

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”
Dipartimento di Scienze Mediche

Corso di Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare XXI Ciclo

Relazione di fine anno 2005-2006

Supervisore:
Professoressa Rita Carini

Dottoranda:
Caterina Dal Ponte

PROGETTO

Il preconditionamento epatico: meccanismi biomolecolari di induzione della tolleranza al danno da ischemia/riperfusion.

Introduzione

Il preconditionamento epatico è il processo per cui una preliminare esposizione a condizioni di stress moderato incrementa la resistenza del tessuto epatico alle lesioni causate da una temporanea condizione di ischemia seguita da riperfusione (1,2).

Il mancato apporto di ossigeno durante la fase ischemica determina la de-energizzazione dei mitocondri e la riduzione del contenuto intracellulare di ATP a cui si associano alterazioni dell'omeostasi del Na^+ , H^+ e Ca^{2+} (3-6).

La reintroduzione dell'ossigeno durante la riperfusione causa:

- aumento di produzione da parte dei mitocondri di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che inducono stress ossidativo e transizione della permeabilità mitocondriale (7);
- attivazione delle cellule di Kupffer con conseguente rilascio di ROS, ossido nitrico (NO), citochine pro-infiammatorie (TNF, IL-6, IL-1 β , MCP-1, IL-12, IL-18 e CXCL) e inibizione della sintesi di citochine antiinfiammatorie (IL-10) (8-9);
- adesione dei leucociti alle cellule endoteliali per aumentata espressione di molecole di adesione cellulare (ICAM e selettina P) e infiltrazione neutrofila del parenchima epatico (8).

Il preconditionamento epatico può essere indotto da:

- breve interruzione dell'apporto ematico seguita da riperfusione (10)
- esposizione ad ipertermia transitoria (11)
- esposizione a un moderato stress ossidativo (12)

Studi sul topo e sul ratto hanno dimostrato che una interruzione per 5-10 min. dell'afflusso ematico al fegato, seguita da 10-15 min. di riperfusione riduce il danno epatico prodotto da una successiva fase prolungata di ischemia/riperfusion (I/R) (13-17), effetto particolarmente evidente in fegati steatosici dove l'applicazione del preconditionamento dimezza il rilascio di transaminasi e il danno endoteliale (18).

Ratti sottoposti al trapianto di fegato pretrattati con un ciclo di I/R o moderata ipertermia prima dell'espanto mostrano una riduzione dell'insorgenza di lesioni epatiche e un miglioramento della sopravvivenza, suggerendo la possibile applicazione di una simile procedura ai trapianti epatici umani (19-20).

Gli studi fino a oggi compiuti hanno dimostrato che gli effetti protettivi del preconditionamento ischemico si esplicano in due fasi:

1. Preconditionamento precoce: fase che segue immediatamente la procedura preconditionante e dura 2-3 ore; coinvolge la modulazione di alcune funzioni cellulari.
2. Preconditionamento tardivo: inizia dopo 12-24 ore dal trattamento preconditionante e può durare fino a 3-4 giorni; richiede la trascrizione genica e la sintesi di nuove proteine (1,10,21).

Il preconditionamento è quindi un processo di adattamento che rende le cellule più resistenti ad un successivo stress potenzialmente letale. E' indotto da stimoli specifici che attraverso vie di segnalamento intracellulare e la modulazione di alcune funzioni cellulari attivano i meccanismi responsabili della citoprotezione (10).

Lo scopo di questo progetto è la caratterizzazione dei meccanismi molecolari attraverso cui il preconditionamento epatico induce la tolleranza al danno da ischemia/riperfusion e la valutazione della sua efficacia terapeutica per l'ottimizzazione degli interventi di trapianto e di resezione di fegato.

Risultati precedenti

Allo scopo di studiare i meccanismi responsabili degli effetti citoprotettivi del preconditionamento il nostro laboratorio ha messo a punto un sistema cellulare di preconditionamento epatico.

Utilizzando epatociti di ratto preconditionati con una breve ipossia-riossigenazione, è stata ottenuta la interessante osservazione che lo sviluppo della resistenza precoce al danno ipossico degli epatociti preconditionati è conseguenza dell'attivazione di un sistema intracellulare in grado di prevenire la produzione dell'acidosi ipossica e del conseguente accumulo citotossico di Na^+ (22-24). Tale sistema è la ATPasi vacuolare (V-ATPasi) che ha il ruolo di produrre la acidificazione degli endosomi e dei lisosomi e che, negli epatociti preconditionati, è attivata e traslocata in plasmamembrana (25). Questo processo consente l'estrusione di protoni in maniera indipendente dai sistemi classici di controllo del pH, evitando quindi l'accumulo di Na^+ nella cellula. Ciò può essere importante per l'acquisizione della tolleranza al danno da ischemia/riperfusion da parte degli epatociti, in quanto il sovraccarico di sodio è responsabile dell'alterazione dei sistemi di regolazione del volume cellulare (6) e promuove la morte cellulare durante l'ipossia e le prime fasi della riossigenazione (26,27).

In studi più recenti è stato iniziato l'esame della complessa rete di mediatori intracellulari che sono coinvolti nella attivazione di questi meccanismi citoprotettivi. Tale sistema di mediatori coinvolge numerose vie di segnalamento intracellulare che possono essere stimulate da 2 agenti iniziatori del preconditionamento epatico individuati negli studi "in vivo": l'adenosina e l'ossido nitrico (2).(Figura1)

MEDIATORI RESPONSABILI DELL'INDUZIONE DEL PRECONDIZIONAMENTO EPATICO

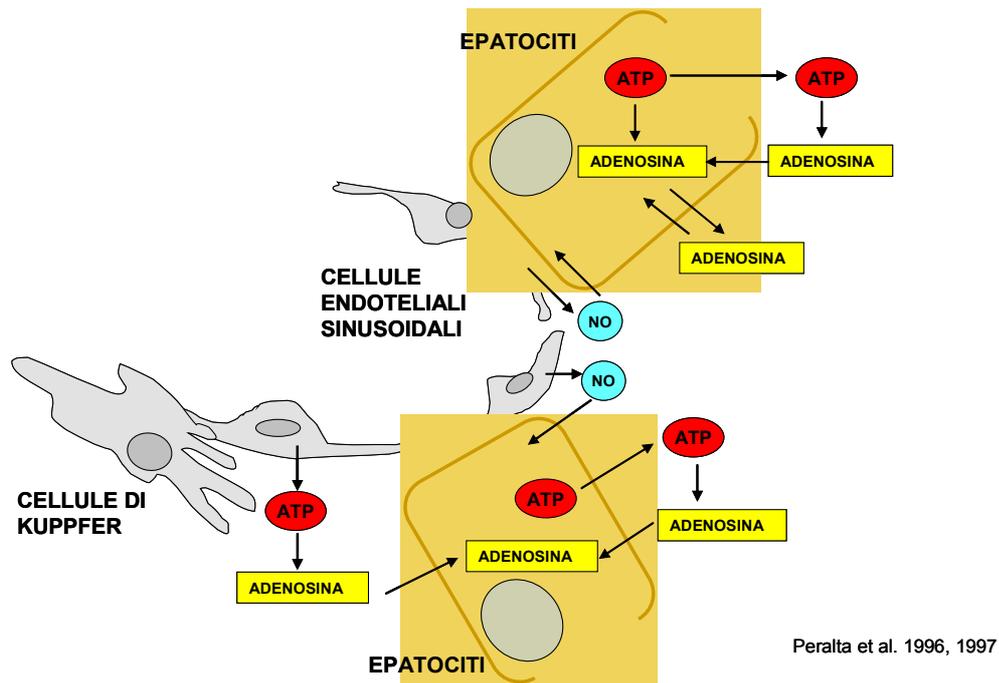


Figura 1

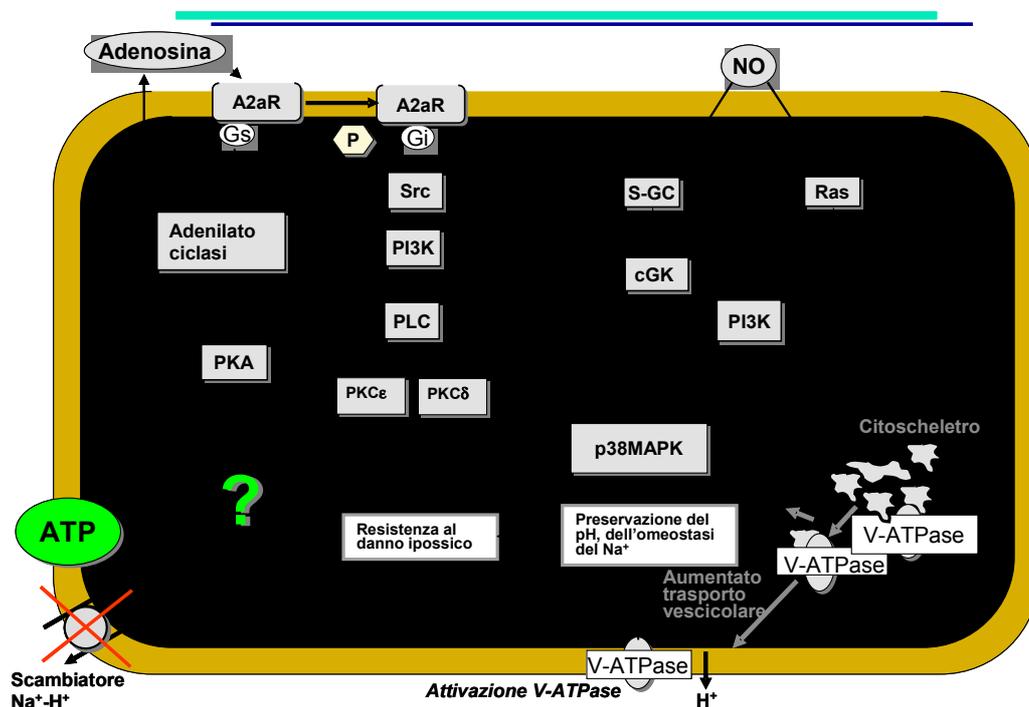
E' stato osservato che le vie di segnalamento attivate dall'adenosina coinvolgono i recettori A2a dell'adenosina (A2aR), che in seguito a stimolazione attivano una via di segnalamento che coinvolge le proteine G inibitorie (Gi), la fosfolipasi C (PLC), le specifiche isoforme delta ed epsilon della protein chinasi C (PKC) e la MAP chinasi p38 (p38 MAPK) (28). Anche se i recettori A2aR sono classicamente accoppiati alle proteine G stimolatorie (Gs) e quindi alla adenilato-ciclasi (A-C) ed alla protein chinasi A (PKA) in una prima fase è stato escluso il coinvolgimento di questa ulteriore via di segnalamento, in quanto la stimolazione diretta della PKA con forskolina non ha mostrato di produrre effetti citoprotettivi (28). Successivamente tuttavia si è potuto spiegare questo apparente paradosso: in corso di preconditionamento abbiamo una effettiva stimolazione delle proteine Gs, della A-C e della PKA, la PKA è quindi responsabile della fosforilazione del A2aR. Tale processo determina lo spostamento della affinità del recettore dalle proteine Gs alle Gi con conseguente attivazione di PLC, PKC e p38 MAPK ed induzione della citoprotezione (29). La PKA può però produrre fosforilazione di A2aR solo in presenza del suo ligando (adenosina) e tale fenomeno spiega il mancato effetto protettivo della sola stimolazione della PKA (29).

La via di segnalamento che si attiva a partire dalle proteine Gi coinvolge inoltre la fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI3K), considerata un mediatore critico del preconditionamento epatico e il mediatore della sopravvivenza cellulare (29). PI3K si attiva a seguito della congiunta stimolazione delle proteine Gi e della Src tirosino chinasi (29) ed è successivamente coinvolta nella attivazione della PLC e della PKC (14).

Il trattamento di epatociti di ratto con donatori di NO determina invece citoprotezione grazie all'attivazione di due parallele vie di segnalamento: una coinvolge la proteina Ras e l'altra la guanilato-ciclasi (G-C) e la protein chinasi dipendente dal cGMP (cGK) (30,31). Entrambe queste vie concorrono alla successiva attivazione di PI3K mentre solo la via G-C/cGK porta alla stimolazione della p38 MAPK (30,31).

PI3K e p38 MAPK appaiono dunque mediatori centrali del preconditionamento degli epatociti e, come riscontrato in studi "in vivo" (10) anche del fegato in toto. Questi risultati rappresentano la prima caratterizzazione di sistemi molecolari intracellulari coinvolti nel preconditionamento epatico. (Figura 2)

INDUTTORI DEL PRECONDIZIONAMENTO DEGLI EPATOCITI E MECCANISMI MOLECOLARI COINVOLTI



Hepatol 2000, 2001; Gastroenterol 2004; J Cell Sci. 2004; FRBM 2001, 2003, 2006; J. Hepatol 2006

Figura 2

Allo stato attuale delle ricerche non sono stati evidenziati ulteriori induttori del condizionamento epatico.

Studi compiuti nel cuore e nel cervello hanno tuttavia dimostrato che una breve ischemia induce il rilascio di un'elevata quantità di ATP (32), che è quindi rapidamente degradato ad ADP ed adenosina, che è risultata essere un induttore del condizionamento nel cuore e nel fegato "in vivo" (32,10) e nel nostro sistema di epatociti condizionati (22).

È interessante rilevare che, come è stato riportato in un nostro recente studio, l'ATP stesso è in grado di indurre un'augmentata resistenza al danno ipossico degli epatociti (33).

In particolare l'ATP agisce tramite stimolazione del sottogruppo P2Y dei recettori purinergici (P2YR), che con un meccanismo Src mediato attivano p38 MAPK. A sua volta p38 MAPK agisce tramite inibizione di entrambe le isoforme 1 e 2 di ERK (ERK1/2) i cui segnali promuovono l'influsso di Na⁺ tramite lo scambiatore Na⁺/H⁺ (NHE) sulla membrana cellulare (33). Il possibile contributo dell'ATP all'induzione del condizionamento epatico deve essere comunque approfondito.

Prospettive future

Ancora in gran parte sconosciuti sono:

- gli effetti del p.e. associati:
 - alla attivazione della trascrizione del DNA ed i fattori di trascrizione nucleari coinvolti
 - alla sintesi di nuove proteine a potenziale citoprotettivo
- I cambiamenti del proteoma responsabili di:
 - aumentata resistenza al danno da I/R dell'endotelio sinusoidale
 - diminuita espressione, da parte dell'endotelio, di molecole di adesione per i leucociti.
- I mediatori molecolari intracellulari responsabili della minore attivazione delle cellule di Kupffer.
- I cambiamenti proteomici che, nelle diverse cellule epatiche, sottendono il mantenimento della capacità rigenerativa del fegato pur in condizioni di I/R.
- L'analisi della possibilità che i diversi mediatori del pre-condizionamento possano produrre un effetto citoprotettivo e, possibilmente, pro-rigenerativo, anche se attivati "dopo" un insulto patogeno. Tale evenienza riprodurrebbe così, anche nel fegato, il fenomeno del post-condizionamento di recente descritto nel cuore (34,35).

Le future linee di ricerca del nostro laboratorio riguarderanno:

STUDI CON GLI EPATOCITI

1) CARATTERIZZAZIONE DI ULTERIORI INDUTTORI E MEDIATORI COSTITUTIVI DEL PRECONDIZIONAMENTO

INDUTTORI

Valuteremo se epatociti esposti a preconditionamento ipossico rilasciano ATP e se l'uso di specifici inibitori dei recettori P2Y (suramin e RB2) blocca la citoprotezione da preconditionamento. La possibilità che molecole naturali, anche diverse dagli effettivi induttori del preconditionamento, possano indurre effetti preconditionati ha un notevole interesse nell'ottica di una effettiva applicazione clinica del preconditionamento farmacologico. Dati preliminari ci indicano che la glicina è in grado di indurre citoprotezione con un meccanismo mediato dalla p38 MAPK. Esamineremo quindi la capacità della glicina di mimare gli effetti del preconditionamento e le vie di trasduzione coinvolte.

MEDIATORI COSTITUTIVI

Continueremo le ricerche sui mediatori costitutivi che partecipano allo sviluppo del fenotipo epatocitario preconditionato, in particolare la PKC, la p38 MAPK e la PI3K.

Valuteremo l'impatto di procedure preconditionate sull'attività della diacilglicerolo chinasi (DGK), di ASK-1 e della fosfatasi PTEN. DGK fosforila il diacilglicerolo (DAG) ad acido fosfatidico, diminuendone quindi la disponibilità (36); poiché il DAG è necessario all'attivazione delle PKC (36), la DGK dovrebbe avere il ruolo di regolatore negativo delle PKC. ASK-1 è una MAP chinasi, chinasi, chinasi (MAPKKK) coinvolta nella regolazione di JNK e p38 MAPK (37). PTEN infine defosforila il prodotto della PI3K (PIP3) antagonizzandone gli effetti (38).

- 2) **FATTORI DI TRASCRIZIONE NUCLEARE COINVOLTI NELL'INDUZIONE DEL PRECONDIZIONAMENTO.**
Esamineremo la capacità degli induttori e dei mediatori del preconditionamento caratterizzati in precedenza di attivare i fattori di trascrizione HIF-1, NFkB, AP-1 e STATs (generalmente sono coinvolti nella risposta della cellula allo stress, nella induzione della proliferazione o nella modulazione della risposta infiammatoria) (39-42), o di promuovere il loro legame al DNA.
- 3) **PROTEINE DI NUOVA SINTESI ASSOCIATE ALLO SVILUPPO DEL PRECONDIZIONAMENTO.**
Valuteremo, sia in termini di mRNA che di livelli proteici, l'espressione di geni target dei fattori di trascrizione trovati attivati nel punto 2) che siano noti per modulare la proliferazione cellulare o la sopravvivenza (per es. la NO sintetasi, la cicloossigenasi, il trasportatore del glucosio GLUT-1, l'eritropoietina, il regolatore del pH anidrasi carbonica IX, le proteine anti-apoptotiche Bcl-2, Bcl-xl, survivina e la ciclina beta1) (39-42).
- 4) **INDUTTORI E MEDIATORI DEL PRECONDIZIONAMENTO COINVOLTI NELLA PROMOZIONE DELLA CITOPROTEZIONE E DELLA PROLIFERAZIONE.**
Analizzeremo il ruolo degli induttori e dei mediatori identificati nei punti 1), 2), 3) nella produzione della resistenza al danno da ipossia o da ipossia/riossigenazione. Studieremo il loro contributo e quello degli induttori e mediatori caratterizzati nelle ricerche precedenti nella induzione della proliferazione di epatociti preconditionati.
- 5) **POST-CONDIZIONAMENTO DEGLI EPATOCITI**
Valuteremo se gli induttori del preconditionamento sono anche in grado di produrre effetti citoprotettivi, ed eventualmente, pro-rigenerativi se applicati subito dopo l'inizio di una ipossia prolungata o all'inizio della riossigenazione dopo l'ipossia. In caso di risultato positivo verificheremo l'eventuale coinvolgimento dei mediatori del pre-condizionamento nel produrre anche gli effetti del post-condizionamento.
- 6) **EFFETTI DEGLI INDUTTORI E MEDIATORI DEL PRECONDIZIONAMENTO SU DIFFERENTI MODELLI DI DANNO EPATOCITARIO**
Cercheremo di verificare se gli epatociti pre-, ma soprattutto post-condizionati siano anche resistenti ad altri tipi di danno responsabili della necrosi acuta del fegato "in vivo". Esamineremo l'azione del preconditionamento sul danno epatocitario indotto da CCl4 (come modello di danno da intossicazione da farmaco) e da FasL (come modello di danno da reazione immunitaria citotossica).

STUDI CON LE CELLULE ENDOTELIALI

Valuteremo il contributo degli induttori, dei mediatori e dei fattori di trascrizione nucleari implicati nel preconditionamento degli epatociti all'induzione della resistenza al danno e alla proliferazione delle cellule endoteliali. Esamineremo, inoltre la loro capacità di inibire la espressione di molecole di adesione per i leucociti: beta-2-integrine ICAM-1 e beta-1-integrine VCAM-1.

STUDI CON LE CELLULE DI KUPFFER

Studieremo il ruolo degli induttori, dei mediatori e dei fattori di trascrizione nucleari implicati nel preconditionamento degli epatociti nella riduzione della attivazione delle cellule di Kupffer (KC).

Tale effetto sarà valutato in KC precondizionate e non, esposte o meno ad ipossia, ipossia-riossigenazione, LPS o TNF, come produzione di ROS, di citochine pro- ed anti-infiammatorie e dei fattori di crescita per gli epatociti e le cellule endoteliali HGF e VEGF.

STUDI CON CO-COLTURE DI CELLULE EPATICHE

E' molto probabile che le interazioni fra le diverse cellule epatiche abbiano un ruolo nello sviluppo del fenotipo epatico condizionato, tramite il rilascio di mediatori eventualmente responsabili della induzione di risposte da pre-condizionamento in cellule vicine.

Alcuni esempi:

- è stato ipotizzato che la citoprotezione da NO degli epatociti in corso di precondizionamento avvenga a seguito del rilascio di NO da parte delle cellule endoteliali (2);
- è noto che l'attivazione del fattore di trascrizione STAT-3 negli epatociti è primariamente dovuta al rilascio di IL-6 da parte delle KC (43);
- la stessa IL-6 è nota per avere effetti pro-rigenerativi e citoprotettivi (44).

Impiegando co-colture cellulari inizieremo ad esaminare le complesse interazioni fra le diverse cellule epatiche. Questo sistema sperimentale permetterà di verificare se lo sviluppo del fenotipo precondizionato da parte di una determinata cellula epatica è determinato o meno dalla presenza di altri tipi di cellule epatiche. Sarà verificata inoltre la capacità del mezzo di coltura di cellule precondizionate di promuovere il precondizionamento di altre cellule.

Le informazioni ottenute in questi studi saranno rese immediatamente disponibili agli altri Centri Universitari che collaborano al presente Progetto ed in particolare verificate usando cellule epatiche in linea e modelli sperimentali "in vivo". Tutti i mediatori che si dimostreranno coinvolti nello sviluppo del precondizionamento epatico sia nei modelli "in vitro" che "in vivo" saranno valutati in biopsie epatiche di pazienti esposti o meno a precondizionamento ischemico e quindi sottoposti a trapianto di fegato.

Bibliografia

1. Yellon DM et al. The preconditioning phenomenon. A tool for the scientist or a clinical reality. *Circ. Res.* 2000; 87: 543-550.
2. Peralta C et al. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997; 25:934-937.
3. Rosser GB et al. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implication. *Gastroenterology* 1995; 108:252-275.
4. Bronk SF et al. Efflux of protons from acidic vesicles contributes to cytosolic acidification of hepatocytes during ATP depletion. *Hepatology* 1991; 14:626-633.
5. Gasbarrini A et al. Effect of anoxia on intracellular ATP, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, and cytotoxicity in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1992; 267:6654-6663.
6. Carini R et al. Alterations of cell volume regulation in the development of hepatocyte necrosis. *Exp Cell Res* 1999; 248:280-29
7. Jassem W et al. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplant* 2002; 73:493-499.

8. Lentsch AB et al. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*. 2000; 32:169-173
9. Takeuchi D et al. Interleukin 18 causes hepatic ischemia/reperfusion injury by suppressing anti-inflammatory cytokine expression in mice. *Hepatology* 2004; 39:699-710.
10. Carini R et al.. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning *Gastroenterology* 2003, 125:1480-1491.
11. Yamagami K et al. Heat shock preconditioning ameliorates liver injury following normothermic ischemia-reperfusion in steatotic rat livers. *J Surg Res* 1998; 79: 47-53.
12. Ito K et al. Doxorubicin preconditioning : A protection against rat hepatic ischemia- reperfusion injury. *Hepatology* 2000; 31: 416-419.
13. Peralta C et al. Liver ischemic preconditioning is mediated is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229: 264-270.
14. Peralta C et al. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997; 25:934-937.
15. Yoshizumi T et al. Amelioration of the liver injury by ischemic preconditioning. *Br. J. Surg.* 85 (1998) 1636-1640.
16. Teoh N et al. Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-kB, p38 kinase, and cycle entry. *Hepatology* 2002; 36:94-102.
17. Yadav S et al. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 1999; 130:1223-1231.
18. Serafin A et al. Ischemic preconditioning increases the tolerance of fatty liver to hepatic I/R injury in the rats. *Am J Pathol* 2002; 161:587-601.
19. Arai M et al. Contribution of adenosine A₂ receptors to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against storage/reperfusion injury in rat liver. *Hepatology* 2000; 32:297-302.
20. Yin DP et al. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplant* 1998; 66: 152-157.
21. Bolli R. The late preconditioning. *Circ Res* 2000; 87: 972-983.
22. Carini R et al. Ischemic preconditioning reduces Na⁺ accumulation and cell killing in isolated rat hepatocytes exposed to hypoxia. *Hepatology* 2000; 31:166-172.
23. Carini R et al. Stimulation of p38 MAP kinase reduces acidosis and Na⁺ overload in preconditioned hepatocytes. *FEBS Lett* 2001;491:180-183.
24. Carini R et al. Alteration of Na⁺ homeostasis as a critical step in the development of irreversible hepatocyte injury after adenosine triphosphate depletion. *Hepatology* 1995;21:1089-1098.
25. R.Carini et al. Preconditioning-induced cytoprotection in hepatocytes requires Ca²⁺-dependent fusion of lysosomes with plasmamembrane. *JCell Sci.* 2004;117:1065-1077.
26. Carini R et al. Intracellular Na⁺ accumulation and hepatocyte injury during cold storage. *Transplant* 1999; 68;249-319.
27. Carini R et al. Alteration of Na⁺ homeostasis in hepatocyte reoxygenation injury. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1500;297-305.
28. Carini R. et al. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology*. 2001; 33:131-139.
29. [Carini R. et al.](#) Role of phosphatidylinositol 3-kinase in the development of hepatocyte preconditioning. *Gastroenterol.* 2004;127:914-23.
30. R.Carini et al. Signal pathway responsible for hepatocyte preconditioning by nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* 2003, 34:1047-1055.
31. R. Carini et al. PI3K-dependent lysosome exocytosis in nitric oxide-preconditioned hepatocytes *Free Radical Biology and Medicine* 2006, 40: 1738-1748.
32. Schulz R et al. Signal trasduction of ischemic preconditioning. *Cardivasc Res* 2001; 52:181-198.
33. Carini R. et al. Purinergic P2Y₂ receptor promote hepatocyte resistance to hypoxia. Accepted for publication *J.Hepatology*

34. Tsang A et al. .Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res.* 2004;95:230-2.
35. Yellon DM, Hausenloy DJ.Realizing the clinical potential of ischemic preconditioning and postconditioning. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2005;2:568-75.
36. Luo B. et al. Diacylglycerol kinases. *Cellular Signaling.*2004; 16:983-989.
37. Tobime K.et al. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO reports.*2001; 21:222-228.
38. Stambolic V.et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 1998; 95:29-39.
39. Semenza GL et al. HIF-1: mediator of physiological and pathological response to hypoxia. *J.Appl.Physiol.* 2000; 88:1474-1480.
40. Pahl HP. Activators and target genes of Rel/NFkB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6853-6856.
41. Laderoute KR et al. 2002; *Mol and Cell Biol.* 22: 2515-2523.
42. Mitchell TJ . Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling. 2005 *Immunology*114:301-312.
43. Foschi D et al. Effects of ischaemia and reperfusion on liver regeneration in rats. *Eur J Surg.* 1993;159:393-8
44. Selzner M, Camargo CA, Clavien PA. Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: protective effects of interleukin-6.*Hepatology.* 1999;30:469-75.

PARTECIPAZIONE A SEMINARI

11/09/2006: **The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis**

Dr Prof. Dieter Bromme, Ph D

29/09/2006: **La rete di regolazione delle attività anti-angiogeniche degli interferoni**

Prof. Ulrich Pfeffer – Istituto Nazionale per la ricerca sul cancro (IST)

Caterina Dal Ponte