi nei sinusoidi epatici come arteriole perilobulari.

I rami d'origine della vena porta sono le due vene mesenteriche superiore e inferiore e la vena splenica. La vena porta raccoglie sangue venoso dal tubo gastroenterico, dalla milza e dal pancreas e lo reca al fegato; a livello dell'ilo di quest'organo si divide in un tronco destro e uno sinistro, i quali, penetrando nel parenchima, si ramificano ulteriormente formando i rami perilobulari che si aprono nei sinusoidi

intralobulari e i rami interlobulari. Le diramazioni più sottili della vena porta penetrate nei lobuli si risolvono in capillari di tipo sinusoidale diretti verso la parte centrale del lobulo stesso. La loro confluenza all'apice del lobulo determina la formazione della vena centrolobulare che ne percorre tutto l'asse fino alla sua base dove termina sbocando nella vena sottolobulare; dalla confluenza di quest'ultime si formano le vene epatiche che portano il sangue dal fegato alla vena cava inferiore.

L'ilo è costituito da una depressione posta sulla superficie inferiore del fegato. Riceve il fascio neurovascolare diretto verso il fegato e costituito principalmente dai due condotti biliari epatici, dall'arteria epatica, dalla vena porta, da alcuni vasi linfatici e nervi che costituiscono il plesso nervoso epatico. Ciascuna struttura del fascio è ricoperta dalla guaina epatobiliare di Glisson, composta da tessuto connettivo lasso, la stessa che ricopre la superficie delle facce del fegato e che accompagna ciascun vaso sino alla penetrazione in uno o più segmenti epatici. Nello spazio tra un vaso e l'altro è presente del tessuto connettivo lasso di supporto.

La struttura del fegato è quella tipica di un organo pieno. Al di sotto del rivestimento peritoneale, che lo collega agli organi vicini e alle formazioni parietali, il fegato è ricoperto, come suddetto, da un denso strato di tessuto connettivo, la capsula fibrosa o *capsula di Glisson*, in cui decorrono vasi sanguigni, linfatici e nervi che si approfondano nel parenchima sottostante con brevi e robusti setti. In corrispondenza dell'ilo dell'organo la capsula fibrosa, penetra all'interno ramificandosi più volte e delimitando aree più piccole e circoscritte di parenchima epatico, denominate *lobuli epatici*, che rappresentano l'unità anatomica e funzionale dell'organo. Il parenchima del fegato è quindi organizzato in un numero elevato di lobuli epatici, aventi la forma di piramidi poligonali ad apice tronco del diametro di 1 mm e altezza di circa 1.5-2 mm, delimitati da uno strato di tessuto connettivo (connettivo reticolare). Ogni lobulo è formato da numerose lamine cellulari costituite da un singolo strato di cellule, gli *epatociti*; le lamine sono perforate e anastomizzate fra loro e delimitano un sistema di spazi vascolari irregolari, i *sinusoidi epatici*. Le lamine cellulari e i capillari mostrano una disposizione radiale convergendo dalla periferia del lobulo verso il centro, come i raggi di una ruota. L'asse del lobulo è occupato dalla vena centrolobulare, tributaria di una vena epatica, nella quale si aprono i sinusoidi cosicchè la sua parete risulta tipicamente cribrata.

La zona dove tre o più lobuli adiacenti vengono a contatto tra loro assume un aspetto vagamente stellato e viene detta *spazio portale* o *portobiliare*. In esso decorrono le diramazioni interlobulari della vena porta, dell'arteria epatica e del condotto biliare che formano la cosiddetta *triade portale*; il sangue che circola in queste diramazioni viene convogliato dalla periferia del lobulo nella rete venosa costituita dai sinusoidi che si spinge tra le lamine cellulari di epatociti e collega i vasi interlobulari con la vena centrolobulare. Un'unità funzionale più piccola del lobulo epatico è l'*acino epatico*.

I sinusoidi epatici costituiscono la rete capillare sanguigna del lobulo; è una tipica rete venosa in quanto interposta tra due sistemi venosi: quello della vena porta con le sue ramificazioni perilobulari e interlobulari e il sistema delle vene centrolobulari, tributarie. I sinusoidi hanno decorso molto tortuoso e, anastomizzandosi fra loro, formano le reti intralobulari. Il loro lume è ampio e la parete sottile e discontinua per la presenza nell'endotelio di pori e fenestrature di dimensione e posizione variabili. I pori, dal diametro di 0.1-0.2 μm , sono spesso riuniti in gruppi con disposizione simile ad un setaccio, mentre le fenestrature, la cui presenza è ancora discussa, possono raggiungere un diametro anche superiore a 1 μm . Il rivestimento interno dei sinusoidi è costituito da un endotelio nel quale vengono distinti due tipi cellulari: le *cellule endoteliali* ed elementi di forma variabile e irregolare che sporgono nel lume del sinusoidi, le *cellule di Kupffer*. Oltre all'endotelio, la parete dei sinusoidi è costituita da una membrana basale atipica, poiché appare discontinua e spesso assente. Di conseguenza, il sangue attraversa facilmente la barriera endoteliale venendo a contatto diretto con gli epatociti circostanti, situazione che incrementa lo scambio di metaboliti tra il sangue e il parenchima epatico. La membrana basale dei sinusoidi e la superficie degli epatociti sono separati da uno spazio interstiziale, lo *spazio di Disse* o spazio perisinusoidale, che di norma è largo 0,2-0,5 μm , ma che si dilata in condizioni di anossia. Tale spazio contiene esili fibre collagene (soprattutto di tipi I, III e IV) che formano la trama di supporto ai sinusoidi e vi accede anche il plasma che passa attraverso le aperture dell'endotelio sinusoidale venendo in contatto diretto con la superficie degli epatociti. Nello spazio di Disse si trovano anche le *cellule di Ito* implicate nella secrezione della maggior parte dei componenti della matrice delle lamine epatiche, ma anche nell'accumulo di lipidi e vitamina A e

nella secrezione di fattori di crescita che agiscono nelle fasi di rigenerazione e rinnovamento del fegato.

1.1.2 Cellule del fegato

Epatociti: sono le cellule più numerose del fegato, ne costituiscono l'80% del volume e circa il 60% di numero. Sono di forma poliedrica, con sei o più facce e misurano in sezione 20-25 μm . Spesso sono polinucleate e tetraploidi, con un numero di nuclei che può arrivare a anche a quattro. Nel citoplasma delle cellule epatiche si trovano tutti gli organuli cellulari oltre ad inclusi caratteristici, che assumono una localizzazione precisa in relazione ad una specifica funzione dell'epatocita. I lisosomi, i perossisomi e le vescicole dell'apparato di Golgi sono generalmente localizzati in prossimità del polo biliare dove sono impegnati in funzioni secretive. Il reticolo endoplasmatico è abbondante e l'estensione delle sue cisterne subisce continue variazioni che riflettono le diverse funzioni nelle quali l'epatocita è impegnato. Per esempio, sulle membrane del reticolo endoplasmatico liscio si trovano gli enzimi implicati nella sintesi del colesterolo a partire dai lipidi assorbiti dal sangue attraverso il polo vascolare dell'epatocita. Quest'organulo svolge altre importanti funzioni, come quelle di detossificazione di alcuni farmaci. Il reticolo endoplasmatico granulare e i ribosomi liberi sono invece impegnati nella sintesi delle proteine plasmatiche, quali albumina e fibrinogeno, riversate in circolo attraverso il polo vascolare. Inoltre, la particolare funzione di deposito del fegato, giustifica come, a seconda del regime alimentare o della fase di digestione, la quantità di glicogeno o dei grassi vari nella cellula epatica. I mitocondri sono numerosi e con creste ben sviluppate, ma possono subire variazioni di numero e di forma in rapporto alle specifiche esigenze funzionali della cellula. Il nucleo è voluminoso e tondeggiante e frequentemente si osservano casi di poliploidia. Gli epatociti che entrano in mitosi sono numerosi soltanto durante i processi rigenerativi. Le facce degli epatociti sono a stretto contatto fra loro e, da un lato delimitano i capillari biliari e sono dette poli biliari, dall'altro prospettano verso le pareti sinusoidali.

Sulle facce degli epatociti rivolte verso i sinusoidi, dette poli vascolari, sono presenti piccole vescicole di pinocitosi e numerosi corti microvilli che aumentano la superficie della membrana plasmatica a contatto con il plasma. I microvilli si proiettano nello spazio di Disse che separa l'endotelio sinusoidale dalle lamine cellulari, ma che si può talvolta estendere anche tra gli epatociti adiacenti formando strette fessure intercellulari, i recessi perisinusoidali. Si crea così un intricato sistema di spazi pericapillari e intercellulari dove il filtrato plasmatico si raccoglie e circola e dove avvengono gli scambi tra epatociti e sangue.

Le superfici cellulari che delimitano i canalicoli biliari sono a contatto e pianeggianti ad eccezione di una piccola area dove sono scavati a doccia. La giustapposizione delle incavature a doccia di due cellule contigue delimita la parete del capillare biliare, nel cui lume sporgono i brevi microvilli del polo biliare degli epatociti. Le cellule epatiche sono unite da giunzioni strette aventi lo scopo di impedire che la bile si infiltri tra gli spazi intercellulari obbligandola così a circolare solo nel sistema canalicolare, in quanto la bile è tossica.

Le superfici cellulari volte verso i sinusoidi sono più ampie rispetto a quelle che delimitano i canalicoli biliari, in quanto gli epatociti sono maggiormente impegnati nei processi di assorbimento e secrezione che avvengono a livello del polo vascolare piuttosto che nella secrezione della bile.

La struttura e il metabolismo degli epatociti variano in rapporto alla loro distanza dall'afflusso del sangue portale. Nel lobulo classico le cellule epatiche in posizione più periferica hanno un metabolismo più elevato e un maggior numero di mitocondri poiché più favorite a ricevere sangue arterioso rispetto agli epatociti delle zone intermedie e delle zone circostanti la vene centrolobulare.

Cellule stellate di Ito: sono di origine mesenchimale e molto meno numerose degli epatociti. Sono poste tra le lamine, alla base degli epatociti e hanno una forma stellata e irregolare. Il loro citoplasma è ricco di vescicole lipidiche contenenti vitamina A e il loro compito è di secernere le principali sostanze della matrice, tra cui il collagene di tipo III e reticolino. Sono fondamentali nella rigenerazione del fegato a seguito di lesioni o interventi chirurgici in quanto secernono fattori di crescita e concorrono all'omeostasi del fegato secernendo altre sostanze.

Cellule endoteliali: costituiscono l'endotelio dei sinusoidi venosi. Sono molto appiattite e sporgono nel lume dei sinusoidi solo con la porzione contenente il nucleo. I loro margini sono spesso embricati, soprattutto in corrispondenza delle aree dove sono localizzate le aperture più ampie. Dal punto di vista ultrastrutturale queste cellule non mostrano caratteristiche peculiari, se non la rara presenza di mitocondri. La superficie luminale presenta piccole vescicole di pinocitosi e corti e scarsi microvilli.

Cellule di Kupffler: sono i macrofagi del fegato, sono derivati dei monociti e si collocano nel lume dei sinusoidi venosi. Sono dotate di sottili prolungamenti citoplasmatici di tipo ameboide che possono risultare o in contatto con le cellule endoteliali o localizzate nello spazio sottoendoteliale o, dove le discontinuità dell'endotelio sono più ampie, inserite nella parete endoteliale stessa. Il loro corpo cellulare è prevalentemente contenuto nel lume sinusoidale e contiene un nucleo grande e chiaro. A differenza delle cellule endoteliali, sulla superficie di tali cellule si trovano numerosi microvilli, invaginazioni e pseudopodi. Sono cellule dotate di un'intensa attività fagocitaria appartenenti al sistema dei fagociti mononucleati. Alcuni autori ritengono che siano semplicemente ancorate alla parete capillare e che possano liberarsi e passare in circolo come macrofagi. Nel loro citoplasma si trovano infatti lisosomi deputati alla lisi del materiale fagocitato, quali frammenti di eritrociti e batteri. Sembra inoltre che, in particolari condizioni, partecipino alla distruzione degli eritrociti usurati (emocateresi), dai quali preleverebbero il pigmento derivato dall'emoglobina, la bilirubina, per passarlo poi alle cellule epatiche che lo utilizzano nella produzione della bile.

Gli epatociti secernono la bile in un sistema di spazi intercellulari, i capillari biliari, localizzati tra le cellule epatiche; essi costituiscono una rete di canalicoli all'interno del lobulo epatico tramite i quali la bile viene convogliata nei canalicoli biliari presenti negli spazi portali. I canalicoli biliari costituiscono una fitta rete tridimensionale che, alla periferia del lobulo, sbocca in sottili condotti, i canali di Hering o colangioli, dotati di un epitelio cubico e lume stretto. Negli spazi portobiliari i colangioli continuano con i canalicoli biliari interlobulari, tappezzati da epitelio cilindrico. I condotti intraepatici decorrono nel connettivo contenuto negli

spazi portobiliari e confluiscono poi in condotti di calibro sempre maggiore fino a formare due condotti intraepatici voluminosi che provengono dai lobi destro e sinistro del fegato, la cui parete è costituita da cellule cilindriche e provviste di numerosi microvilli apicali.

1.1.3 Funzioni del fegato

Le funzioni del fegato sono espletate dalle cellule del fegato, gli epatociti.

1) Il fegato produce e secerne la bile, usata per emulsionare i grassi. Parte della bile viene riversata direttamente nel duodeno, parte viene accumulata nella cistifellea.

2) Il fegato svolge numerose funzioni nel metabolismo dei carboidrati

- la gluconeogenesi, ovvero la sintesi del glucosio a partire da alcuni amminoacidi, dall'acido lattico o dal glicerolo;
- la glicogenolisi, ovvero la formazione del glucosio dal glicogeno (avviene anche all'interno dei muscoli);
- la glicogenosintesi, ovvero la sintesi del glicogeno a partire dal glucosio;

3) Il fegato permette la demolizione dell'insulina e di altri ormoni;

4) Nel fegato avviene il metabolismo delle proteine.

5) Il fegato inoltre interviene nel metabolismo dei lipidi:

- vi avviene la sintesi del colesterolo
- vi avviene la sintesi dei trigliceridi.

6) Il fegato produce i fattori di coagulazione I (fibrinogeno), II (trombina), V, VII, IX, X e XI, nonché la proteina C, la proteina S, l'epcidina e l'antitrombina.

7) Il fegato demolisce l'emoglobina, creando metaboliti che vengono aggiunti alla bile come pigmenti.

8) Il fegato demolisce numerose sostanze tossiche e numerosi farmaci nel processo noto come metabolismo dei farmaci. Il processo può portare ad intossicazione, quando il metabolita è più tossico del suo precursore.

9) Il fegato converte l'ammoniaca in urea.

10) Il fegato funge da deposito per numerose sostanze, tra cui il glucosio (come glicogeno), la vitamina B12, il ferro e il rame.

11) Nel feto fino al terzo mese, il fegato è la sede principale della produzione di globuli rossi; viene rimpiazzato in questo compito dal midollo osseo alla 32ma settimana di gestazione.

12) Una delle principali attività del fegato è la disintossicazione dell'organismo da tossine, scorie ed altri elementi nocivi. La più importante di tali azioni disintossicanti è la trasformazione dell'ammoniaca presente nel sangue (sostanza tossica derivata dalle proteine) in una sostanza tollerabile a concentrazioni più alte, l'urea. L'urea viene poi secreta nel sangue.

13) Produce l'albumina

1.1.4 Cellule staminali del fegato

La capacità rigenerativa del fegato sembra essere dovuta sia dagli epatociti maturi che da cellule staminali residenti nell'organo, le cellule ovali. Sono localizzate all'interno dell'apparato biliare: la nicchia più candidata sono i canali di Hering. La loro proliferazione contribuisce alla rigenerazione delle cellule del dotto biliare ed epatociti. Analisi immunoistochimiche per la determinazione delle molecole di superficie fanno supporre che la popolazione di cellule proliferanti delle cellule ovali in realtà rappresenti un compartimento cellulare estremamente eterogeneo contenente

cellule con capacità differenziativa differente. Alcune di queste cellule possono funzionare come progenitori di epatociti; i markers che esprimono sono quelli tipici di epatociti fetali, delle cellule biliari ed ematopoietici (c-Kit, CD 34, CD 45, Yhy-1, Sca-1, CD 90). Altre cellule, invece, non esprimono alfa-feto proteina e markers epatici.

Recentemente è stata scoperta una nuova popolazione di cellule staminali nel fegato, le HLSC (Human Liver Stem Cells). Sono distinte dalle cellule ovali sia fenotipicamente, che per la loro capacità di auto rinnovarsi e a dare origine a diversi tipi cellulari. Esprimono markers mesenchimali (CD 29, CD 73, CD 44, CD 90), albumina, CK 18, alfa feto proteina, CK 8 (indicazione di un parziale differenziamento nel lineage epatico). Non esprimono markers di cellule staminali ematopoietiche (CD 34, CD 45, CD 117, CD 133) e markers delle cellule ovali (CD 117, CD 34, c-Kit 19). Esprimono vimentina e nestina che sono markers tipici delle cellule staminali. Differenziano in epatociti maturi quando coltivati in presenza di GHF (Hepatocyte Growth Factor) e FGF4 (Fibroblast Growth Factor 4), osteociti e cellule endoteliali, strutture simili alle isole produttrici di insulina.

1.1.5 Capacità rigenerativa del fegato

Benchè gli epatociti del fegato adulto vivono a lungo e non mostrino in condizioni fisiologiche attività proliferativa, mantengono in realtà la capacità di proliferare al verificarsi di un danno locale. La strabiliante capacità rigenerativa del fegato è stata per la prima volta dimostrata da Higgins e Anderson nel 1931 in un modello sperimentale di epatectomia subtotale: alla rimozione chirurgica di 2/3 della massa epatica è avvenuta rigenerazione completa dell'organo entro una settimana dall'intervento. Il termine "rigenerazione" non è in realtà appropriato, visto che la suddivisione in lobi dell'organo resecato non viene ripristinata come invece è noto avvenire. Quello che si osserva, in realtà, è una risposta iperplastica che coinvolge virtualmente ogni epatocita funzionante del fegato rimanente. Il processo di rigenerazione appare come un fenomeno di tipo "compensatorio" visto che la massa finale del fegato che ha rigenerato è in funzione delle necessità dell'organismo ed una volta che la massa originaria è stata ripristinata, la proliferazione degli epatociti

cessa. Divisioni cellulari si osservano raramente nel fegato adulto sano, visto che gli epatociti sono in genere “quiescenti” nella fase G₀ del ciclo cellulare. Tuttavia, in seguito a resezione epatica, approssimativamente il 95% delle cellule epatiche residue rientrano rapidamente in ciclo cellulare; in particolare, in base a quanto osservato nel fegato di ratto, il tasso di sintesi di DNA comincia ad aumentare all’interno degli epatociti entro 12 ore dall’intervento e raggiunge un picco massimo entro 24 ore, mentre l’induzione della sintesi del DNA si verifica più tardivamente nelle cellule non parenchimali (a 48 ore circa per le cellule di Kupffer ed a 96 ore per le cellule endoteliali). E’ evidente che progressivamente, la velocità di sintesi del DNA negli epatociti si riduce, in considerazione del fatto che il completo recupero della massa epatocitaria richiede 1.6 divisioni cellulari per cellula. La rigenerazione del tessuto epatico, appare in effetti come un evento estremamente ben orchestrato, l’aumento della sintesi del DNA si registra inizialmente negli epatociti che circondano i rami della vena porta nello spazio portale e sembra procedere successivamente in direzione della vena centro-lobulare. Il maggiore incremento della massa epatocitaria si verifica entro il 3° giorno dall’epatectomia e il completo recupero si ha entro il 5°-7° giorno.

La proliferazione degli epatociti è altresì coinvolta nella rigenerazione epatica che si verifica in seguito a necrosi epatocitaria massiva, o apoptosi indotta da ischemia, infezioni virali o epato-tossine. Inespugnabilmente, però, la rigenerazione in queste circostanze non sembra essere così sincronizzata come si verifica in seguito ad epatoresezione. Notevoli cambiamenti dell’architettura epatica si osservano comunemente sia dopo epatectomia che in seguito a necrosi ed apoptosi legate a noxae patogene di varia origine, in particolare si osserva l’induzione della sintesi locale di nuove forme di fibronectina, molecole di adesione cellulare e della membrana basale. Cambiamenti nelle giunzioni intra- ed inter-cellulari si verificano transitoriamente durante la rigenerazione ed il ripristino della normale architettura si verifica solo dopo che la massa epatica originaria è stata ripristinata. Ciò nonostante, molto poco si sa dei complessi meccanismi che regolano la riorganizzazione dell’architettura tridimensionale del fegato dopo il danno.

Il singolo epatocita presenta quindi una impressionante potenzialità replicativa visto che sono sufficienti pochissime cellule per ripristinare l’intera massa epatica dopo un danno esteso. La lunghezza dei telomeri è fondamentale per il mantenimento del

potenziale replicativo e per una efficiente sintesi del DNA, questo è dimostrato dal fatto che in modelli murini knock-out per il gene della telomerasi, la sintesi del DNA è notevolmente ridotta ed è ridotta in generale la vita media degli epatociti. Uno dei meccanismi per i quali nel danno cronico (epatiti virali, ad esempio) gli epatociti perderebbero progressivamente la propria capacità proliferativa potrebbe quindi essere rappresentato dalla progressiva perdita di materiale genetico telomerico legata all'eccessivo protrarsi nel tempo dell'evento lesivo.

Gli epatociti non sono invece in grado di proliferare in risposta a determinati tipi di danno. Alcuni agenti come la retrorsina, la dipina e la galattosammina determinano necrosi epatocitaria negli animali da esperimento, ma ciò nonostante la capacità replicativa della maggior parte degli epatociti appare inibita mentre un'altra popolazione di cellule, note come cellule ovali ("oval cells"), prolifera per rimpiazzare il parenchima epatico danneggiato. Queste cellule, la cui origine è estremamente controversa, sono state osservate lungo i canalicoli biliari di minor calibro, noti come "canali di Hering", e sembrerebbero originare da elementi simil-blastoidi localizzati in prossimità dei canalicoli. Il dato interessante è che le cellule ovali esprimono in superficie la molecola CD34 ed altri antigeni i quali sono normalmente espressi sulle cellule staminali di derivazione emopoietica e pertanto è stato ipotizzato che queste cellule siano in realtà richiamate dal midollo emopoietico in presenza di un danno epatocitario quando la proliferazione degli epatociti residenti è inibita.

Numerosi studi condotti sulla ripopolazione epatica e il trapianto cellulare indicano invece che le cellule staminali di derivazione midollare possono dare origine ad epatociti normalmente funzionanti. Quello che rimane ancora da chiarire è se questa trasformazione è un evento possibile ma sostanzialmente raro, oppure se sia in realtà uno dei meccanismi principali attraverso i quali il fegato ripopola il proprio pool di epatociti in presenza di determinati tipi di danno.

Alcuni studi recenti, inoltre, sostengono che oltre al processo di "transdifferenziazione" anche la "fusione cellulare" potrebbe essere uno dei meccanismi attraverso i quali elementi staminali midollari possono dare origine ad epatociti funzionanti.

Citochine e Fattori di Crescita Implicati nella Rigenerazione Epatica.

Le citochine sono proteine di piccole dimensioni che legandosi a recettori cellulari producono segnali intracellulari determinanti l'attivazione dei fattori di trascrizione. Ciò che le distingue dai fattori di crescita è la capacità di attivare meccanismi intracellulari di traduzione del segnale che non necessariamente sono legati alla proliferazione cellulare.

Sia NF-Kb che STAT3 sono fattori di trascrizione attivati da citochine, ed il fatto che la concentrazione intracellulare di questi fattori aumenta rapidamente dopo epatectomia sostiene l'ipotesi che siano le citochine le molecole che normalmente regolano la risposta rigenerativa del fegato.

Gli studi condotti sui topi knock-out sottoposti ad epatectomia parziale hanno dimostrato che la rigenerazione epatica richiede la presenza dell'interleuchina-6 (IL-6). Tuttavia, sembra che l'IL-6 da sola non sia sufficiente per l'induzione ed il mantenimento dell'intero processo, visto che il ripristino della massa epatica si verifica comunque, benché in maniera ritardata, in assenza del gene specifico.

In seguito al legame con il proprio recettore (IL-6R), il quale è associato a due subunità della proteina gp130, l'IL-6 stimola l'attività tirosin-chinasica della proteina Janus-Chinasi-tipo 1 (JAK1). JAK1 fosforila la proteina associata gp130 e il fattore di trascrizione STAT3 a livello di un residuo tirosinico determinandone la dimerizzazione. Successivamente la forma dimerizzata di STAT3 viene traslocata nel nucleo dopo attiva una serie di geni bersaglio. Inoltre, la stimolazione della gp130 porta anche all'attivazione della cascata delle MAP-chinasi (MAPK) la quale rappresenta una delle cascate enzimatiche intracellulari più importanti della proliferazione cellulare.

In seguito ad epatectomia parziale, nei topi knock-out per il gene dell'IL-6 la rigenerazione epatica è deficitaria e caratterizzata da necrosi epatocitaria ed insufficienza epatica, mentre sul piano cellulare si osserva una ridotta sintesi di DNA con un certo numero di anomalie della fase G1 comprese la mancata attivazione di STAT3 ed anomalie nell'espressione di alcuni geni. Utilizzando sempre modelli di topi knock-out, è stato inoltre dimostrato che anche il fattore di necrosi tumorale (TNF α) è altresì importante per una normale risposta proliferativa dopo epatectomia. Questo effetto sembra in larga parte mediato dalla capacità del TNF α di stimolare la produzione di IL-6, visto che il trattamento con la citochina è in

grado di correggere il deficit nella sintesi di DNA che si verifica nei topi knock-out per il recettore del $TNF\alpha$.

Oltre ai meccanismi di traduzione del segnale mediati dalle citochine, numerosi fattori di crescita promuovono la replicazione cellulare durante la rigenerazione epatica. In base a quanto osservato dagli studi in vivo ed in vitro su epatociti isolati, sembra che il fattore di crescita tumorale (Tumor Grow Factor alfa - $TGF\alpha$) ed il fattore di crescita degli epatociti (Hepatocyte Grow Factor – HGF) siano i principali fattori di crescita coinvolti nel processo di rigenerazione del fegato. In vivo, l'HGF è prodotto dalla componente non parenchimale del tessuto epatico, in particolar modo dalle cellule stellate e sembra pertanto agire sugli epatociti tramite un meccanismo di azione paracrina. Il precursore dell'HGF (pro-HGF) viene attivato rapidamente da enzimi ad azione proteasica, quali l'attivatore tissutale del plasminogeno, in seguito ad epatectomia parziale e danno epatico. Il blocco dell'attività proteasica rallenta la produzione di HGF e determina un ritardo nel processo di rigenerazione mentre gli inibitori dei bloccanti le proteasi accelerano il rilascio di HGF e promuovono la rigenerazione epatica. A sostegno dell'attività pro-rigenerativa dell'HGF ci sono inoltre gli esperimenti di danno epatico indotto da tetracloruro di carbonio (CCl_4) in cui la somministrazione in vivo di anticorpi anti-HGF blocca la rigenerazione epatica accorciando notevolmente la sopravvivenza degli animali, mentre, al contrario, la somministrazione di alte dosi di HGF riduce l'entità del danno epatico. Studi in vitro condotti su epatociti isolati hanno documentato che l'azione mitogena dell'HGF è mediata, almeno in parte, dall'over-espressione del $TGF\alpha$ ed, in effetti, è stato dimostrato che anticorpi anti- $TGF\alpha$ riducono la sintesi del DNA nel fegato rigenerante. Ciò nonostante, in considerazione del fatto che un ampio numero di ligandi e recettori appartengono alla famiglia del TGF e dell'EGF (endothelial grow factor), l'impossibilità di bloccare contemporaneamente tutti i ligandi e i recettori ha reso estremamente difficile provare che potenti mitogeni come il $TGF\alpha$ e l'EGF sono effettivamente cruciali per la rigenerazione epatica. Ad esempio, il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (vascular endothelium grow factor- VEGF) interagisce specificamente con le cellule endoteliali dei sinusoidi epatici e determina un incremento della produzione dell'HGF da parte delle cellule non parenchimali. In questo modo la rigenerazione epatica indotta dal VEGF sembra dipendere dalla presenza delle cellule endoteliali ma il meccanismo in realtà è ancora incompreso e

viene bloccato, almeno in parte, dal trattamento con anticorpi anti-HGF. I fattori di crescita e le citochine come l'HGF e l'IL-6 promuovono il mantenimento della rigenerazione epatica e l'epatoprotezione in diversi modelli di danno epatico, quali il modello di danno mediato dal FAS, il danno tossico indotto dalle epatotossine come il CCL4 e dall'ischemia. Questi fattori di crescita rappresentano una importante protezione contro il danno epatico cronico che determina la formazione di fibrosi. La reazione esistente tra l'attività pro-mitogenica ed epatoprotettiva di questi fattori non è ancora completamente compresa ma almeno in parte sembra essere legata alla produzione di proteine anti-apoptotiche che regolano la cascata enzimatica delle caspasi intracellulari.

1.2 IL PANCREAS

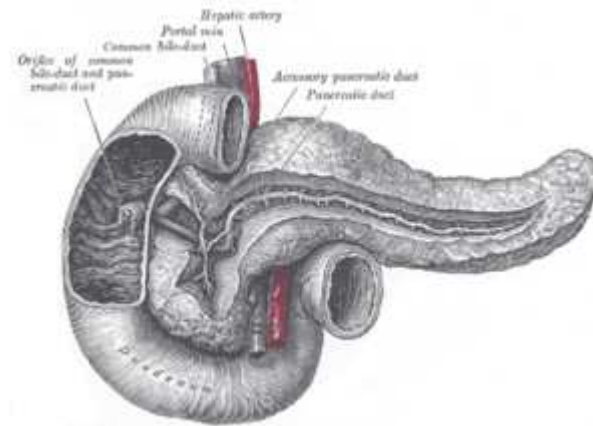


Figura 1.3 Il pancreas

Il **pancreas** è una ghiandola voluminosa annessa all'apparato digerente. Esso è formato da una parte esocrina e una endocrina. La sua principale funzione è quella di produrre *succo pancreatico* (prodotto dalla parte esocrina), *insulina* e *glucagone* (entrambi prodotti dalla parte endocrina). Il succo pancreatico ha la funzione di digerire alcune sostanze nell'intestino tenue, mentre l'insulina ed il glucagone hanno la funzione di controllare la concentrazione di glucosio nel sangue.

1.2.1 Anatomia macroscopica

Il pancreas è una ghiandola annessa all'apparato digerente e misura circa 20 cm di lunghezza, 4 cm in altezza e 2 cm di spessore.

Consta di tre parti:

- una *testa*, di dimensione 6x3x2 cm e presenta un prolungamento detto processo uncinato;
- un *corpo*, separato della testa da una parte ristretta, l'istmo;
- una *coda*, che presenta forma ed estensione piuttosto variabili, potendo presentarsi come allungata e assottigliata o come tozza e ingrossata.

Il pancreas è suddiviso in lobuli da esili segmenti connettivali che prendono origine dalla capsula che avvolge l'organo

1.2.2 Anatomia microscopica

Il pancreas ha una struttura acinosa ed è formato da una componente esocrina e una endocrina.

La *componente esocrina* ha il compito di produrre il succo pancreatico, indispensabile per la digestione. Riversa il suo secreto all'interno del duodeno tramite due dotti escretori: il dotto principale e quello accessorio.

Il succo pancreatico è composto da

- enzimi proteolitici: tripsina e chimo tripsina;
- enzimi glicolitici: amilasi;
- enzimi lipolitici: lipasi;
- nucleasi: ribonucleasi e deossiribonucleasi.

Il succo pancreatico si trova sottoforma di granuli di zimogeno all'interno delle cellule pancreatiche e viene così secreto per esocitosi nel lume dell'acino dai condotti intralobulari. Il secreto poi arriva nei condotti interlobulari che a loro volta sboccano nei due grossi dotti pancreatici: il dotto di Wirsung (principale) e di Santorini (accessorio).

L'azione secernente del pancreas è continua, ma si svolge a livello moderato: aumenta sotto lo stimolo neuroendocrino dell'ormone secretina e della pancreazimina che sono prodotti nel duodeno e che raggiungono il pancreas per via ematica.

La componente esocrina del pancreas è predominante (97-99% del totale) e determina pertanto la morfologia esterna e i principali caratteri organizzativi della ghiandola.

La *componente endocrina* è costituita da circa 2 milioni di "cordoni epiteliali" inframezzati al pancreas esocrino più concentrati nel corpo e nella coda, detti Isole di Langerhans.

Tale componente è formata da quattro tipi cellulari:

- cellule α : producono glucagone
- cellule β : producono insulina
- cellule δ : producono somatostatina
- cellule PP: producono polipeptide pancreatico

Le cellule sierose del pancreas hanno una forma piramidale con la parte allargata rivolta verso la lamina basale e quella assottigliata che prospetta verso il lume. Il nucleo delle cellule si trova in posizione basale, il citoplasma è molto basico con un reticolo endoplasmatico rugoso molto sviluppato e l'apparato del Golgi è posizionato sopra il nucleo. Il citoplasma apicale presenta le goccioline di zimogeno.

Insulina

È un'ormone di natura proteica che facilita il passaggio di glucosio dal sangue alle cellule (azione ipoglicemizzante). Favorisce anche l'accumulo di glucosio sotto forma di glicogeno (glicogeno sintesi) a livello epatico ed inibisce la degradazione di glicogeno a glucosio (glicogenolisi). Facilita il passaggio degli aminoacidi dal sangue alle cellule, ha funzione anabolizzante perché stimola la sintesi proteica e inibisce la neoglucogenesi (formazione di glucosio a partire da alcuni aminoacidi). Facilita il passaggio degli acidi grassi dal sangue alle cellule, stimola la sintesi degli acidi grassi a partire da glucosio aminoacidi in eccesso ed inibisce la lipolisi (utilizzo degli acidi grassi a scopo energetico). Altre funzioni sono: facilita il passaggio di potassio all'interno delle cellule, stimola la proliferazione cellulare, stimola l'uso di glucosio per la produzione di energia, stimola la produzione endogena di colesterolo. L'insulina si forma a partire dalla preproinsulina che possiede una sequenza aminoacidica che funge da segnale per il suo trasporto nel reticolo endoplasmatico e successivamente nell'apparato di Golgi, dove raggiunge la conformazione di proinsulina. L'insulina viene prodotta a partire da quest'ultima tramite taglio proteolitico da parte di una endopeptidasi di un peptide di congiunzione di 33aa, il peptide C. L'insulina viene rilasciata come proteina globulare a catena polipeptidica unica dai poliribosomi; successivamente l'ormone si deposita sotto forma di granuli. All'aumentare della concentrazione, l'insulina viene aggregata in diomeri e trimeri di dimeri o esameri (tenuti insieme da 2 ioni Zn centrali esacoordinati con le tre tirosine dei dimeri e le tre molecole di acqua). Una volta

riversata nel torrente circolatorio l'insulina passa, per diluizione, alla forma dimerica e monomeric, quest'ultima riconosciuta dall'ormone insulinico. E' costituita da 2 catene polipeptidiche, la catena alfa formata da 21aa e la catena beta di 30aa, tenute assieme da ponti di solfuro che si formano tra le cisteine 7 e 20 della catena alfa e le cisteine 7 e 19 della catena beta

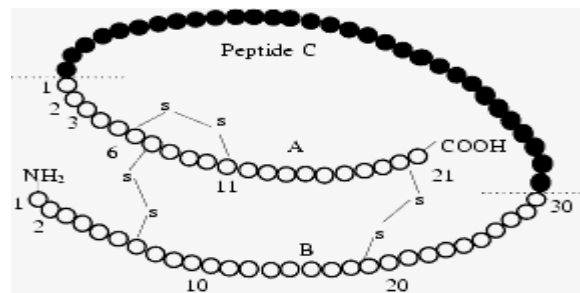


Figura 1.4 Struttura schematizzata dell'insulina

Il recettore per l'insulina è una glicoproteina trans membrana costituita da 4 catene (2 alfa esterne alla cellula e 2 beta interne alla cellula), fra loro unite da ponti di solfuro. Le 2 catene alfa sono ricche in cisteine mentre le beta sono ricche di aminoacidi idrofobici che, le ancorano alla membrana cellulare, e tirosine, rivolte verso il citosol. Quando la glicemia aumenta, si alza la quantità di insulina secreta dalle cellule del pancreas. Nelle cellule insulino-dipendenti il legame insulina-recettore va ad agire su un pool intracellulare di vescicole, liberando il trasportatore del glucosio che viene trasferito alla membrana per fusione. Il trasportatore porta il glucosio all'interno della cellula, causando una diminuzione di glicemia che a sua volta stimola la dissociazione tra l'insulina e il suo recettore. Questa dissociazione innesca un processo simile all'endocitosi con il quale il carrier viene riportato all'interno delle vescicole.

Glucagone

E' un ormone proteico la cui secrezione è molto stimolata da un calo di glicemia. E' un antagonista dell'insulina e con la sua azione promuove la glicogeno lisi a livello

epatico (produzione di glucosio a partire da glicogeno), inibisce la glicogeno sintesi e stimola la gluconeogenesi (produzione di glucosio a partire da alcuni aminoacidi). Non stimola la glicogeno lisi muscolare, sensibile all'azione dell'adrenalina, ma soltanto quella epatica. Favorisce la sintesi surrenalica di catecolamine ed aumenta la forza di contrazione del cuore. Interviene anche nel metabolismo lipidico, stimolando la mobilitazione degli acidi grassi dal tessuto adiposo, favorendo la loro ossidazione ed inibendone la sintesi. Il maggior stimolo per l'azione del glucagone è dato dal digiuno.

Somatostatina

È un ormone proteico prodotto dall'ipotalamo e da alcune cellule dell'apparato digerente, soprattutto a livello delle cellule beta delle Isole di Langerhans. Grazie all'interazione con i suoi 5 recettori questo ormone regola importanti funzioni corporee. La somatostatina esercita infatti un potente effetto inibente sulla secrezione di GH (somatotropina o ormone della crescita) e la prolattina. La somatostatina viene anche prodotta a livello del sistema APUD (Amine precursor uptake and decarboxylation) le cui cellule si trovano a diversi livelli dell'apparato digerente. In queste sedi cambia anche l'azione specifica della somatostatina, anche se viene mantenuta quella generale sull'inibizione di altri ormoni. Oltre al GH la somatostatina tende ad inibire l'attività secretoria di glucagone, insulina, renina, ormoni tiroidei e cortisolo. Le presunte proprietà antitumorali della somatostatina vengono oggi utilizzati anche nella cura di alcuni tipi di cancro. Tali caratteristiche sono soggette da molti anni a studi e ricerche, con conferme e smentite.

1.2.3 Regolazione

La regolazione della secrezione del succo pancreatico si compie con meccanismi nervosi ed ormonali (ormoni gastrointestinali).

Dal pancreas esocrino si distinguono una "secrezione basale" (interdigestiva) ed una "post prandiale" (digestiva). La secrezione pancreatica basale è piuttosto modesta. Il succo pancreatico viene immesso nel duodeno non in modo episodico: al momento della digestione avviene un rilascio massivo e rapido di succo pancreatico.

La mancanza di un serbatoio per il succo pancreatico rende necessaria l'esistenza di altri meccanismi di regolazione, in primo luogo le formazioni sfinteriche della "papilla duodenale", che occludono parzialmente il condotto pancreatico principale: ciò tuttavia non spiega il rilascio massivo nella fase digestiva. La secrezione pancreatico viene resa notevolmente attiva da stimolazioni di natura nervosa ed endocrina (pancreazimina e secretina). Questa stimolazione determina uno svuotamento massivo delle cellule sierose, i granuli di "zimogeno" si fondono tra loro e si ha lo svuotamento massivo in un colpo solo.

1.2.4 **Diabete mellito**

Il diabete comprende un gruppo di disturbi metabolici accumulati dal fatto di presentare una persistente instabilità del livello glicemico del sangue passando da condizioni di iperglicemia (più frequente) a condizioni di ipoglicemia.

E' causato da una ridotta secrezione di insulina o dalla combinazione di ridotta secrezione e resistenza periferica all'azione di questo ormone.

In condizioni normali l'insulina, rilasciata dal pancreas, entra nel circolo sanguigno dove funziona come una "chiave" necessaria per far entrare il glucosio all'interno delle cellule che, a seconda delle richieste metaboliche, lo utilizzeranno o lo depositeranno come riserva. Ciò spiega come mai una carenza o un'alterata azione insulinica si accompagni ad un aumento degli zuccheri presenti in circolo (caratteristica tipica del diabete).

Si distinguono 2 tipi di diabete: il diabete mellito di tipo I e di tipo II.

Diabete mellito di tipo I

Riguarda circa il 10% delle persone con diabete e in genere insorge nell'infanzia o nell'adolescenza. Il pancreas non produce insulina a causa della distruzione delle cellule beta che producono questo ormone: è quindi necessaria che questa venga iniettata ogni giorno per tutta la vita. La velocità della distruzione delle cellule beta è comunque piuttosto variabile per cui l'insorgenza della malattia può avvenire velocemente in alcune persone, solitamente nei bambini e negli adolescenti, e più

lentamente negli adulti (in questi casi si parla di una forma particolare detta LADA: Late Autoimmune Diabetes in Adults). La causa è sconosciuta. Caratteristica è la presenza nel sangue di anticorpi diretti contro antigeni presenti a livello delle cellule che producono insulina (ICA, GAD, IA-2, IA-2 β). Questo danno che il sistema immunitario induce nei confronti delle cellule che producono insulina, potrebbe essere legato a fattori ambientali (dietetici) o a fattori genetici (individuati in una generica predisposizione a reagire contro fenomeni esterni, tra cui virus e batteri). Si potrebbe quindi trasmettere una predisposizione alla malattia attraverso la trasmissione di geni che interessano la risposta immunitaria e che, in corso di una banale risposta del sistema immunitario a comuni agenti infettivi, causano una reazione anche verso le cellule beta del pancreas, con la produzione di anticorpi diretti contro di esse (auto-anticorpi). Questa alterata risposta immunitaria causa una progressiva distruzione delle cellule beta, per prodotta e si scatena così la malattia diabetica. Per questo motivo tale tipo di diabete viene classificato come auto-immune. Tra i possibili agenti scatenanti sono stati proposti i virus della parotite, citomegalovirus... e sono in studio anche agenti non infettivi, come le sostanze del latte.

Diabete mellito di tipo II

È la forma più comune di diabete e rappresenta circa il 90% dei casi di questa malattia. In questo caso le cellule del pancreas sono capaci di produrre insulina, ma le cellule dell'organismo non sono poi più capaci di utilizzarla. In genere la malattia si manifesta dopo i 30-40 anni e numerosi fattori di rischio possono essere la familiarità per il diabete, scarso esercizio fisico, sovrappeso e appartenenza di alcune etnie.

1.3 INGENGERIA DEI TESSUTI

L'enorme progresso delle conoscenze nel campo della biologia cellulare e delle biotecnologie ha consentito, negli ultimi anni, lo sviluppo di tecnologie mirate alla coltivazione ed alla ricostruzione in vitro di tessuti od organi, definendo una nuova branca di scienze biomediche conosciuta con il termine di ingegneria dei tessuti.

Questa tecnologia permette di poter espandere cellule autologhe ex vivo e riutilizzarle nella riparazione di lesioni e rigenerazioni di tessuti mediante coltura in matrici tridimensionali polimeriche biocompatibili. Modulando opportunamente le caratteristiche chimiche, meccaniche e fisiche di tali matrici è possibile utilizzarle per la coltura in vitro di cellule al fine di rigenerare in vitro tipi diversi di tessuti. Queste strutture bioartificiali rappresentano la seconda generazione di sistemi di sostituzione di organi e tessuti. La prima generazione è costituita da organi artificiali tradizionali (protesi valvolari cardiache, pacemakers, protesi d'articolazione, etc...), la cui alternativa clinica è il trapianto di organi umani ottenuti da donatori.

L'ingegneria tissutale rappresenta un'evoluzione di tali interventi terapeutici consentendo la possibilità di associare le potenzialità del trapianto di cellule viventi con la tecnologia degli organi artificiali per la realizzazione di strutture funzionali.

Tale strategia implica lo studio sia delle strutture dei costrutti e delle forze fisiche che su questi agiscono, sia dei fattori chimici e molecolari della crescita e del differenziamento delle cellule e dei tessuti.

Le principali e più diffuse applicazioni dell'ingegneria tissutale sono rappresentate da:

- composti strutturali in grado di sostituire tessuti nell'organismo quali ad esempio gli equivalenti della cute o "pelle artificiale" per il trattamento soprattutto di ulcere e ustioni (Tonello C et. 2003 ; Brun P et al. 2000; Galassi G et al. 2000; Zacchi V, et al. 1998)
- sistemi per la rigenerazione della cartilagine o del tessuto osseo (Brun P, et al 1999; Pavesio A, et al 2003);
- impianti per la modulazione immunitaria e sistemi metabolici quali il pancreas endocrino artificiale o il fegato artificiale (Zavan et al. 2003).

L'ingegneria dei tessuti si basa su due componenti principali: la componente biologica e un supporto tridimensionale.

La componente biologica è composta dalle cellule e dai fattori molecolari, il supporto tridimensionale è composto dai biomateriali.

1.3.1 Biomateriali

Il biomateriale rappresenta il supporto tridimensionale che consente alla cellula una distribuzione tridimensionale e la possibilità di deporre matrice extracellulare. Un biomateriale è dunque una sostanza o una combinazione di sostanze utilizzate per il trattamento, il miglioramento o la sostituzione di un tessuto o organo.

I biomateriali per essere funzionali all'ingegneria tessutale devono possedere tre caratteristiche principali:

1) Tollerabilità: devono essere immunologicamente inerti. In generale qualsiasi materiale estraneo che entri in contatto con tessuti o fluidi genera una specifica reazione.

La tipologia della reazione ed il livello dipende in particolare dall'organismo ricevente e dal suo sistema di difesa. Al fine di minimizzare e ridurre risposte negative il biomateriale ideale deve possedere i seguenti requisiti:

- Proprietà di superfici costanti in condizioni operative al fine di evitare fenomeni di assorbimento;
- conservazione della composizione;
- buona emocompatibilità.

2) Biodegradabilità: requisito essenziale per l'utilizzo di un materiale ed è strettamente correlato con l'applicazione e la localizzazione del supporto biomedicale .

3) Il supporto deve rappresentare una impalcatura provvisoria: dopo l'integrazione il biomateriale deve essere sostituito dal tessuto originario;

4) Contenuto informativo: Il biomateriale deve comunicare e scambiare segnali con le cellule dell'ospite (Lewandowska-Szumiel M, et al. 2000; Gotman I. et al 1997; Caplan AI, et al 1998/ 2000 /2002)

Per la creazione di un biomateriale ci si ispira alla composizione della matrice extracellulare. La matrice extracellulare, mediante le sue varie molecole assicura i

legami e la comunicazione fra cellule. E' composta dalla sostanza fondamentale (gel molto idratato che conferisce alla matrice una resistenza alla compressione), da fibre (resistenza alla trazione) e da acqua (per favorire la rapida diffusione di sostanze).

In base alla loro natura i biomateriali possono essere classificati in:

naturali: collagene e collagene/GAG, materiali da cadavere, materiali animali, reticoli di fibronectina, acido ialuronico, cellulosa, alginati, idrossiapatite;

I biomateriali naturali hanno diversi vantaggi come l'adesione selettiva (collagene e fibronectina) , la biodegradabilità (gelatina e chitina) e hanno proprietà meccaniche simili a quelle dei tessuti naturali (valvole cardiache di animali e vasi sanguigni).

Gli svantaggi dei biomateriali naturali (comuni a quelli sintetici) sono rappresentati dal rischio di infezioni virali, antigenicità, materiale instabile e deterioramento nel tempo.

sintetici: PGA, PLA, PTFE, ceramica, leghe, etc...

Le matrici sintetiche sono reticoli di polimeri sintetici con un'architettura tridimensionale soddisfacente ma una biocompatibilità discutibile; inoltre la maggior parte dei biomateriali sintetici possiede uno scarso contenuto di informazioni e di segnali per le cellule.

semisintetici: acido ialuronico modificato, derivati dell'idrossiapatite, chitosano, acemananno.

Supporti a base di acido ialuronico

Le proprietà biologiche dell' HA quali ad esempio la diffusione ubiquitaria, la sua naturale tendenza a formare in ambiente acquoso matrici altamente idratate e viscosi, svolgere un ruolo biologico in molti processi quali l'idratazione tissutale, l'organizzazione dei proteoglicani, il differenziamento cellulare, la migrazione, la proliferazione e l'adesione cellulare, sia *in vivo* che *in vitro* ne fanno un candidato ideale per lo sviluppo di nuovi materiali che possono avere varie applicazioni cliniche.

Negli ultimi anni infatti l' HA è stato impiegato per ridurre l'incidenza delle aderenze post-operatorie, come agente visco-elastico nella chirurgia oculare, nel trattamento dell'osteoartrite, nella riparazione tissutale, e per uso cosmetico (Benedetti et al., 1994).

Comunque, numerosi altri potenziali impieghi dell'HA sono in realtà preclusi a causa della sua stessa natura fisica: essendo un gel acquoso, viene rapidamente degradato poco dopo l'applicazione e non si presta ad essere lavorato per ottenere manufatti con strutture tridimensionali stabili.

Di recente nei laboratori FAB (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italia), l' HA è stato utilizzato per la preparazione di polimeri semisintetici, insolubili in acqua, mediante esterificazione dei gruppi carbossilici dell'acido glucuronico con alcoli alifatici o aromatici (Capoccia et al., 1998). Il processo viene effettuato con l'aggiunta graduale dell'agente esterificante al sale d'ammonio quaternario dell'HA e i polimeri che si ottengono prendono il nome di HYAFF. Uno degli agenti esterificanti maggiormente utilizzati è l'alcol benzilico e il biopolimero che ne deriva viene chiamato HYAFF 11[®] (Fig. 1.5).

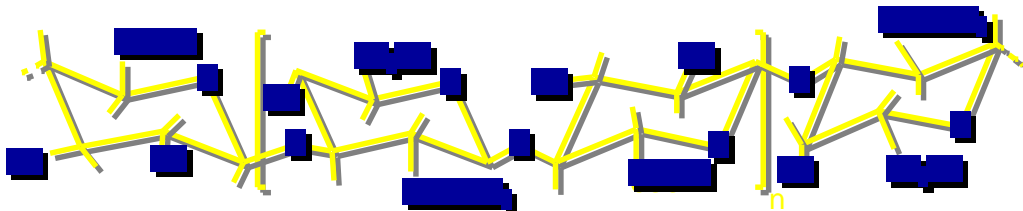


Figura 1.5 Molecola di HYAFF11[®]

E' importante osservare che l'esterificazione può essere controllata abbastanza accuratamente; la reazione, infatti, è stechiometrica ed il grado di esterificazione raggiunto è determinato soltanto dalla quantità di agente esterificante, in modo da ottenere derivati a diverso grado di esterificazione dei gruppi carbossilici, da 0 a 100%. Questi polimeri semisintetici, denominati HYAFF[®], presentano una buona stabilità ed una notevole capacità di interagire con molecole polari.

I biopolimeri HYAFF[®] sono biodegradabili e seguono una via metabolica ben conosciuta e caratterizzata: idrolisi del legame estereo, con liberazione di acido ialuronico ed alcol benzilico, e metabolismo dell'acido ialuronico, mediato principalmente dalle ialuronidasi, che rompono la molecola in frammenti a peso

molecolare minore. Gli oligosaccaridi derivanti dal metabolismo dell'acido ialuronico vengono poi eliminati per via biliare. L'acido ialuronico proveniente dalla de-esterificazione dello HYAFF[®], non essendo distinguibile dall'acido ialuronico di origine naturale, segue quindi il normale metabolismo dell'acido ialuronico endogeno.

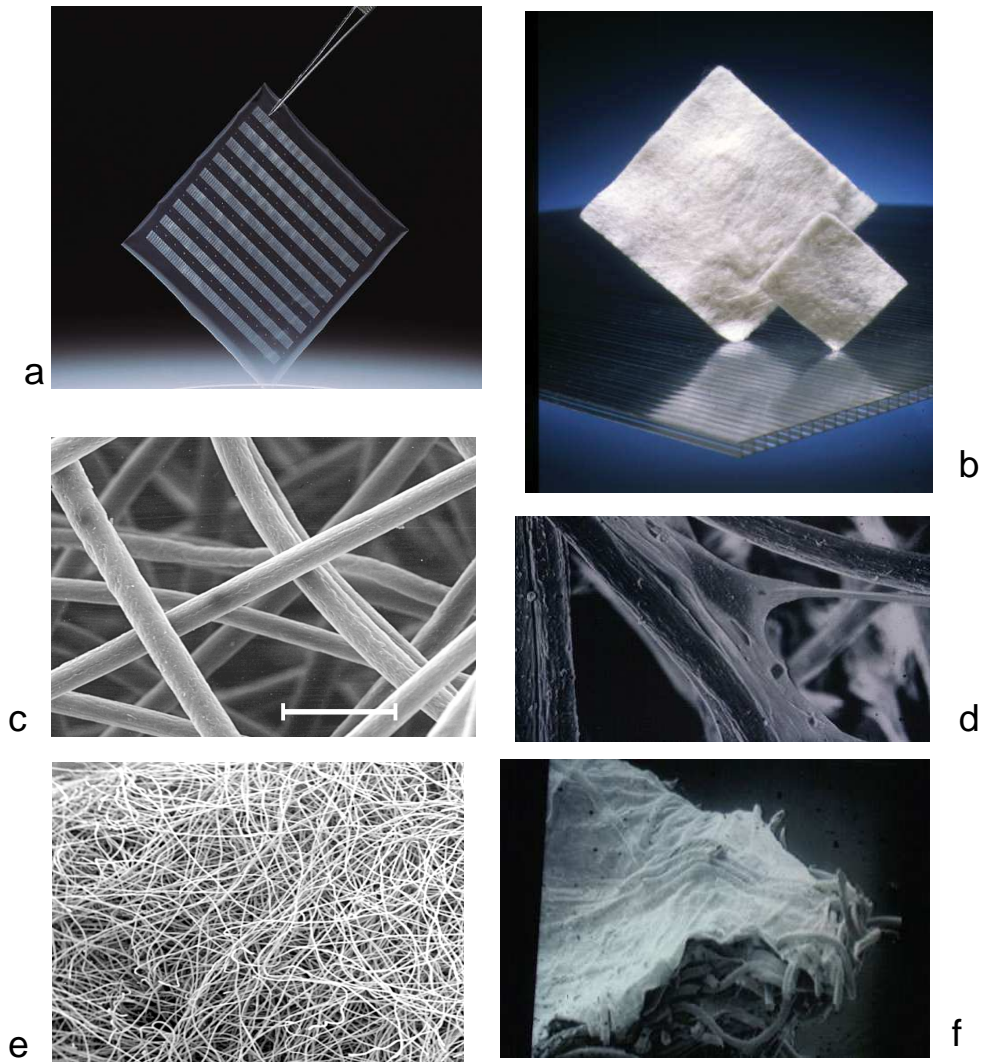


Figura 1.6 Biomateriali a base di HYAFF 11[®] utilizzati nell'ingegneria dei tessuti: a) Laserskin, b) Non woven (NW), c) Fibre di NW (SEM, 1300X), d) Fibre di NW con cellula (fibroblasto) (SEM, 1300X), e) Fibre di NW (SEM, 500X), f) Fibre di NW con strato di cellule sulla superficie (SEM, 800X).

Studi di biocompatibilità

Gli studi di biocompatibilità hanno avuto una particolare rilevanza nello sviluppo dello HYAFF[®], essendo un biomateriale destinato ad essere utilizzato per la produzione di medicazioni e di biomateriali per l'ingegneria tissutale. A questo scopo, sono stati effettuati studi di biodegradazione in vitro ed in vivo, per confermare che i metaboliti provenienti dallo HYAFF[®] sono assolutamente biocompatibili. La via metabolica attraverso cui avviene la degradazione dello HYAFF[®] è stata studiata sia in vitro che in vivo. In questi studi è stato dimostrato [Benetdeti et al 1993] che la degradazione avviene attraverso un meccanismo in due tempi, con la seguente sequenza di eventi:

- liberazione di alcol benzilico
- liberazione di acido ialuronico solubile

Queste due molecole, una volta liberate nel tessuto, vanno incontro a due distinte vie di degradazione.

L'alcol benzilico viene ossidato nel fegato ad acido benzoico e poi coniugato con glicina per produrre acido ippurico, che viene escreto nelle urine.

L'acido ialuronico viene dapprima degradato localmente dalle ialuronidasi, enzimi specifici per la degradazione dell'acido ialuronico, o per produzione di radicali. Questa prima degradazione riduce la lunghezza della catena dell'acido ialuronico. Le catene più corte e gli oligomeri dell'acido ialuronico entrano nel circolo ematico e vengono degradati a livello epatico in acqua ed anidride carbonica

La biodegradazione dello HYAFF[®] in vivo, dopo impianto sottocutaneo, intraperitoneale e dorso-lombare, è stata dimostrata in un modello animale (Abatangelo et al., 1997). Determinazioni quantitative dell'acido ialuronico e dell'alcol benzilico [(Benedetti et al.,1993).] hanno dimostrato che, dopo cinque giorni, più del 90% dell'acido ialuronico era ancora presente, mentre la quantità di alcol benzilico era inferiore al 30%. Questi risultati indicano che il primo step del processo di degradazione di HYAFF[®] è il rilascio di alcol benzilico. (Milella E, et al 2002; Borzacchiello A, et al. 2001)

Resistenza alla ialuronidasi

Una delle limitazioni all'impiego dell'acido ialuronico naturale è costituita dalla sua scarsa stabilità: esso è infatti molto sensibile all'azione di un enzima, la ialuronidasi, che è abbondantemente presente nell'essudato delle ferite e che lo degrada rapidamente, inattivandone la funzione. La reazione di esterificazione dello HYAFF[®] protegge la molecola dall'attacco delle ialuronidasi, che possono entrare in azione solo dopo la reazione idrolitica, che libera acido ialuronico ed alcol benzilico. I derivati esterificati mantengono le stesse proprietà biologiche dell' HA ma, rispetto a questo, presentano un tempo di permanenza prolungato dopo l'applicazione *in vivo* (Rastrelli et al.,1990) e possono venire, inoltre, processati mediante varie tecniche di tessitura producendo diversi tipi di manufatti quali garze, spugne, microsfere, granuli, membrane, feltri di non-tessuto (NW) (FIG.1. 6c), con caratteristiche differenti, idonee ad una vasta gamma di applicazioni biomediche.

1.3.2 **Componente Biologica**

L'ingegneria dei tessuti si basa su due presupposti:

- La quasi totalità delle cellule animali possono essere coltivate in laboratorio.
- In opportune condizioni le cellule si moltiplicano ed aumentano di numero. Attraverso la disgregazione enzimatica è possibile isolare le cellule da un tessuto e le si fa proliferare in coltura ottenendo nuove cellule.

Le cellule utilizzate per l'ingegneria dei tessuti sono rappresentate da:

- cellule differenziate,
- cellule staminali embrionali;
- cellule staminali adulte.

Negli ultimi anni, un nuovo interessante campo dell'ingegneria tissutale si è aperto dopo l'osservazione che cellule pluripotenti, come le cellule staminali mesenchimali, sono in grado di differenziarsi *in vitro* in numerose tipologie cellulari quali ad esempio condrociti, osteoblasti, adipociti e fibroblasti (Pittenger et al.,1999). Durante

lo sviluppo embrionale, dalla moltiplicazione di una cellula totipotente iniziale si genera un gruppetto di cellule che contiene numerose cellule ancora totipotenti chiamate cellule embrionali staminali (cellule ES) preposte alla formazione di cellule mature dell'organismo. Col procedere dello sviluppo embrionale le ES generano cellule progressivamente sempre più differenziate tra cui le cellule staminali tessuto specifiche o somatiche il cui compito è produrre le cellule mature del tessuto in cui risiedono (Muraglia et al., 2000). Il numero di staminali somatiche declina progressivamente con lo sviluppo dell'organismo e raggiunge valori minimi e stabili in età adulta. A questo stadio, tali cellule assumono la funzione di mantenere l'integrità strutturale e funzionale dei tessuti mediante la sostituzione delle cellule mature danneggiate.

La capacità rigenerativa di tessuti adulti dipende quindi dall'esistenza, al loro interno, di cellule staminali somatiche che per tutta la vita conservano caratteristiche funzionali molto diverse da quelle della loro progenie matura. Quest'ultima è invece specializzata nelle funzioni specifiche del tessuto di appartenenza.

Il primo carattere distintivo delle cellule staminali somatiche è il loro stato altamente indifferenziato.

In generale infatti, queste cellule staminali non possiedono le caratteristiche morfologiche, strutturali, molecolari o antigeniche che si ritrovano nelle cellule differenziate del loro tessuto di appartenenza.

In secondo luogo, una cellula o una popolazione cellulare può essere definita staminale solo se possiede la così detta capacità di automantenimento o autorinnovamento, ossia se è in grado di perpetuare se stessa indefinitamente, o, almeno, per tutta la durata dell'organismo di appartenenza (Caplan, 1991). È importante notare che questo modello di autorinnovamento garantisce la conservazione di un numero stabile di cellule staminali e la concomitante produzione di un elevato numero di cellule differenziate nel tessuto di residenza. Il numero di cellule staminali non potrà mai aumentare a prescindere dal numero di cicli effettuati da ciascuna cellula staminale. Le cellule staminali dei vertebrati, compiono divisioni simmetriche in cui le due cellule figlie sono identiche (divisione espansiva) o, in alternativa, diverse dalla cellula madre staminale (divisione differenziativa). L'automantenimento è, perciò, garantito dall'equilibrio numerico tra i due tipi di divisione simmetrica all'interno della popolazione (Vescovi et al., 1999).

Il processo differenziativo avviene a diversi livelli molecolari e cellulari permettendo la formazione di tessuti altamente specializzati. Tali tessuti sono costituiti da diverse tipologie cellulari, necessarie per lo svolgimento dell'attività funzionale e che, grazie alla distribuzione nei diversi strati gli conferiscono un proprio spessore e una propria funzionalità.

1.4 *CELLULE MESENCHIMALI STAMINALI (MSC)*

Il midollo osseo, in aggiunta alle cellule staminali emopoietiche (HSCs) in grado di generare progenitori orientati verso la maturazione terminale (globuli bianchi, rossi, piastrine), contiene anche cellule staminali non-emopoietiche di tipo mesenchimale, presenti a una bassa frequenza. Le "cellule staminali mesenchimali" (MSCs), hanno la capacità di auto-mantenimento e differenziare in cellule di tessuti mesodermici (transdifferenziamento) quali adipociti, osteociti, condrociti, cardiociti, miociti. Grazie alla overespressione di specifici fattori lineage dipendenti possono anche differenziare in cellule che non hanno origine mesodermica (cross-differenziamento): neuroni, cellule pancreatiche, cellule endoteliali, epatociti e cardiomiociti. Essendo quindi capaci di differenziare in diversi tipi cellulari possono essere utilizzate per il trattamento di danni tissutali e di problemi degenerativi. Sono anche denominate "cellule stromali midollari", data la loro capacità di generare le cellule stromali del microambiente midollare.

Le MSCs sono state identificate nella regione perivascolare del midollo osseo; risiedono anche nella parete di piccoli e grandi vasi sanguigni e in diversi tessuti ed organi (cervello, milza, fegato, reni, polmoni, cordone ombelicale, denti, membrana sinoviale...).

Tali cellule sono capaci di migrare attraverso la circolazione.

Le MSCs possono anche essere isolate dal tessuto adiposo: è una fonte alternativa e più vantaggiosa al midollo osseo in quanto tali cellule possono essere ottenute in maggiori quantità sotto anestesia locale e senza molta sofferenza per il paziente. Anche in questo caso possono differenziare sia in senso mesodermico che non.

In generale le tre caratteristiche che rappresentano le MSCs sono:

- 1) aderenza alla plastica: possono essere quindi facilmente distinguibili dalle altre cellule come ad esempio i monociti
- 2) hanno una forma fibroblastoide
- 3) differenziano in diversi tipi cellulari

Le MSCs sia dal midollo osseo che da tessuto adiposo hanno le stesse potenzialità ed esprimono markers e geni simili o non (tabella 1).

MARKERS MIDOLLO OSSEO	MARKERS TESSUTO ADIPOSO
CD9	CD9
CD10	CD10
CD13	CD13
CD29	CD29
CD44	CD44
CD49e	CD49d
CD54	CD54
CD55	CD55
CD59	CD59
CD73 (SH3)	CD73 (SH3)
CD90	CD90
CD105 (SH2)	CD105 (SH2)
CD106	CD106
CD117	CD117
CD146	CD146
CD166	CD166

Tabella 1. 1

I geni che esprimono sono: fibronectina, endomucina, ASMA, vimentina, aldeide deidrogenasi, ABCG-2, ZNF145, FASD1, INHBB, GOS2, FOX1A, PDK4, LEP.

Esprimono poco CD14, CD34, CD45, CD133, CD144.

Recentemente sono stati trovati nuovi markers: CD271 (nerve growth factor receptor), ganglioside molecule GD2 (molecola neurale).

1.4.1 Caratteristiche colturali

Il terreno necessario per la loro coltura è α -MEM o DMEM con 10 o 20% di FBS, 2 mM di L-glutamina, 100 U/ml Penicillina, 100 μ g/ml di Anfotericina B.

Dopo 3-4 giorni dalla coltura assumono una forma fibroblastoide e formano piccole colonie. Man mano che le cellule proliferano, la dimensione delle colonie aumenta e diventano più distinguibili dopo 7 giorni. Una singola colonia si sviluppa da una singola MSC. In coltura tali cellule sono molto eterogenee funzionalmente e fenotipicamente, le dimensioni delle colonie sono varie e c'è una variabilità nella velocità di crescita. Se alcune colture si possono sviluppare per più di 20 giorni, si nota una eterogeneità fenotipica.

Alcune colonie sono positive per la fosfatasi alcalina (ALP), mentre altre sono negative e altre ancora sono positive al centro della colonia e negative alla periferia.

Già nella coltura primaria cominciano, oltre alle MSC, ad aderire i monociti. Di solito le colture di MSC dopo 7-14 giorni hanno bisogno di tripsina. Dopo i primi 5 minuti di tripsinizzazione i monociti, al contrario delle mesenchimali, non si staccano dalla piastra e quindi i due tipi cellulari si possono separare.

Tra il 1° e 2° passaggio in coltura le cellule esprimono tutti gli stessi markers (SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD106, CD120a ,CD124...) e si possono osservare 3 fenotipi: cellule allungate simili a fibroblasti, cellule larghe e piatte e cellule strette.

Sotto condizioni ottimali le MSC possono raggiungere fino a 25 passaggi in vitro (per alcuni fino 50), dimostrando un'alta capacità di autorinnovarsi mantenendo la staminalità dopo di che vanno incontro a senescenza e apoptosi.

La cinetica di crescita è altissima nella coltura primaria per calare durante i successivi passaggi: si ferma dopo 22 passaggi.

Non differenziano spontaneamente in coltura anche se alcune colonie formano noduli (inizializzazione della mineralizzazione della matrice) che possono essere identificate con colorazione alizarin red o von Kossa per il calcio; altre accumulano grasso e occasionalmente alcune colonie formano cartilaginee . Mantengono un normale cariotipo e una normale attività telomerasica anche fino al 12° passaggio.

Non si conosce lo specifico ambiente che permette la proliferazione e il differenziamento in vivo.

In vitro si può indurre il loro differenziamento in condrociti, osteociti e adipociti utilizzando specifici terreni composti da:

1. Terreno differenziamento condrogenico: $2 \times 10^{-4} \text{M}$ di acido ascorbico, 1ng/ml TGFbeta1.
2. Terreno differenziativo osteogenico: $2 \times 10^{-4} \text{M}$ di acido ascorbico, $7 \times 10^{-3} \text{M}$ beta- glicerolfosfato, $1 \times 10^{-8} \text{M}$ dexametasone .
3. Terreno differenziativo adipogenico: 1%FCS, $1 \times 10^{-7} \text{M}$ dexametasone, $1 \times 10^{-9} \text{M}$ insulina.

Il differenziamento adipogenico cala dopo 22 passaggi, il condrogenico e osteogenico nei passaggi successivi.

Non sono ancora conosciuti tutti i fattori mito genici; fin'ora i necessari .noti sono: PDGF (plateled-derived growth factor), EGF, bFGF, TGFbeta e IGF-1.

1.4.2 Applicazioni

Negli ultimi anni, le conoscenze relative all'identificazione e alla caratterizzazione delle MSCs umane sono significativamente aumentate. Parallelamente, sono stati sviluppati vari modelli di laboratorio per l'espansione ex-vivo delle MSCs ed è pertanto possibile studiare gli effetti delle MSCs in varie modalità di trapianto. Numerosi studi preclinici e alcuni studi clinici sono attualmente in corso ed è prevedibile che nel volgere di alcuni anni verranno definitivamente chiarite la fattibilità e l'efficacia terapeutica del trapianto di MSCs e l'impatto di questo peculiare tipo cellulare sia nell'ambito del trapianto di midollo sia nella medicina rigenerativa.

Come su detto le MSCs possono essere isolate a partire da aspirati midollari o da tessuto adiposo dal momento che sono cellule in grado di aderire alla plastica delle fiasche di coltura e quindi possono essere facilmente espanse a tempi successivi, generando monostrati di cellule aderenti. Le MSCs del midollo così isolate hanno capacità differenziativa multilineare essendo, infatti, capaci di generare - quando

vengono create appropriate condizioni di coltura - progenitori di tipo osteoblastico, condrocitario, adipocitario, miocitario, endoteliale...

Date le suddette proprietà "trans-differenziative", le MSCs sono oggetto di fervido studio da parte dei ricercatori in particolare nell'ambito della terapia o medicina rigenerativa, come ad esempio per la ricostruzione di tessuto cartilagineo ed osseo dopo traumatismi o per malattie congenite.

Le cellule stromali del microambiente midollare e i loro prodotti biosintetici (fattori di crescita e citochine) rivestono un ruolo fondamentale nella regolazione e nel mantenimento delle funzioni del midollo osseo e della differenziazione delle cellule staminali emopoietiche.

L'importante ruolo delle cellule mesenchimali nella regolazione del sistema emopoietico è dimostrato da molteplici evidenze in modelli animali sperimentali. Complessivamente, i dati disponibili da molti modelli sperimentali supportano il concetto che il co-trapianto di cellule stromali può migliorare l'attecchimento delle cellule staminali emopoietiche in molteplici tipi di trapianto.

Più recentemente è stato dimostrato, sia in esperimenti di laboratorio sia in modelli animali sperimentali, che le cellule stromali midollari sono implicate anche nella regolazione e nello sviluppo dei linfociti T e B, le cellule del sistema immunitario maggiormente responsabili dei meccanismi di rigetto del trapianto, della malattia del trapianto verso l'ospite (GVHD) e dell'attività anti-leucemica. L'insieme di queste evidenze suggeriscono un ruolo immunomodulante delle MSCs, che si traduce in una potente attività tollerizzante e immunosoppressiva e nella capacità di rigenerare più velocemente le aree del microambiente midollare sedi di sviluppo della mielo-linfocitopoiesi (emopoiesi).

Pertanto, nel contesto del trapianto allogenico, le MSCs midollari coltivate ed espanse ex vivo potrebbero:

- accelerare l'attecchimento emopoietico,
- ridurre l'incidenza e la severità della GVHD acuta,
- migliorare la ricostituzione immunologica.

Tali proprietà troverebbero un'applicazione ideale proprio nel trapianto di midollo allogenico da donatore non consanguineo in cui l'attecchimento del midollo del donatore (e quindi del sistema emopoietico), l'incidenza della malattia da trapianto

contro l'ospite (GVHD) e le complicazioni legate al prolungato deficit del sistema immunitario rappresentano le problematiche di maggior rilievo e sono tra i principali temi di studio e dibattito del panorama scientifico trapiantologico.

La possibilità di accelerare i tempi di attecchimento del midollo del donatore, di limitare l'incidenza di GVHD e migliorare la ricostituzione immunologica, porterebbe a un'ulteriore significativa riduzione della mortalità peri-trapiantologica dopo trapianto di midollo allogenico da donatore non-consanguineo. La possibilità di isolare progenitori mesenchimali e di espanderli ex vivo in condizioni di coltura definite costituisce un prerequisito per l'applicazione clinica delle MSCs nel trapianto allogenico. Allo stato attuale la generazione a scopo clinico di cellule mesenchimali deve necessariamente basarsi sull'espansione ex vivo della frazione di cellule midollari aderenti alla plastica.

Sebbene le MSCs debbano ancora essere meglio caratterizzate e fattori importanti (condizioni di coltura, la senescenza dopo il differenziamento...) debbano ancora essere migliorati, alcune altre possibili applicazioni in base alle loro capacità differenziative sono qui sotto riassunte:

- differenziamento adipogenico: trapianto del tessuto adiposo dopo trauma o tumore; ricostruzione del tessuto adiposo del seno;
- differenziamento osteogenico: cura dell'Osteogenesi Imperfecta; rigenerazione scheletrica in seguito a difetto, trauma o tumore;
- differenziamento condrogenico: riparo della cartilagine; ricostruzione plastica di difetti dell'orecchio e naso;
- differenziamento cardiomiogenico: angiogenesi, con ripresa della funzione cardiaca dopo infarto del miocardio; rigenerazione muscolare del cuore;
- differenziamento miogenico: ricostruzione del tessuto dopo trauma, cura della distrofia muscolare;
- differenziamento vascolare/endoteliale: neovascolarizzazione; terapia rigenerativa per il trattamento di disordini ischemici (in quanto le MSCs sono anche capaci di liberare fattori angiogenetici quali CK, HGF, VEGF, PGF, FGF2, TGF β);
- differenziamento neuronale: recupero di difetti delle funzioni del cervello, cura delle alterazioni dei nervi periferici;
- differenziamento pancreatico: cura del diabete;

- differenziamento epatico: rigenerazione del fegato, cura di alterazioni croniche epatiche, trapianto di epatociti.

1.5 *ARRAY-CGH*

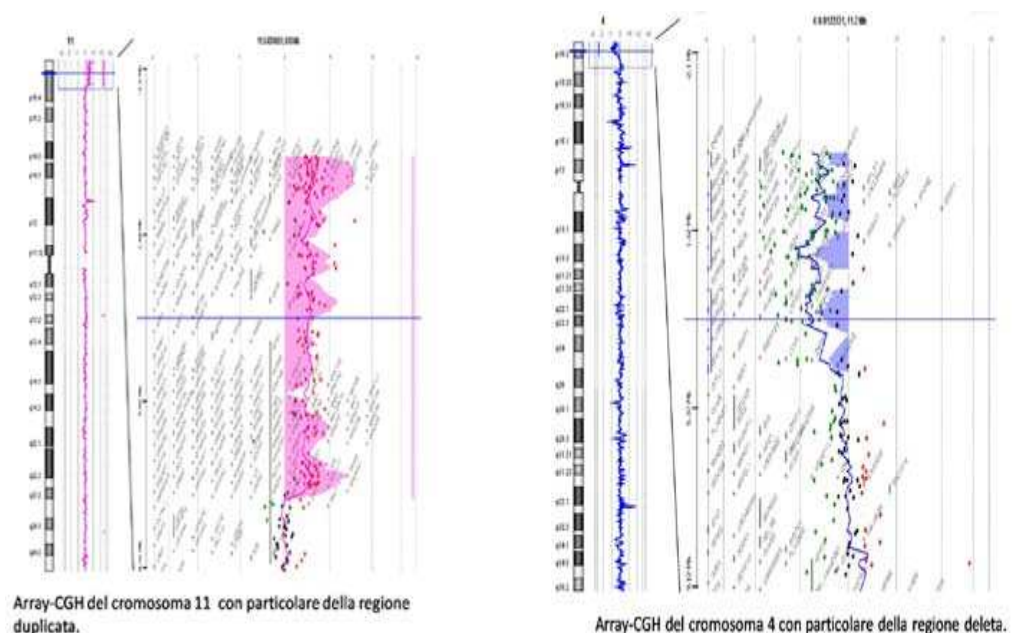
Anomalie genetiche dovute alla variazione del numero di copie di sequenze di DNA sono eventi comuni nei tumori solidi e nei disordini costituzionali. La tecnica che tradizionalmente si usa per la rilevazione di tali anomalie è l'indagine citogenetica che, tramite lo studio della morfologia e della struttura dei cromosomi, consente il riconoscimento delle principali alterazioni del cariotipo (numeriche e strutturali). Le tecniche tradizionali per lo studio del cariotipo hanno però un limite di risoluzione abbastanza elevato (circa 10Mb), in relazione al bandeggio cromosomico e al limite risolutivo del microscopio ottico. Le tecniche di ibridazione in situ fluorescente (FISH) sono più sensibili, e permettono il riconoscimento di piccole delezioni o duplicazioni, ma necessitano di sonde specifiche per determinare regioni e vengono normalmente applicate in maniera specifica di volta in volta, limitatamente a particolari loci. Una nuova tecnica molto sensibile, per identificare nel genoma eventuali sbilanciamenti cromosomici criptici (delezioni e/o duplicazioni) responsabili di patologie, è l'Array-CGH. Permette di rilevare eventuali variazioni del numero di copie di geni distribuiti lungo tutto il genoma, con una risoluzione media di circa 100 Kb, e il suo utilizzo sta rilevando che i riarrangiamenti genomici criptici sono molto più frequenti e diffusi di quanto fino ad ora sospettato. L'applicazione dell'Array-CGH può essere utile per approfondimenti diagnostici in soggetti con sospetto clinico di anomalia cromosomica, in soggetti con ritardo mentale, in particolare se associato a dimorfismi, in caso di sospetto per sindrome autosomica recessiva o sporadica o per sindrome autosomica dominante de novo. L'utilizzo di questa metodica ha permesso infatti ad evidenziare in molti casi

precedentemente irrisolti la presenza di uno sbilanciamento cromosomico criptico responsabile del fenotipo clinico. Sulla base dei risultati fin'ora riportati è presumibile che almeno il 15-20% dei soggetti con ritardo mentale, dimorfismi e anomalie congenite sia portatore di delezioni e/o amplificazioni criptiche identificabili mediante Array-CGH. In campo oncologico permette una rapida caratterizzazione degli sbilanciamenti cromosomici associati ai diversi tipi di tumori

e può essere facilmente applicato sia per lo studio dei tumori ematologici che di quelli solidi. La caratterizzazione di uno sbilanciamento cromosomico mediante Array-CGH permette quindi di definire con precisione le dimensioni e i punti di inizio e di fine delle regioni coinvolte nel riarrangiamento, favorendo l'identificazione dei geni responsabili della patologia in oggetto. I campi di applicazione riguardano la neuropsichiatria (ritardo mentale, autismo, epilessia e malformazione della corteccia cerebrale), pediatria (ritardo mentale, dimorfismi e/o anomalie congenite, alterazioni dello sviluppo pre/postnatale, fenotipo cromosomico, patologie metaboliche associate a dimorfismi), ostetricia (sospetto sbilanciamento cromosomico del cariotipo fetale come traslocazioni de novo, markers e anomalie strutturali sbilanciate), oncologia (tumori della linea ematopoietica e/o tessuti solidi). I tessuti indagati sono i villi coriali, liquido amniotico e sangue fetale per quanto riguarda la diagnosi prenatale; mentre per la diagnosi postnatale si indagano sangue periferico, biopsia cutanea, midollo e tumori solidi, colture cellulari e ogni altro tessuto da cui sia possibile estrarre DNA.

Un esempio del tipo di risultati che si possono ottenere è dato dalla figura 1.7.

Figura 1.7
Risultati di un
Array CGH



2 SCOPO DELLA TESI

La prima parte del dottorato ha avuto lo scopo di valutare quali fossero le migliori condizioni di coltura che permettessero il differenziamento in vitro di cellule staminali di origine epatica, le Human Liver Stem Cells (HLSC), utilizzando ovviamente tecniche di ingegneria dei tessuti. Sono state effettuate delle colture di tali cellule in condizioni dinamiche utilizzando un bioreattore, delle co-culture con cellule stellate epatiche (ITO) e diverse combinazioni di medium. Sono state effettuate analisi morfologiche, di proliferazione cellulare e di espressione genica per valutare lo stato del differenziamento.

Inoltre, alla luce dei risultati ottenuti, sono state allestite delle co-culture in spugne di acido ialuronico di Cellule Staminali Mesenchimali (MSC) con cellule Beta del pancreas per comprendere in vitro la crescita e la funzionalità delle cellule Beta derivanti dalle MSC. Lo scopo è, anche in questo caso, studiare il differenziamento in vitro di cellule staminali in cellule del pancreas. Tali prove sono ancora in corso.

3. MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALI

3.1.2 Biomateriali

Come biomateriale per gli esperimenti sul fegato sono state utilizzate delle spugne di collagene (Avitene® Ultrafoam™ Collagen Hemostat, Davol Inc., Cranston, RI, USA) di 5 mm di diametro e 3 mm di spessore.

E' stato invece utilizzato HYAFF 11® (estere benzilico al 100% dell'acido ialuronico-HA) sia in forma di tessuto non-tessuto (NWC e NWD) che sottoforma di spugna (14 mm di diametro, 3.5 mm di spessore, peso specifico di 0.05-0.09 g/cm², porosità >96%) per quanto riguarda il pancreas. Quest'ultimo biomateriale è stato sintetizzato da 80-200 kDa di sodio ialuronato ed è stato gentilmente fornito dalla Fidia Advanced Biopolimers (FAB) di Abano Terme (PD).

3.2. ISOLAMENTO E COLTURE CELLULARI

3.2.1 Isolamento e coltura di HLSC di ratto

HLSC di ratto sono state ottenute coltivando epatociti crioconservati della ditta Lonza Group, Ltd, Basel, Switzerland. L'isolamento, la purificazione e la caratterizzazione di tali cellule sono state effettuate seguendo il protocollo di Herrera et al.

Le cellule sono state poste in bagnetto a 37.1 °C con una leggera agitazione e poi coltivate in fiasche per l'espansione cellulare. Inizialmente si è utilizzato il terreno Williams Medium E (Invitrogen) supplementato con glutammina e 5% di FCS (fetal calf serum,; Euroclone, Wetherby, U.K). Dopo 2 settimane di coltura è stato effettuato un cambio di terreno con un medium per la coltura di epatociti (HCm): α -minimum essential medium / endothelial cell basal medium-1 (α -MEM/EBM) (3:1) (Gibco/ Cambrex) complementato con 5mM di L-glutammina, 12mM HEPES a pH 7.4, 5 IU/ml di penicillina, 50 μ g/ml di streptomina, 1 μ M dexametasone, 0.014

mg/ml glucagone, 0.16 U/ml insulina (tutto di Sigma, St. Louis, USA), 10% FCS (Invitrogen) e 10% HS (horse serum; Invitrogen).

Le colture sono state così mantenute per 3 settimane cambiando il terreno 2 volte alla settimana.

La vitalità cellulare è stata determinata mediante la colorazione con Trypan blue (98%).

La caratterizzazione della HLSC nelle colture cellulari è stata valutata come descritto dal protocollo di Herrera et al. mediante immunofluorescenza utilizzando chambre slides (Nalge Nunc International, Rochester, NY): la loro purezza è stata confermata valutando l'assenza di CD34, c-kit, CK19 e markers di cellule non parenchimali del fegato (α -SMA).

I saggi sono stati effettuati random in triplicato per ogni vial di cellule fornita.

3.2.2 Isolamento delle cellule ITO

Le cellule ITO sono state ottenute mediante 2 steps di perfusione con collagenasi di tipo V di una biopsia di fegato umano come descritto da YH Paik e Coll. Le cellule sono state sospese a una concentrazione di 1×10^5 cellule/ml nel terreno Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplementato con 20% FCS, 50 IU/ml di penicillina, 50 μ g/ml di streptomina (Sigma, St. Louis, MO, USA) e coltivate in well plates condizionate con 10 μ g/ml di collagene di tipo I. Le cellule sono state espanse utilizzando il suddetto terreno.

3.2.3 Isolamento delle cellule Mesenchimali Staminali Umane (hMSC)

Le cellule mesenchimali staminali sono state isolate da midollo osseo umano prelevato dalla cresta iliaca (2-5 ml di aspirato) e posto in una provetta sterile contenente una soluzione anticoagulante standard a base di citrato di sodio. Le cellule sono state lavate tre volte con PBS tramite centrifugazione a 1200 rpm per 5 minuti, seminate in pozzetti in terreno DMEM al 10% di FCS e poste in incubatore a 37°C e 5% di CO₂. Dopo 72 ore dalla semina è stato effettuato il primo cambio di

terreno per eliminare le cellule in sospensione che non hanno aderito alla superficie della piastra.

Per la successiva fase di espansione, il terreno di coltura è stato cambiato due volte alla settimana e le cellule, una volta giunte a confluenza, sono state staccate, caratterizzate e seminate su biomateriali.

Le MSC sono state isolate anche da tessuto adiposo (lipoaspirato o grasso). Il campione è stato immerso in DMEM e conservato una notte a 4°C. Il giorno seguente il lipoaspirato/grasso è stato tagliato a pezzettini, posto a digerire con una soluzione al 0.075% di Collagenasi da *Clostridium histolyticum* di tipo II (Sigma) in Hank's Balanced Salts Solution e posto in agitazione per circa 3 ore a temperatura ambiente.

Trascorso il tempo di digestione, l'azione della collagenasi è stata bloccata con un ugual volume di DMEM e separata in tubi Falcon da 50 ml per essere centrifugata a 1200 rpm per 4 minuti.

La centrifugazione ha determinato la separazione di 4 fasi:

- uno strato superficiale oleoso giallo
- uno strato di materiale non digerito
- uno strato di fase acquosa (DMEM e soluzione di digestione)
- un pellet di cellule costituito da MSC e globuli rossi.

I pellets sono stati quindi raccolti in una singola Falcon e lavati con PBS.

Al fine di rimuovere ogni traccia di materiale non digerito la sospensione cellulare è stata filtrata con una garza sterile e l'eluato centrifugato una ultima volta per ottenere il pellet di cellule da seminare in fiasca con DMEM.

Dopo 72 ore dalla semina è stato effettuato il primo cambio di terreno per eliminare le cellule in sospensione che non hanno aderito alla superficie della piastra. Anche in questo caso il terreno è stato cambiato due volte a settimana e una volta che le cellule hanno raggiunto la confluenza sono state staccate, caratterizzate e seminate sul biomateriale.

Prima della coltura su scaffold, sulle cellule é stata effettuata la caratterizzazione immunofenotipica usando la tecnica dell'immunofluorescenza tramite citofluorimetria, diretta per gli anticorpi CD29, CD166, CD14, CD34, CD45 ed

indiretta per SH2, SH3, SH4 usando come anticorpo secondario un anti-mouse-FITC.

A tale scopo cellule mesenchimali aderenti sub-confluenti sono state staccate con Tripsina - EDTA 0,01% (Euroclone) e distribuite nella ragione di 105 per saggio e trattate con 1µg del rispettivo anticorpo per 45 min in ghiaccio e al buio, poi lavate 2 volte con soluzione fisiologica. Per SH2, SH3, SH4, è stata fatta una seconda incubazione nelle stesse condizioni della precedente con anti-mouse-FITC.

Per l'analisi citofluorimetrica 104 eventi per saggio sono stati acquisiti tramite FACS Caliber Instrument (Becton-Dickinson) e l'analisi eseguita con il software CellQuest.

3.2.4 Isolamento delle cellule Beta di ratto

Il pancreas di ratto è stato canulato con un catetere di polietilene in cui sono stati iniettati 20 ml di Hank's Solution con 1 mg/ml di collagenasi di tipo V. Le isole pancreatiche sono state disperse in una fiasca condizionata con collagene per 1 settimana e in presenza del terreno RPMI (Euroclone) con 10% di FCS e 5.5 mM di D-glucosio. Fino al raggiungimento alla confluenza della fiasca e per l'espansione cellulare, il medium è stato variato per 2 volte a settimana.

3.2.5 Isolamento di fibroblasti umani

I fibroblasti umani sono stati preparati in accordo alla versione modificata del protocollo di Rheinwald e Green. La pelle dopo essere stata lavata con PBS contenente il 3% di P/S, è stata ridotta a pezzetti molto piccoli (mantenendola umida per tutta l'operazione). Questi sono stati posti in una Petri con 20 ml di dispase disponendoli in modo che l'epidermide sia rivolta verso l'alto e sono stati lasciati a digerire per almeno 30 minuti (non più di 2 ore) a 37°C, CO₂ 5%. Al termine della digestione con l'aiuto delle pinzette è stata separata l'epidermide dal derma sottostante, mantenendo il tutto umido con dispase durante l'operazione.

I fibroblasti sono stati poi isolati mediante un passaggio in tripsina allo 0.25% + EDTA 0.02% (Euroclone) per 10 minuti. Al termine il tutto è stato spipettato bene e l'azione della tripsina è stata bloccata con DMEM completo. La soluzione è stata filtrata con un colino sterile da 70 µm (Ditta Falcon) in un tubo da 50 ml e

centrifugata per 7 minuti a 1200 rpm. Il derma pulito rimasto dopo la separazione dell'epidermide è stato raccolto e trasferito in una F75 contenente collagenasi di Worthington 80 U e lasciato agire overnight a 37°C al 5% di CO₂. La soluzione è stata spipettata, l'azione dell'enzima è stata bloccata con DMEM completo, filtrata in un colino, centrifugata per 7 minuti a 1200 rpm e seminata in una F25 per una settimana in DMEM completo. Al termine dei sette giorni e per 2 volte a settimana è stato posto terreno fresco DMEM con 10% FBS, 3mM L-glutammina, 100U/ml di penicillina e 100µg/ml di streptomina.

3.2.6 Semina su biomateriali di HLSC e cellule ITO e caricamento su bioreattore

La seguente tabella riassume le condizioni in cui le cellule sono state seminate.

		Medium		
		HCm	SCm	HCm + SCm (1:1)
Cellule	HLSC	HLSC	HLSC	HLSC
	ITO	ITO	ITO	ITO
	HLSC + ITO (3:1)	HLSC + ITO (3:1)	HLSC + ITO (3:1)	HLSC + ITO (3:1)

Tabella 3. 2

HCm è un normale terreno per epatociti, l' α -minimum essential medium / endothelial cell basal medium-1 (α -MEM/EBM) (3:1) (Gibco/ Cambrex) complementato con 5mM di L-glutammina, 12mM HEPES a pH 7.4, 5 IU/ml di penicillina, 50µg/ml di streptomina, 1µM dexametasone, 0.014 mg/ml glucagone,

0.16 U/ml insulina (tutto di Sigma, St. Louis, USA), 10% FCS (Invitrogen) e 10% HS (horse serum; Invitrogen).

Il terreno, invece, per la coltura delle cellule staminali che è stato utilizzato è l'Amniomed® Plus (Euroclone) che normalmente viene utilizzato per la coltura di amniociti da liquido amniotico.

Per quanto riguarda la semina dei due tipi cellulari singolarmente in HCm, SCm, ed HCm+ SCm (1:1) si è proceduto nel seguente modo: le cellule sono state staccate tra il passaggio 3 e il passaggio 8 dalla superficie della fiasca con tripsina-EDTA lasciata agire per 5 minuti, è stato effettuato un lavaggio in PBS (Euroclone), sono state contate le cellule con la camera di Burker e seminate 5×10^5 cellule diluite in 100 μ l in una spugna di collagene. Per ogni esperimento sono state utilizzate 8 spugne di collagene.

Per quanto riguarda la co-coltura HLSC + ITO, 5×10^5 cellule dei due tipi cellulari sono stati seminati nello stesso momento sulla superficie degli scaffold. Il giorno dopo le spugne sono state poste ciascuna nelle 8 camere indipendenti di un bioreattore con un flusso di medium di 0.25 ml/min attraverso ogni scaffold. Il medium in ogni camera fluiva dall'alto al basso della spugna.

Tutte le colture sono state effettuate in triplicato e a tempi diversi (1, 3, 5, 7 giorni) i campioni sono stati analizzati per:

- proliferazione cellulare mediante test MTT;
- espressione di un marcatore epatico mediante real-time PCR (albumina);
- analisi istologica e morfologica mediante inclusione in paraffina e APAAP test;

Solamente le co-culture HLSC-Ito sono state anche analizzate a 7, 14 e 21 giorni mediante CGH-Array per valutare l'assenza di alterazioni genetiche.

3.2.7 Semina su biomateriali di fibroblasti umani, MSC e cellule Beta

Pezzi 1x1 cm di NWD, NWC e spugne di HYAFF-11™ sono stati posti in multiwell e sono state effettuate le semine di questi tre tipi cellulari nel seguente modo.

I fibroblasti isolati ed espansi sono stati staccati da fiasca per 5 minuti con tripsina-EDTA 0.25%, lavati, contati e seminati sugli scaffolds a una densità di 3×10^4 cellule/cm² per 3 settimane in DMEM con 10% FBS, 3mM L-glutamina, 100U/ml di penicillina e 100µg/ml di streptomicina, 10 ng/ml bFGF, 50 µg/ml di acido ascorbico. Dopo 3 settimane in cui hanno depositato matrice extracellulare, sono stati eliminati dal biomateriale mediante shock osmotico (1h in acqua sterile a 37°C).

2×10^6 MSC e cellule Beta sono state staccate tra il passaggio 3 e il passaggio 8 dalla superficie della fiasca con tripsina-EDTA 0.25% per 5 minuti. Le cellule sono state lavate, contate e seminate sia singolarmente che in co-coltura in NWD, NWC e spugne di HA (tutti condizionati dai fibroblasti).

Tutte le colture e a tempi diversi (1, 3, 5, 7 giorni) sono state analizzate per:

- valutazione della proliferazione cellulare mediante test MTT;
- valutazione qualitativa mediante real-time PCR del marcatore pancreatico, insulina;
- analisi istologica e morfologica mediante inclusione in paraffina e colorazione con ditizione.

3.3 TEST DI PROLIFERAZIONE MTT

Per valutare il tasso di proliferazione cellulare è stato effettuato il saggio MTT (3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-dipheniltetrazolium bromide) secondo il metodo di Denizot e Lang (Denizot et al., 1986).

Il saggio MTT misura in modo quantitativo la presenza di attività succinico-deidrogenasica nelle cellule in coltura. L'attività di questo enzima, presente nei mitocondri delle cellule vitali, viene normalmente utilizzata quale marker per verificare l'attività metabolica, la vitalità e/o la crescita delle cellule in coltura.

Il test si basa sulla conversione del composto chimico MTT, un colorante azolico di colore giallo, in sali di formazano di colore blu, ad opera della succinico-deidrogenasi mitocondriale.

La quantità di formazano determinata spettrofotometricamente risulta essere proporzionale alla presenza di tale enzima nella coltura cellulare e quindi, direttamente proporzionale al numero delle cellule vitali. La lettura viene eseguita ad

una lunghezza d'onda (λ) di 540 nm. La soluzione MTT (5 mg/ml) è stata diluita 1:10 con PBS, in una falcon ricoperta da carta stagnola, per riparare dalla luce tale reattivo che è fotosensibile.

Le colture cellulari 3D sono state rimosse dal bioreattore e piazzate in una multiwell da sei pozzetti. Ad ogni campione è stato aggiunto 1 ml della soluzione MTT ed il tutto è stato poi incubato a 37°C per 3 ore. Terminato il periodo di incubazione l'MTT è stato aspirato, ogni scaffold è stato trasferito in un microtubo Eppendorf ed è stato aggiunto 1 ml di soluzione estraente (90% di isopropanolo, 10% di DMSO) che è stata lasciata agire per 15 minuti a 37°C. Le Eppendorf sono state vortexate per 5 minuti per permettere il rilascio del colorante dal biomateriale, sono state centrifugate a 15.000 g per 5 minuti e sul surnatante è stata effettuata la lettura spettrofotometrica a 540nm.

3.4 ANALISI DEI MARCATORI EPATICI e PANCREATICI

3.4.1 Estrazione e quantificazione dell'RNA

I campioni di biomateriale contenenti le cellule sono stati trasferiti in una Eppendorf sterile in cui è stato aggiunto 1 ml di soluzione TRIZOL (per 50-100 mg di tessuto) (Invitrogen) che favorisce la lisi delle membrane cellulari e l'omogenizzazione delle fibre del biomateriale. Dopo aver vortexato l'Eppendorf, l'omogenato è stato centrifugato a 12.000 xg per 10 minuti a 4°C ottenendo sia un pellet contenente membrane cellulari, polisaccaridi e DNA ad alto peso molecolare che un surnatante contenente RNA. Il surnatante è stato prelevato, posto in una nuova Eppendorf e lasciato ad incubare per 5 minuti a temperatura ambiente per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. Sono stati poi aggiunti 0,2 ml di cloroformio e dopo vigorosa agitazione per 15 secondi i campioni sono stati lasciati riposare per 2-3 minuti a temperatura ambiente. Da una ulteriore centrifugazione a 12.000 xg per 15 minuti a 4-8 °C sono state ottenute due fasi: una fase acquosa superiore, limpida contenente l'RNA ed una fase organica inferiore, torbida contenente i residui proteici.

Dopo aver prelevato e posto in una nuova Eppendorf la fase acquosa, sono stati aggiunti 0,5 ml di isopropanolo (per 1 ml di TRIZOL) che permette la precipitazione dell'RNA, quindi il tutto è stato posto ad incubare per 10 minuti in ghiaccio e successivamente centrifugato a 12.000 xg per 10 minuti a 4°C.

Dopo centrifugazione è stato eliminato il surnatante, il pellet è stato lavato con 1 ml di etanolo 75%, agitato e centrifugato a 7.500 xg per 5 minuti a 4-8 °C. Il pellet asciugato dall'etanolo è stato infine risospeso in acqua Rnasi-free. L'RNA estratto da ogni campione è stato successivamente quantificato al Nanodrop. Con questo strumento è stato possibile, inoltre, valutare la qualità dei campioni ottenuti escludendo una loro eventuale degradazione.

E' importante riuscire a quantificare l'RNA estratto per poter retrotrascrivere una uguale quantità di RNA per ogni campione (500 ng/μl).

3.4.2 Sintesi del cDNA

Sono stati retrotrascritti per ogni campione 500 ng/μl di RNA in un volume totale di reazione di 25 μl utilizzando il kit Invitrogen che sfrutta l'enzima M-MLV RT che è in grado di sintetizzare un filamento di cDNA utilizzando l'RNA come stampo. La miscela di reazione è stata preparata aggiungendo all'RNA 1 μl di Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 μg/ml), 1 μl di dNTP mix (10 mM) e acqua sterile Rnasi-free fino a un volume di 12μl. I campioni sono stati posti a 65 °C per 5 minuti e successivamente in ghiaccio per alcuni minuti. Dopo una breve centrifugata, a ciascuno sono stati aggiunti 4 μl di First Strand Buffer 5X, 2 μl di DTT (0,1 M), 1 μl di Inibitore di Ribonucleasi Ricombinanti (40 unità/ml), si è mescolato delicatamente e il tutto è stato posto a 37°C per 2 minuti. Infine si è aggiunto 1 μl di enzima M-MLV RT (200 unità/μl) mescolando bene. I campioni sono stati incubati a 37 °C per 50 minuti e successivamente la reazione enzimatica è stata inattivata a 70 °C per 15 minuti. Il cDNA così ottenuto è stato amplificato ed è stata valutata l'espressione genica mediante RT-PCR.

3.4.3 Real Time PCR

La RT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) è un procedimento efficace per determinare in tempo reale l'espressione genica. L'espressione si comincia a vedere quando viene raggiunto il valore soglia (ciclo di soglia) di fluorescenza del reporter, cioè quando i segnali di amplificazione specifici sono separabili da quelli del rumore di fondo del sistema. Prima viene raggiunto il ciclo di soglia, maggiore è l'espressione genica.

Le sonde fluorescenti che sono state utilizzate sono le UPL (Universal Probe Library, Roche Diagnostic) le quali sono legate all'estremità 5' con un fluoroforo reporter, la fluoresceina (FAM), e al 3' con un quencher dye nero. Sono formate da 8-9 nucleotidi e ricoprono l'intero trascritto. Se c'è espressione del gene ricercato, la Taq polimerasi rompe la sonda durante la fase di estensione, pertanto il fluoroforo quencher non trovandosi in vicinanza del reporter, non assorbe i fotoni emessi da quest'ultimo e può essere rilevato il segnale di fluorescenza. Il sito della Roche fornisce in tempo reale quale UPL è necessaria per valutare l'espressione di un specifico gene.

In un'epENDORF da 200µl è stata preparata una mix di reazione contenente 12.5 µl di Fast Start TaqMan probe Master (2X), 0.25 µl di UPL 10 µM, 0.25 µl di primer forward 20 µM, 0.25 µl primer reverse 20µM, 9.25µl di acqua Dnasi-Rnasi free (GIBCO). Tale miscela è stata mescolata delicatamente e spinnata. Sono stati aggiunti 2.5µl di cDNA mescolando poi delicatamente. Tutte queste operazioni sono state svolte in un blocco precedentemente congelato che permette pertanto di mantenere una temperatura bassa.

Il ciclo di PCR utilizzato è stato il seguente:

Numero cicli	Step	Temperatura	Tempo
1	hold	95°C	10 min
35-45	denaturazione	95°C	10 sec
	annealing	60°C	30 sec
	allungamento	72°C	60sec
1	hold	40°C	30 sec

I campioni sono stati inseriti nel Rotor Gene RG-3000A (Corbett Research).

Primers per Homo sapiens alpha-fetoprotein (AFP)

Left `tgtactgcagagataagtttagctgac`

Right `tccttgtaagtggcttcttgaac`

Primers per Homo sapiens albumin (ALB)

Left `aatggtgccaagctgctga`

Right `cttcccttcatcccgaagt`

3.5 ANALISI MORFOLOGICA

L'analisi morfologica dei campioni è stata effettuata su sezioni istologiche dei vari campioni. Per l'analisi istologica i campioni sono stati inclusi in paraffina, mentre per le analisi immunohistochimiche l'inclusione è stata effettuata in OCT.

3.5.1 Inclusioni in OCT (congelato)

I campioni di biomateriale su cui sono state coltivate le cellule sono stati trasferiti in vaschette di plastica ed immersi in OCT (Tissue-Tek OCT, Sakura Finetek, USA), un idrogel a base di polimeri alcolici utilizzato per la crio-fissazione. Le vaschette sono state poste in un recipiente contenente iso-pentano pre-raffreddato ed il tutto immerso in azoto liquido per qualche minuto.

Da ogni campione in OCT sono state ottenute, con taglio al criostato, sezioni trasversali seriali di 5 µm.

Le fette risultanti sono state appoggiate su vetrini polilisinati (o gelatinati) e lasciate asciugare all'aria o a temperatura ambiente per 45 minuti circa, successivamente i vetrini sono stati fissati in acetone per 10 minuti e conservati a -20 °C fino al loro utilizzo.

3.5.2 Inclusione in paraffina

L'inclusione in paraffina prevede i seguenti passaggi:

- Formalina 10% per almeno 24 ore
- Etanolo 70% per 1 ora
- Etanolo 80% per 45 min
- Etanolo 95% per 45 min
- Etanolo 100% per 45 min
- Xilolo 45 min
- Xilolo in stufa a 60°C per 45 min
- Xilolo + paraffina 1:1 in stufa a 60 °C per 1 ora
- Paraffina pura liquida 1 ora
- Taglio al microtomo.

Al momento della colorazione istologica le sezioni devono subire una sparaffinatura

secondo il seguente protocollo:

- Xilolo 3-4 min
- Alcool 100% 4 min
- Alcool 95 % 2 min
- Alcool 80% 2 min
- Acqua 5 min

3.5.3 **Analisi immunoistochimica**

Per valutare la presenza di CK19, marcatore tipico degli epatociti, è stata utilizzata un'analisi immunoistochimica indiretta, sfruttando cioè un sistema di tre anticorpi, e utilizzando il metodo di rivelazione APAAP (fosfatasi alcalina anti-fosfatasi alcalina). La reazione con uno specifico substrato cromogeno (FAST RED) dà luogo a una colorazione rossa che conferma la presenza dell'antigene.

Le sezioni ottenute dai campioni inclusi in OCT, dopo essere state scongelate dai -20°C, sono state trasferite in una cameretta umida appositamente creata, in cui sono state fatte avvenire le varie reazioni a temperatura ambiente.

I vetrini sono stati incubati in successione con:

- siero di coniglio diluito 1:20 in 0:05 m di Maleato TRIZMA pH 7.6 (Sigma,) per 20 minuti al fine di saturare i siti aspecifici
- anticorpo primario mouse anti-human CK19 (DAKO, Milano, Italia) diluito 1:20 per 2 ore
- anticorpo secondario rabbit anti- mouse (Link Ab- DAKO) diluito 1:25 per 30 minuti
- mouse APAAP diluito 1:50 per 30 minuti
- aggiunta la soluzione colorante FAST RED substrate (Sigma) per 20 minuti.

Fra le varie incubazioni, le sezioni sono state lavate con una soluzione salina tamponata TRIZMA. Al termine della reazione le sezioni sono state controcolorate con ematossilina di Mayer (Sigma) per evidenziare le cellule ed i vetrini sono stati montati in Glicergel.

3.5.4 **Analisi istologica**

Colorazione ematossilina – eosina (di vetrini preparati con biomateriale incluso in OCT)

I vetrini sono stati fissati in acetone per 5 minuti e lasciati asciugare. Si sono lavati velocemente in acqua MilliQ e sono stati posti in ematossilina per 1.5 minuti e ancora lavati velocemente in acqua MilliQ e in acqua di fonte.. Dopo di che i vetrini

sono stati posti in eosina per mezzo minuto e lavati in acqua MilliQ e poi ancora in acqua di fonte. Infine i vetrini sono stati montati con Glicergel o balsamo di Canada.

Colorazione ematossilina – eosina (di vetrini preparati con biomateriale fissato in paraffina)

Xilolo	5 min.
Xilolo	5 min.
Alcool etilico assoluto	5 min.
Alcool 95%	5 min
Alcool 70 %	5 min.
Acqua distillata	5 min.
Ematossilina	10 sec.
Acqua distillata	5 min.
Acqua di fonte	5 min
Eosina	2 min
Alcool 70 %	5 min
Alcool 95%	5 min
Alcool etilico assoluto	5 min
Xilolo	5 min
Xilolo	5 min

I vetrini infine sono stati montati con balsamo del Canada.

Colorazione con ditizione (difenilcarbazione)

Lo Zinco oltre ad essere associato ad alcuni enzimi, lo è anche all'insulina ed è stato localizzato a livello delle Isole di Langerhans. Viene rivelato istochimicamente anche in vivo sfruttando il principio che il ditizione forma dei sali complessi insolubili e colorati con alcuni metalli pesanti (Zn, Pb, Cu, Ag, An, Cd): quelli con lo Zn hanno colore rosso purpureo.

Per quanto riguarda la metodica si è proceduto come segue.

Le sezioni sono state immerse per 60 secondi in una soluzione composta da 3 mg di ditizione in 1 ml di ammoniaca al 25% e aggiungendo dopo 5 minuti 9 ml di H₂O

distillata. Si è scaldato il tutto a bagnomaria a 70°C per 10 minuti e filtrato. 1 ml della soluzione è stata poi diluita in 100 ml di tampone cacodilato a pH 7.3. pH finale: 7.6. La sezione è stata posta per 1 min in una soluzione di paraformaldeide al 7% portata a pH 7.3 con tampone cacodilato. Infine si è lavato rapidamente in acqua distillata e il vetrino è stato montato in gomma sciropo di Apathy. Il precipitato di ditionato di Zinco assume una colorazione porpora.

3.6 ARRAY CGH

Estrazione del DNA: mediante il kit GenElute™ Blood Genomic Dna Kit (Sigma) è stato estratto il DNA da 15 campioni di biomateriale contenente le cellule HLSC differenziate in epatociti (sia posti in HCm che SCm) e per l'analisi sono state utilizzati 500 ng di tale DNA e 500 ng di DNA da 15 campioni di epatociti come controllo.

Digestione DNA: i due DNA sono stati digeriti con gli enzimi RsaI e Alu I (Promega).

Marcatura e purificazione del DNA: i campioni sono stati marcati utilizzando uno specifico kit mediante la tecnica "random priming" con cianine Cy5 e Cy3 (Kit marcatura Quick Amp, due colori Agilent).

Ibridazione su vetrino: i prodotti marcati sono stati purificati, denaturati e co-ibridati su un vetrino 44K (Human Genome CGH Microarray, 4x44K, Agilent) in cui sono contenute delle sonde (oligomeri 60bp) distribuite lungo tutto il genoma, con risoluzione media di circa 100Kb. Tale fase è stata fatta avvenire per 24/40 ore a temperatura controllata (65°C)

Analisi dati: al termine dell'incubazione si sono effettuati dei lavaggi per eliminare ciò che non si è ibridato e i vetrini sono stati letti tramite scanner (G2505B Agilent). L'elaborazione dei dati è stata effettuata mediante appositi software forniti da Agilent (Feature Extraction e CGH-Analytics).

4. RISULTATI

4.1 DIFFERENZIAMENTO IN VITRO DELLE CELLULE STAMINALI EPATICHE

4.1.1 Analisi morfologica

Sono state effettuate delle colture poste in bioreattore di cellule HLSC su spugne di collagene in un terreno per cellule epatiche (HCm), in un terreno per cellule staminali, l'Amniomed (SCm) e nella combinazione tra i due in rapporto 1:1. Lo stesso è stato svolto per le cellule Ito e per co-culture dei due tipi cellulari rispettivamente in rapporto 3:1. Il flusso di medium applicato al bioreattore è stato di 0.25 ml/min.

E' interessante analizzare l'aspetto morfologico delle cellule HLSC a tre giorni nel medium per cellule staminali, l'Amniomed, ed è riportato nella figura 4.8.

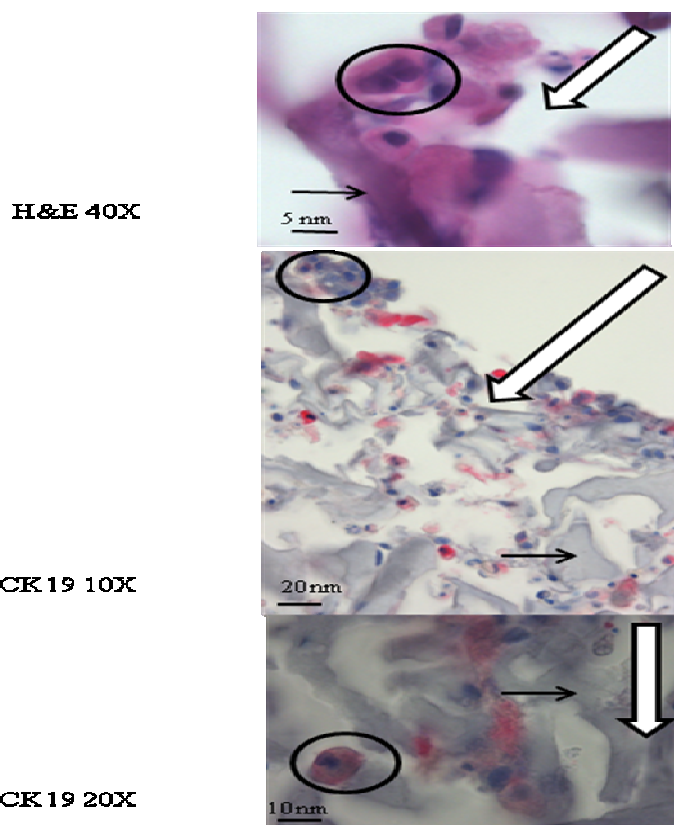


Figura 4.8 Analisi morfologica di HLSC in scaffold 3D in condizioni di flusso di Amniomed a 3gg. Cellule colorate con H/E ed IM per CK19 (cellule rosse). Freccia bianca: direzione del flusso del medium. Freccia nera : fibre di collagene.

E' molto evidente che le cellule in queste condizioni si sono organizzate in clusters all'interno dei piccoli compartimenti presenti nella spugna. Le HLSC si sono dimostrate capaci di differenziare già dopo 3 giorni in quanto mostrano un fenotipo simil-epatocita, come confermato dalla positività in rosso del marker epatico CK19 e dalla presenza di cellule con più nuclei (cellule all'interno del circolo). La direzione del flusso è indicata dalla freccia bianca, mentre la presenza delle fibre di collagene, indicate dalla freccia nera, indica l'organizzazione di piccoli compartimenti nei quali le HLSC possono organizzarsi in un tessuto simile a quello epatico. Comunque da queste foto si può notare che le cellule rimangono ancora negli strati più superficiali della spugna.

Nella figura 4.9 sono riportate le condizioni delle cellule a 7 giorni.

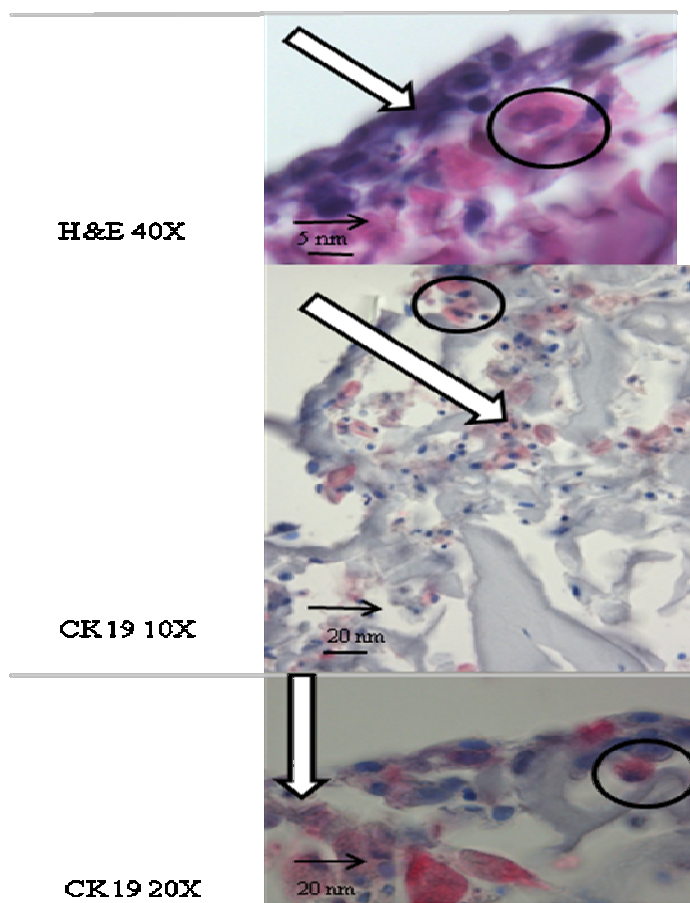


Figura 4.9 Analisi morfologica di HLSC in scaffold 3D in condizioni di flusso di Amniomed a 7gg. Cellule colorate con H/E ed IM per CK19 (cellule rosse). Freccia bianca: direzione del flusso del medium. Freccia nera : fibre di collagene

Le cellule coltivate, che inizialmente erano solo sulla superficie del sito di perfusione (freccia bianca), velocemente iniziano ad organizzarsi in multipli strati e a migrare all'interno della spugna di collagene. Al settimo giorno alcuni clusters appaiono intrappolati all'interno della spugna, mostrando cellule stratificate.

Il fenotipo appare ancora più differenziato rispetto a quello mostrato ai 3 giorni in quanto le cellule assumono una forma esagonale spesso associata a doppi nuclei (cellule all'interno del circolo) in contrasto con la forma appiattita che si osserva generalmente in colture monostrato e in condizioni statiche (dato non mostrato).

4.1.2 Test di proliferazione MTT

La proliferazione cellulare è stata valutata a 1, 3, 5, 7 giorni mediante il saggio dell'MTT.

I risultati sono riportati nel grafico 4.1:

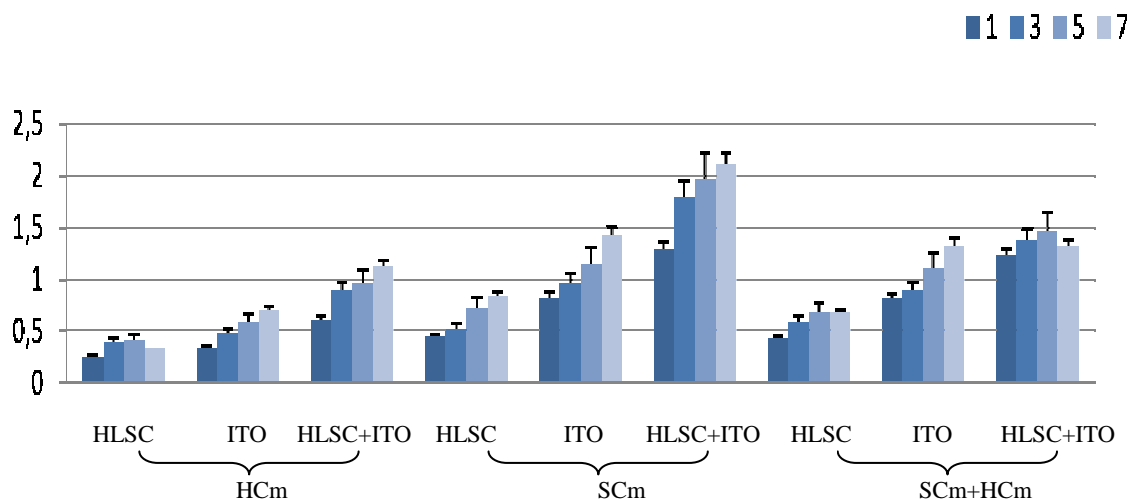


Grafico 4.1: risultati MTT di proliferazione cellulare a 1, 3, 5, 7

In tale grafico si può notare che in generale le cellule sono in grado di sopravvivere anche dopo i 7 giorni in ogni condizioni di coltura in quanto i valori di MTT non decrescono. Ciò è un utile indicatore della buona funzionalità del bioreattore.

In dettaglio si può osservare che quando le HLSC sono coltivate da sole in terreno per epatociti c'è un decremento nel valore di MTT ai 7 giorni, mentre la situazione cambia quando si varia il medium. Un incremento nel valore di MTT è osservabile

invece in scaffolds contenenti cellule Ito coltivate singolarmente ma soprattutto quando le colture sono poste in Amniomed. I valori della proliferazione cellulare aumentano di molto intorno ai 7 giorni nelle co-culture HLSC e Ito e in misura più elevata in terreno per cellule staminali.

4.1.3 Produzione di albumina

La funzionalità delle colture cellulari, e pertanto i livelli di secrezione dell'albumina, sono stati valutati mediante Real Time PCR in aliquote di medium prelevate dal bioreattore.

Il grafico 4.2 conferma che la proteina è stata sintetizzata dalle cellule cresciute in condizioni dinamiche durante il periodo sperimentale.

L'incremento nella produzione di albumina dalle HLSC coltivate da sole è strettamente correlata al medium applicato: la presenza di terreno per cellule staminali determina una più grande espressione proteica. Quest'ultima cresce ancora di più nelle co-culture HLSC e Ito in Amniomed.

Le cellule Ito (cellule non parenchimali) non producono generalmente albumina e alfa-feto proteina..

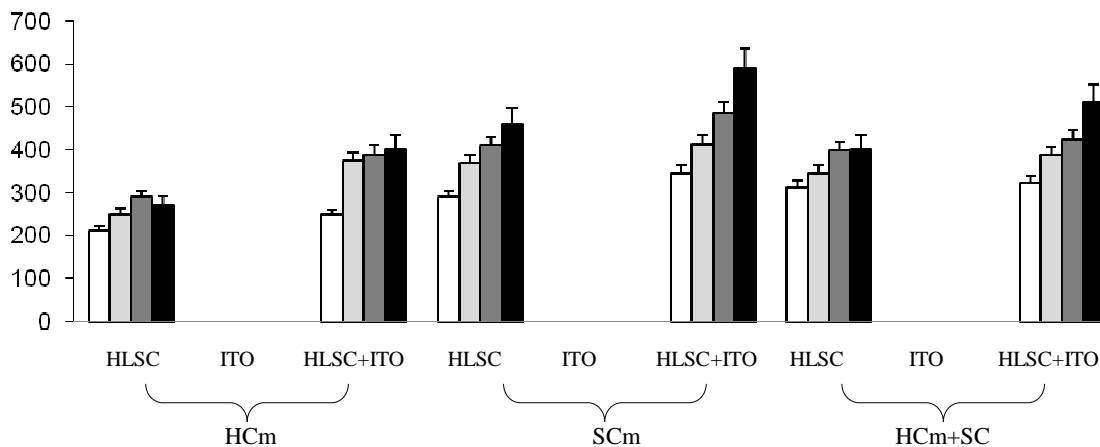


Grafico 4.2: espressione dell'alfa-feto proteina a 1, 3, 5, 7 gg valutata mediante RT-PCR

4.1.4 Array CGH

Sono state anche effettuate delle co-colture dinamiche HLSC-Ito in spugne di collagene e sono state analizzate mediante la tecnica dell'Array CGH a 7, 14 e 21 giorni. Lo scopo è stato quello di valutare se le cellule differenziate non fossero geneticamente alterate. Tale metodica infatti è una nuova tecnica molto sensibile che permette di identificare sbilanciamenti genomici.

Dopo aver analizzato i risultati mediante il software Agilent si è potuto valutare nei 15 campioni analizzati l'assenza di delezioni e/o amplificazioni e quindi la normalità dal punto di vista genetico delle cellule differenziate (figura 4.10). Questi dati sono molto importanti perché indicano una sicurezza in un possibile utilizzo in vivo di tali cellule.

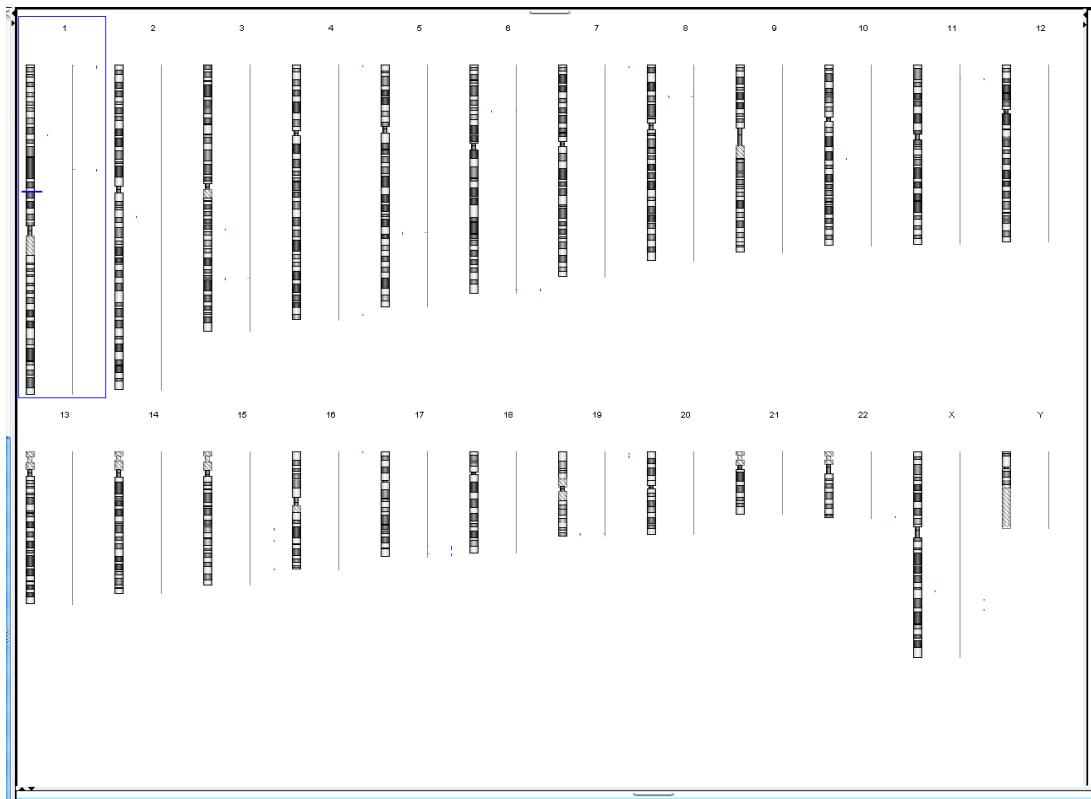


Figura 4.10 Risultati Array CGH

4.2 INDUZIONE IN VITRO DEL DIFFERENZIAMENTO DI CELLULE MESENCHIMALI ADULTE IN ISOLE DI LANGERHANS

4.2.1 Scelta del biomateriale: MTT e analisi morfologica

Il primo step di questo studio è stato capire quale tipo di biomateriale fosse migliore per le colture 3D delle cellule beta di ratto. Si sono utilizzati tre tipi di scaffolds a base di acido ialuronico HYAFF 11®, il NW D, NW C e spugna.

E' stato subito tentato l'approccio di coltivare precedentemente fibroblasti umani nel biomateriale in modo che questi potessero depositare fibre della matrice extracellulare all'interno degli interstizi dello scaffold, come ad esempio collagene di tipo I, III e IV, laminina e fibronectina. I fibroblasti sono stati poi eliminati per shock osmotico. Lo scopo di questo procedimento è stato quello di capire se in questo modo ci sarebbe stato un migliore attecchimento delle cellule del pancreas nel biopolimero.

Dopo aver coltivato le cellule beta (vedere materiale e metodi) è stato effettuato il saggio dell' MTT a 1, 3, 7, 14 e 21 giorni per valutare il loro grado di proliferazione. I risultati si possono osservare nel grafico 3

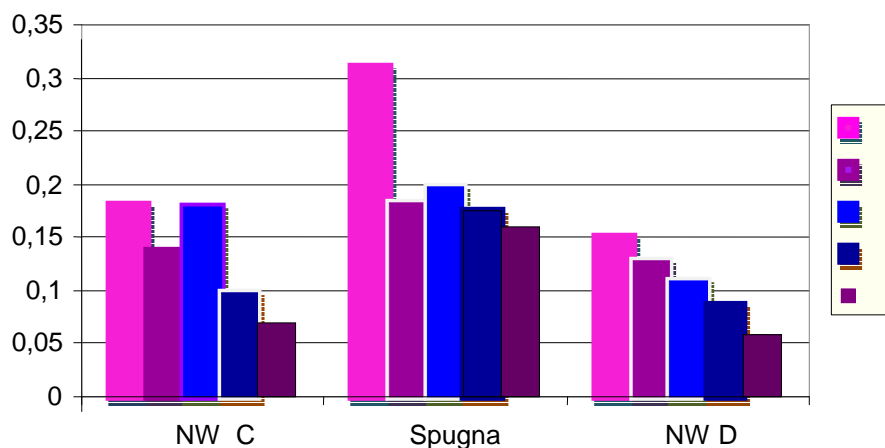


Grafico 4.3 Grado di proliferazione delle cellule beta coltivate a diversi giorni di coltura in NW C, NW D e spugna di HA.

Si può notare che la proliferazione cellulare è molto più elevata in spugne di acido ialuronico anche se in tutti e tre i casi, l'MTT cala dopo il primo giorno di coltura.

Per quanto riguarda l'analisi morfologica, le cellule beta coltivate nella spugna HYAFF 11® sono capaci di mantenere il loro originale fenotipo e di penetrare all'interno del biomateriale formando, già a partire da una settimana dalla loro coltura, le Isole di Langerhans. Al contrario nei NW C e NW D le cellule rimangono solamente nella superficie degli scaffolds e non si organizzano a formare strutture simil-pancreatiche. Ciò è stato valutato mediante la colorazione con ditizione.

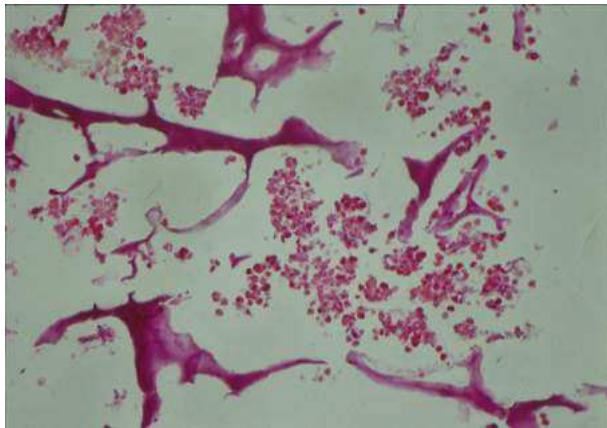


Figura 4.11 Isole di Langerhans di ratto dopo 7gg di coltura in spugne di HA (X100)
Colorazione con ditizione

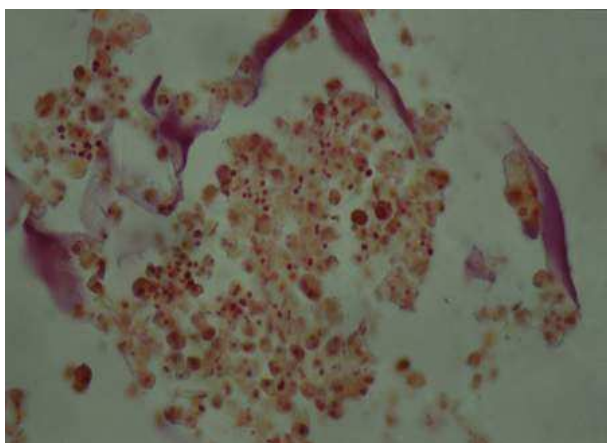


Figura 4.12 Isole di Langerhans di ratto dopo 14gg di coltura in spugne di HA (X100)
Colorazione con ditizione

5. DISCUSSIONE

5.1 *Studio del differenziamento in vitro delle cellule staminali epatiche*

Il trapianto di fegato rappresenta ancora l'unico trattamento effettivo per pazienti con patologie gravi che lo hanno reso poco funzionale. Il problema deriva dall'elevata domanda di organi che sfortunatamente e molti pazienti muoiono prima di ricevere il trapianto. Alcuni ricercatori hanno tentato di sviluppare vari fegati bioartificiali extracorporeali (BAL) per provvedere a un temporaneo supporto al fegato malato; teoricamente dovrebbe compensare la funzione dell'intero organo. Ma questi rappresentano solamente dei supporti che rimpiazzano per un certo tempo una parte di funzioni essenziali del fegato. Una prospettiva per ovviare a tutti questi inconvenienti riguarderebbe il mantenimento della funzionalità e motilità degli epatociti al di fuori dell'ambiente nativo del fegato. Sono state sviluppate diverse combinazioni di bioreattori ad esso dedicati e molta attenzione è stata focalizzata all'adattamento di questi nello sviluppo di un supporto ibrido extracorporeale del fegato. Un ostacolo deriva dal fatto che epatociti coltivati, tendono a perdere molte delle loro funzioni caratteristiche di cellule differenziate e nel giro di 3-4 giorni muoiono. Allo scopo di by-passare questa limitazione, diversi autori hanno spostato la loro attenzione alla biologia delle cellule staminali. Recentemente Herrera et al. hanno isolato con successo una popolazione di cellule staminali adulte dal fegato, le HLSC. In vitro tali cellule differenziano in epatociti maturi, mentre in vivo contribuiscono alla rigenerazione del parenchima del fegato in topi immunodeficienti. Alla luce di questi risultati, lo scopo di questa prima parte del dottorato è stato lo sviluppo di un metodo efficiente per aumentare il differenziamento in vitro di cellule staminali pluripotenti del fegato in epatociti maturi. Gli approcci che sono stati utilizzati sono stati le seguenti.

- 1) Strategie di ingegneria dei tessuti: consentono la crescita tridimensionale delle cellule.
- 2) Utilizzo di un bioreattore per una corretta perfusione del medium di coltura che

pertanto sostiene la viabilità cellulare e il mantenimento della funzionalità cellulare. Infatti precedentemente erano state effettuate prove di coltura delle cellule staminali del fegato in condizioni statiche ed era stato valutato quale tipo di biomateriale potesse essere adatto a tale scopo. Si è confrontata la crescita coltivando cellule HLSC in scaffolds a base di acido ialuronico derivanti dalla sua totale esterificazione, lo HYAFF-11™ in forma di NW D, NW C e spugna. Tali strutture sono state coltivate in un normale terreno per epatociti. Si è potuto osservare che le cellule non erano in grado di penetrare negli strati più profondi del biomateriale, avevano una morfologia per lo più fibroblastoide e non esprimevano marcatori epatici. Comunque l'unica forma di biomateriale che era in grado di supportare una migliore crescita delle cellule era la spugna. Alla luce di questi risultati e considerando il fatto che in vivo gli epatociti hanno un'alta attività metabolica grazie all'estensiva vascolarizzazione del fegato che vi garantisce un apporto di nutrienti e scambio di scarti, sono state ottimizzate le colture 3D in un bioreattore a perfusione per tentate di mimare quello che avviene normalmente nel fegato. Infatti il bioreattore è in grado di creare un flusso di medium attraverso lo scaffold apportando perciò ossigeno e terreno in tutti gli strati del biomateriale. In questo modo dovrebbe avvenire una migliore distribuzione di cellule anche negli strati più profondi delle scaffold.

3) Infine è stata testata una diversa combinazione di colture cellulari (HLSC, Ito ed entrambi) e medium (HCm, SCm, ed entrambi).

Il sistema dinamico utilizzato ha permesso la coltura contemporanea e indipendente di 8 spugne porose con un accurato controllo del grado di flusso attraverso ogni scaffold. E' stato utilizzato un flusso di 0.25 ml/min. E' interessante notare ciò che accade per le HLSC in un normale terreno per epatociti. Già dopo 7 giorni, e soprattutto a 14 giorni, si è ottenuta una buona proliferazione cellulare ed una organizzazione in clusters all'interno delle fibre di collagene, oltre che a un buon fenotipo da epatocita maturo come dimostrato dalla positività al marker biliare CK 19 (cellule rosse) e dalla presenza di cellule con un doppio nucleo. L'espressione del gene dell'albumina conferma il differenziamento in epatocita.

Incoraggiati dal successo di questi risultati è stata focalizzata l'attenzione allo sviluppo di un sistema diretto a potenziare il grado di proliferazione e lo stato differenziato della popolazione di HLSC. La strategia è stata improntata nell'utilizzo di un terreno per cellule staminali, l'Amniomed, capace di agire nella biologia di staminalità delle popolazione di cellule non differenziate delle HLSC, con il supporto di una popolazione cellulare rappresentata dalle cellule Ito. Quest'ultimo fatto è stato suggerito dall'evidenza che modelli di colture tridimensionali tra cellule parenchimali e non, può mimare l'organizzazione del parenchima del fegato, con l'approccio promettente di ricostruire la struttura e la geometria della matrice del microambiente epatico. Perciò quello che si è potuto osservare per le HLSC in un normale terreno per epatociti e poste in bioreattore (come detto precedentemente) è stato potenziato dalla presenza di un terreno per cellule staminali: anche in questo caso le cellule si sono organizzate in clusters, hanno assunto una morfologia da epatocita con doppi nuclei con una colorazione rossa per la positività al CK 19. Inoltre a 14 giorni hanno cominciato a stratificarsi nel biomateriale (figure 4.8 e 4.9)

Pertanto in generale si è potuto osservare che la perfusione tramite il bioreattore ha permesso una migliore distribuzione cellulare anche negli strati più profondi del biomateriale e le cellule sono risultate più tonde e meno fibroblastoidi. La variazione invece del medium ha migliorato la proliferazione cellulare e l'espressione genica dei marcatori epatici. Infatti in dettaglio si possono fare le seguenti osservazioni.

1) *Terreno classico per epatociti.* Questa condizione induce un moderato valore nella proliferazione cellulare, maggiore per le cellule Ito, (grafico 4.1) e nella produzione di albumina in tutte le colture, tranne nel caso delle cellule Ito che normalmente non sono capaci di produrre albumina (grafico 4.2). Questo risultato conferma che in quest'ultime cellule non sono presenti progenitori epatici.

2) *Medium per cellule staminali* In colture di HLSC è indotto un piccolo incremento nel valore di MTT (grafico 4.1) e un alto aumento nella produzione di albumina (grafico 4.2) Nelle colture Ito avviene un importante aumento nella proliferazione cellulare (grafico 4.1), mentre anche in questo caso non avviene produzione di albumina (grafico 4.2). Nelle co-culture HLSC-Ito la presenza del

medium per cellule staminali induce un più alto grado di proliferazione e produzione di albumina. Questo può essere spiegato dalle interazioni positive tra la popolazione di cellule staminali all'interno delle HLSC con le cellule Ito.

3) *Terreno per cellule staminali seguito da terreno per epatociti* Induce un migliore effetto nell'aspetto differenziativo rispetto quello proliferativo

Alla luce di questi risultati è stata confermata che la combinazione di un terreno per cellule staminali con co-culture HLSC-Ito incrementa in maniera molto rafforzata la proliferazione cellulare e la maturazione.

In conclusione le cellule HLSC sono state identificate come cellule proliferative con capacità differenziative in senso epatico grazie anche a un reciproco e aumentato sinergismo tra il medium e cellule non parenchimali. Inoltre questi risultati dimostrano la possibilità di considerare questo come un protocollo per il differenziamento e l'amplificazione delle HLSC, risorsa utilizzabile per il trapianto cellulare oltre che per la ricostruzione in vitro di un tessuto ghiandolare.

Un ulteriore dato che può essere utile per un futuro utilizzo di tali colture per l'applicazione clinica nell'uomo deriva dal fatto che geneticamente le HLSC differenziate non presentano alterazioni cromosomiche, come dimostrato dalla tecnica del CGH array (figura 4.10.).

5.2 *Induzione in vitro del differenziamento di cellule mesenchimali adulte in Isole di Langerhans*

Durante una prima fase di studio è stato valutato il vantaggio nell'utilizzo del biomateriale sottoforma di no-woven o spugna dell'estere benzilico esterificato al 100% dell'acido ialuronico (HYAFF-11™). Anche in questo caso la spugna si è rivelata come il migliore scaffold le cui fibre hanno promosso l'aggregazione cellulare in strutture 3D. In particolare la presenza di matrice extracellulare secreta da fibroblasti utilizzati per "condizionare" lo scaffold (vedere materiali e metodi) ha aumentato le proprietà biologiche dello scaffold permettendo un migliore attecchimento delle cellule Beta del pancreas, le quali hanno così trovato un

ambiente ideale per la loro crescita. Per quanto riguarda l'analisi morfologica, le cellule Beta coltivate nella spugna HYAFF 11® sono capaci di mantenere il loro originale fenotipo e di penetrare all'interno del biomateriale formando, già a partire da una settimana dalla loro coltura, le Isole di Langerhans (figura 4.11 e 4.12). Al contrario nei NW C e NW D le cellule rimangono solamente nella superficie degli scaffolds e non si organizzano a formare strutture simil-pancreatiche.

Questi risultati confermano che lo HYAFF-11™ è uno scaffold che permette l'adesione, l'organizzazione e la proliferazione delle Isole di Langerhans. Le cellule comunque mantengono il loro fenotipo.

Un limite è stata la scarsa capacità proliferativa di tali cellule (grafico 4.3). Perciò alla base dell'esperienza maturata con gli approcci riguardanti il fegato, si stanno tentando delle co-culture con le cellule staminali mesenchimali (MSC) derivanti sia da midollo che da tessuto adiposo che, come è noto, hanno capacità differenziative e proliferative notevoli. Quando vengono a contatto con tessuti specializzati ricevono segnali che le indirizzano verso il fenotipo del tessuto ospite. Quindi ci si aspetta che grazie a queste colture ci sia il differenziamento delle cellule MSC in cellule Beta funzionali risentendo dell'influenza di cellule che già normalmente risiedono nell'organo in esame.

BIBLIOGRAFIA

Carraro A, Flaibani M, Cillo U, Michelotto L, Magrofuoco E, Buggio M, Abatangelo G, Cortivo R, Herrera MB, Tetta C, Elvassore N, Zavan B. A combining method to enhance the in vitro differentiation of hepatic precursor cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010.

William M Lee RH, Squires s, Nyberg ED, Hoofnagle JH. Acute liver failure: summary of a workshop hepatology

William M., Lee, Robert H., Squires Jr, Scott L. Nyberg, Edward Doo and Jay H. Hoofnagle MEETING REPORT Acute Liver Failure: Summary of a Workshop *Hepatology*. 47(4), 2008.

Yu CB, Pan X.P, Li LJ. Progress in bioreactors of bioartificial livers Review. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 2009; 8(2): 134.

Van de Kerkhove MP, Poyck PP, Deurholt T, Hoekstra R, Chamuleau RA, Van Gulik TM. Liver support therapy: an overview of the AMC-bioartificial liver research. *Dig. Surg.* 2005; 22(4): 254.

Morsiani E, Brogli M, Galavotti D, Pazzi P, Puviani AC, Azzena GF. Biologic liver support: optimal cell source and mass. *Int. J. Artif. Organs*. 2002; 25(10): 985.

Van de Kerkhove MP, Hoekstra R, Chamuleau RA, van Gulik TM. Clinical application of bioartificial liver support systems. Review. *Ann. Surg.* 2004; 240(2): 216.

Chamuleau RA, Poyck PP, Van de Kerkhove MP. Bioartificial liver: its pros and cons. Review. *Ther. Apher. Dial.* 2006; 10(2): 168.

Yu CB, Pan XP, Li LJ. Progress in bioreactors of bioartificial livers. Review. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2009; 8(2):134.

Rozga J. Liver support technology-an update. Review. *Xenotransplantation.* 2006; 13(5): 380.

Catapano G, Patzer JF. 2nd, Gerlach J.C. Transport Advances in Disposable Bioreactors for Liver Tissue Engineering. *Adv Biochem. Eng. Biotechnol.* 2010; 115: 117.

Tilles AW, Berthiaume F, Yarmush ML, Toner M. Critical issues in bioartificial liver development. Review. *Technol. Health Care.* 2002; 10(3-4): 177.

Flaibani M, Magrofuoco E, Elvassore N. Computational modeling of cell growth heterogeneity in a perfused 3D scaffold. *IECR.* 2010; 49: 859.

Lewis M, MacArthur B, Malda, J, Pettet G, Please C. Heterogeneous proliferation within engineered cartilaginous tissue: the role of oxygen tension. *Biotechnology and Bioengineering.* 2005; 91 (5): 607.

Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, Russo C, Jobin C, Brenner DA. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signalling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2003; 37: 1043.

Flaibani M, Luni C, Sbalchiero E, Elvassore N. Flow Cytometric Cell Cycle Analysis of Muscle Precursor Cells Cultured Within 3D Scaffolds in a Perfusion Bioreactor. *Biotechnol. Prog.,* 2009; 25(1): 286.

Cannizzaro C, Tandon N, Figallo E, Park H, Gerecht S, Radisic M, Elvassore N, Vunjak-Novakovic G. Practical aspects of cardiac tissue engineering with electrical stimulation. *Methods Mol Med.* 2007; 140: 291.

Cimetta E, Flaibani M, Mella M, Serena E, Boldrin L, Coppi PD, Elvassore N. Enhancement of viability of muscle precursor cells on 3D scaffold in a perfusion bioreactor. *Int J Artif Organs*. 2007; 30: 415.

Semler EJ, Ranucci CS, Moghe PV. Tissue assembly guided via substrate biophysics: applications to hepatocellular engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2006; 102: 1.

Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J Immunol Methods*. 1986; 89: 271.

Allen JW, Bhatia SN. Engineering Liver therapies for the future. Review. *Tissue Engineering*. 2002; 8(5): 725.

Eschbach E, Chatterjee SS, Nöldner M, Gottwald E, Dertinger H, Weibezahn KF, Knedlitschek G. Microstructured scaffolds for liver tissue cultures of high cell density: morphological and biochemical characterization of tissue aggregates. *J Cell Biochem*. 2005; 95(2): 243.

Smith MK, Riddle KW, Mooney DJ. Delivery of hepatotrophic factors fails to enhance longer-term survival of subcutaneously transplanted hepatocytes. *Tissue Eng*. 2006; 12(2): 235.

Chan C, Berthiaume F, Nath BD. Hepatic tissue engineering for adjunct and temporary liver support: critical technologies. Review. *Liver transplantation*. 2004; 10(11): 1331.

Sugimoto S., Mitaka T., Ikeda S. Morphological changes induced by extra-cellular matrix are correlated with maturation of rat small hepatocytes *J. of Cellular Biochemistry*, **87**, 16, 2002.

Zavan B, Brun P, Vindigni V, Amadori A, Habeler W, Pontisso P, Montemurro D, Abatangelo G, Cortivo R. Extracellular matrix-enriched polymeric scaffolds as a

substrate for hepatocyte cultures: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials*. 2005; 26 (34): 7038.

Harada K, Mitaka T, Miyamoto S. et al. Rapid formation of hepatic sinusoid in collagen sponge by rat small hepatocytes and hepatic non parenchymal cells. *J of Hepatology*. 2003; 39: 716.

Sudo R, Ikeda S, Sugimoto S. Bile canalicular formation in hepatic organoid reconstructed by rat small hepatocytes and nonparenchymal cells. *J of Cellular Physiology*. 2004; 199: 252.

Benten D, Kumaran V, Joseph B, Schattenberg J, Popov Y, Schuppan D, Gupta S. Hepatocyte transplantation activates hepatic stellate cells with beneficial modulation of cell engraftment in the rat. *Hepatology*. 2005; 42(5): 1072.

Schmelzer E., Zhang L., Bruce A., Wauthier E., Ludlow J., Yao H., Moss N., Melhem A., McClelland R., Turner W., Kulik M., Sherwood S., Tallheden T., Cheng N., Furth M.E., Reid L.M.. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *Journal of experimental medicine*, 204 (8), 1973, 2009.

De Bartolo L., Morelli S., Rende M., Campana C., Salerno S., Quintiero N., Drioli E.. Human Hepatocyte Morphology and Functions in a Multibore Fiber Bioreactor. *Macromolecular bioscience* 7(5), 671, 2007

MacPherson, J, O'Hare D, Unwin P, Winlove C. Quantitative Spatially Resolved Measurements of Mass Transfer Through Laryngeal Cartilage. *Biophysical Journal* 1997; 73(5): 11.

Chow D, Wenning, L, Miller W, Papoutsakis E. Modeling pO₂ Distributions in the Bone Marrow Hematopoietic Compartment. I. Krogh's Model. *Biophysical Journal*. 2001; 81(2): 10.

Zhao F, Pathi P, Grayson W, Xing Q, Locke B R, Ma T. Effects of Oxygen Transport on 3-D Human Mesenchymal Stem Cell Metabolic Activity in Perfusion and Static

Cultures: Experiments and Mathematical Model. *Biotechnol. Prog.* 2005; 21(4): 1269.

Ledezma GA, Folch A, Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Numerical model of fluid flow and oxygen transport in a radial-flow microchannel containing hepatocytes. *J. Biomech. Eng.* 1999; 121(1): 58.

Moreira J, Santana P, Feliciano A, Cruz P, Racher, A, Griffiths J, Carrondo M. Effect of viscosity upon hydrodynamically controlled natural aggregates of animal cells grown in stirred vessels. *Biotechnology Progress.* 1995; 11(5): 9.

Mehta G, Mehta K, Sud D, Song J W, Bersano-Begey T, Futai N, Heo Y S, Mycek M-A, Linderman, JJ, Takayama S. Quantitative measurement and control of oxygen levels in microfluidic poly(dimethylsiloxane) bioreactors during cell culture. *Biomed Microdevices.* 2007; 9: 123.

Tanaka Yuki, Yamato Masayuki, Okano Teruo, Kitamori Takehiko, Sato Kiichi. Evaluation of effects of shear stress on hepatocytes by a microchip-based system *Measurement science & technology.* 2006; 17(12): 3167.

Pelttari K, Steck E, Richter W The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Injury* 2008; 39S1: S58-S65.

Jaward H, Ali NN, Lyon AR, Chen QZ, Harding SE, Boccaccini AR. Myocardial tissue engineering: a review. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine.* 2007; 1: 327-342.

Tom k. Kuo, Shun-Pei Hung, Chiao-Hui Chuang, Cien-Tsun Chen, Yu-Ru V, Szu-Ching Y. Fang, Vincent W. Yang, Oscar K. Lee. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* 2008;134:2111-2121.

Greenbenger J, Epperly M. Bone marrow-derived stem cells and radiation response. *Radiation oncology* 2009;19:133-139.

Abdallah B, Kassem M. The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases. Current status and future perspectives. *J. Cell. Physiol* 2009; 218: 9–12.

Bianco P, Gehron P, Simmons P. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts and assay. *Stem Cells* 2008; 313-319.

Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5:836-47.

Higgins GM, Anderson RM. Experimental Pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931;12:186-202.

Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver Regeneration. *Science* 1997;276:60-66.

Sigal SH, Rajvanshi P, Gorla GR, et al. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am J Physiol.* 1999;276: G1260-72.

Grisham JW. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver: autoradiography with thymidine-H. *Cancer Res* 1962;22:842-849.

Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, et al. Liver regeneration. *J Am Coll Surg*. 2003;197:634-59.

Paradis V, Youssef N, Dargere D, et al. Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas. *Hum Pathol*. 2001;32:327-32.

Rudolph KL, Chang S, Millard M, et al. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science*. 2000;287:1253-8.

Fausto N. Liver Regeneration. *J Hepatol* 200;32:19-31.

Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-70.

Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*. 2000;32:11-6.

Korbling M, Katz RL, Khanna A, et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med*. 2002;346:738-46.

Austin TW, Lagasse E. Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells. *Mech Dev*. 2003;120:131-5.

Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003 ;422:901-4.

Medvinsky A, Smith A. Stem cells: Fusion brings down barriers. *Nature*. 2003;422: 823-5.

Taub R, Greenbaum LE, Peng Y. Transcriptional regulatory signals define cytokine-dependent and -independent pathways in liver regeneration. *Semin Liver Dis.* 1999;19:117-27.

Blindenbacher A, Wang X, Langer I, et al. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 2003;38:674-82.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003;374:1-20.

Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science.* 1996; 274:1379-83.

Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, et al. .Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1441-6.

Huh CG, Factor VM, Sanchez A, et al. Hepatocyte growth factor/c-met signalling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4477-82.

Burr AW, Toole K, Chapman C, et al. Anti-hepatocyte growth factor antibody inhibits hepatocyte proliferation during liver regeneration. *J Pathol* 1998 ;185:298-302.

Tomiya T, Ogata I, Yamaoka M, et al. The mitogenic activity of hepatocyte growth factor on rat hepatocytes is dependent upon endogenous transforming growth factor- α . *Am J Pathol* 2000;157:1693-701.

Shimizu M, Hara A, Okuno M, et al. Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic apoptosis. *Hepatology* 2001;33:569-76.

Matsuda Y, Matsumoto K, Yamada A, et al. Preventive and therapeutic effects in rats of hepatocyte growth factor infusion on liver fibrosis/cirrhosis. *Hepatology* 1997;26:81-9.

LeCouter J, Moritz DR, Li B, et al. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science*. 2003;299:890-3.

HerreraBH. Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, Deregibus MC, Bussolati B, Camussi G. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* 2006;24:2840-2850.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Professore Giovanni Abatangelo e la Professoressa Roberta Cortivo per avermi dato l'opportunità di svolgere questo lavoro di tesi e per la loro grande disponibilità e simpatia.

Un grazie speciale alla D.ssa Barbara Zavan, innanzitutto per l'aiuto che mi ha dato in questi tre anni, ma soprattutto per tutta l'amicizia e l'affetto mostratami.

Voglio anche ringraziare un'altra persona speciale che ho avuto il piacere di conoscere, la D.ssa Laura Cardarelli.

Un grazie enorme alle D.sse Letizia Ferroni, Chiara Gardin ma soprattutto Elisa Nalesso e Laura Iacobellis per il loro preziosissimo aiuto nella stesura di questa tesi.

Un sentito grazie anche alle D.sse Manuela Duca, Katia Marchioro, Sara Gomirato e il Dott. Angelo Cellamare per tutto l'aiuto e l'amicizia che mi hanno saputo dare.

Ringrazio anche mia mamma, mio fratello, Barbara, il mio fidanzato Daniele con tutta la sua famiglia e tutte le persone che conosco e che mi vogliono bene, per il supporto morale che mi hanno dato.

Infine il grazie più speciale va ai miei amori Aurora e Pippo.