

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare Ciclo XXII

Relazione 1° anno

**IL PRECONDIZIONAMENTO EPATICO: MECCANISMI
BIOMOLECOLARI DI INDUZIONE DELLA TOLLERANZA AL
DANNO DA ISCHEMIA/RIPERFUSIONE**

**Candidato: Caterina Dal Ponte
Tutor: Prof.ssa Rita Carini**

SOMMARIO

INTRODUZIONE	3
RISULTATI PRECEDENTI	4
SCOPO DEL LAVORO	5
MATERIALI E METODI	7
MATERIALI	7
ANIMALI	7
COMPOSIZIONE DELLE SOLUZIONI USATE PER L'ISOLAMENTO E IL TRATTAMENTO DEGLI EPATOCITI	7
ISOLAMENTO DEGLI EPATOCITI	8
PREPARAZIONE DEL MODELLO CELLULARE PER LA VALUTAZIONE DEL DANNO DA RIOSSIGENAZIONE DOPO CONSERVAZIONE A FREDDO NELLA SOLUZIONE WISCONSIN	9
ANALISI DELLO STATO DI FOSFORILAZIONE DI PKB/AKT E P38 MAPK	9
VALUTAZIONE DELLA MORTE CELLULARE	10
ANALISI DEI DATI	10
RISULTATI	11
MODELLO CELLULARE DI DANNO DA RIOSSIGENAZIONE DOPO CONSERVAZIONE NELLA SOLUZIONE UW	11
RUOLO DI PI3K NEL POSTCONDIZIONAMENTO DEGLI EPATOCITI	11
RUOLO DI P38 MAPK NEL POSTCONDIZIONAMENTO DEGLI EPATOCITI	13
EFFETTI DEL POSTCONDIZIONAMENTO CON CGS21680 SULLA VITALITA'	15
DISCUSSIONE	17
COMPETENZE ACQUISITE E ALTRE LINEE DI RICERCA	19
BIBLIOGRAFIA	20
PUBBLICAZIONI	22
CORSI FREQUENTATI	22
PARTECIPAZIONE A SEMINARI	22
CONGRESSI	25

INTRODUZIONE

L'esposizione di un tessuto ad uno stress non letale rende tale tessuto resistente al danno prodotto da un successivo stress letale: questo fenomeno è detto preconditionamento ed il fegato è uno dei numerosi organi in cui è stata dimostrata la possibilità di produrre un "fenotipo preconditionato"^{1,2}.

Il preconditionamento ischemico in particolare è la capacità di un organo di sviluppare tolleranza ad un prolungato periodo di ischemia, se precedentemente esposto a brevi episodi di ischemia e riperfusione^{3,4}.

Questo processo è stato negli ultimi anni oggetto di intense ricerche ed ha recentemente dimostrato la possibilità di applicazione clinica nella prevenzione del danno da ischemia riperfusione conseguente agli interventi di chirurgia epatica. Una breve interruzione dell'apporto ematico al fegato seguito da riperfusione (preconditionamento ischemico) prima degli interventi di resezione del fegato o di asportazione del fegato da trapianto, previene infatti efficacemente la necrosi epatica successiva alla resezione o al trapianto di fegato⁵⁻⁷.

Tale procedura chirurgica ha però la fondamentale limitazione di poter essere applicabile solo prima della produzione del danno.

Studi recenti sul cuore hanno descritto il fenomeno del postcondizionamento ischemico e sembrano aprire nuove prospettive: l'applicazione di episodi intermittenti di ischemia e riperfusione del miocardio nella fase successiva al periodo di ischemia prolungata conferisce infatti effetti cardioprotettivi simili a quelli del preconditionamento⁸⁻¹⁰.

La possibilità che i mediatori molecolari responsabili dell'induzione della resistenza al danno cellulare indotta dal preconditionamento epatico possano essere attivati non solo prima, ma anche dopo la produzione di un danno sarebbe di estrema importanza per potenziare e allargare l'applicabilità clinica del fenomeno. La capacità del postcondizionamento di riprodurre gli effetti del preconditionamento non è però stata ancora investigata nel fegato, così come sono sconosciuti la quasi totalità dei suoi mediatori sia nel tessuto epatico che extraepatico.

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.

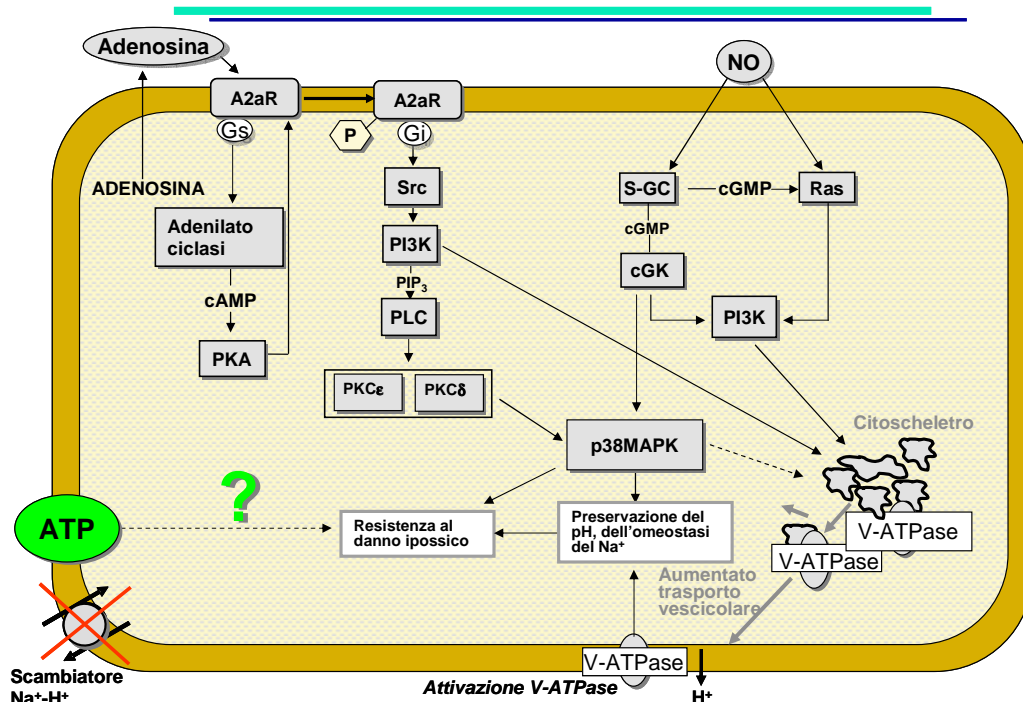
Utilizzando epatociti di ratto preconditionati con una breve ipossia / riossigenazione, è stato iniziato l'esame della complessa rete di mediatori intracellulari che sono coinvolti nella attivazione di questi meccanismi citoprotettivi. (Fig.1)

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^{2,11-13}.

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 che coinvolge le proteine G stimolatorie (Gs) e inibitorie (Gi), la fosfolipasi C (PLC), le specifiche isoforme δ ed ϵ della protein chinasi C (PKC) e la MAP chinasi p38 (p38 MAPK)^{13,14}.

La via di segnalamento che si attiva a partire dalle proteine Gi coinvolge inoltre la fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K), considerata un mediatore critico del preconditionamento epatico e il mediatore della sopravvivenza cellulare¹⁵. PI3K si attiva a seguito della congiunta stimolazione delle proteine Gi e della Src tirosino chinasi¹⁵ ed è successivamente coinvolta nella attivazione della PLC e della PKC².

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-ciclastasi (G-C) e la protein chinasi dipendente dal cGMP (cGK)^{11,16}. Entrambe queste vie concorrono alla successiva attivazione di PI3K mentre solo la via G-C/cGK porta alla stimolazione della p38 MAPK^{11,16}.



Hepatology 2000, 2001; Gastroenterology 2004; J Cell Sci. 2004; FRBM 2001, 2003, 2006; J. Hepatology 2006

Fig.1 - Induttori del preconditionamento degli epatociti e meccanismi molecolari coinvolti.

SCOPO DEL LAVORO

A partire da questi risultati e dall'esperienza acquisita in precedenza dal nostro laboratorio, le linee di ricerca che mi propongo di seguire in questi tre anni di Dottorato prevedono i seguenti obiettivi:

- Verificare la produzione degli effetti citoprotettivi del postcondizionamento epatico, sviluppando un modello cellulare di postcondizionamento per poter valutare la capacità di agonisti dei recettori A2a dell'adenosina (CGS21680) o di donatori di NO (NOC-9) di proteggere dal danno ipossico se somministrati successivamente all'inizio dell'ipossia.
- Valutare la capacità del pre- e postcondizionamento di prevenire il danno cellulare epatico indotto da agenti eziologici diversi. Per una più larga applicabilità clinica sarebbe di grande interesse la dimostrazione che gli epatociti pre-, ma soprattutto post-

condizionati siano resistenti non solo all'esposizione all'ipossia acuta, ma anche ad altri tipi di danno responsabili della necrosi epatica "in vivo" come l' intossicazione da xenobiotici, le reazioni immuni indotte da virus e il danno post ischemico. Questa parte del progetto esaminerà la capacità del pre- e del postcondizionamento di bloccare la produzione del danno epatocitario prodotto da:

- Riossigenazione dopo conservazione a freddo nella soluzione Wisconsin come modello di danno post-ischemico successivo alla conservazione dell'organo da trapianto
 - tetracloruro di carbonio, paracetamolo e menadione come modelli di intossicazione da xenobiotici
 - FasL come modello di reazioni immuni citotossiche
- Approfondire le conoscenze sui mediatori del preconditionamento e verificare l'eventuale coinvolgimento dei mediatori del preconditionamento nel produrre anche gli effetti protettivi del postcondizionamento nei diversi modelli di danno cellulare epatico. A tal fine sarà esaminata l'attivazione a seguito del postcondizionamento dei mediatori precedentemente dimostrati essere implicati nel preconditionamento degli epatociti e sarà valutato l'effetto della loro inibizione genica o farmacologica sulla citoprotezione eventualmente indotta dal postcondizionamento.

In questo primo anno di Dottorato mi sono principalmente dedicata a:

- impostare un modello cellulare di postcondizionamento epatico utilizzando epatociti isolati di ratto trattati con l'agonista dei recettori A2a dell'adenosina (CGS21680) nelle prime fasi della riossigenazione dopo conservazione a freddo nella soluzione Wisconsin, normalmente utilizzata per la conservazione degli organi da trapianto.
- iniziare la verifica dell'eventuale coinvolgimento dei mediatori del preconditionamento nel produrre anche gli effetti protettivi del postcondizionamento, concentrando le ricerche sull'interessamento di PI3K (indicato dall'attivazione di PKB/Akt) e p38 MAPK.
- verificare l'eventuale effetto citoprotettivo indotto dal postcondizionamento con CGS21680 sul modello di danno cellulare da ipossia / riossigenazione messo a punto mediante una analisi "time course" della vitalità degli epatociti a partire dall'inizio della riossigenazione, valutando il coinvolgimento di PI3K e p38 MAPK mediante l'uso di specifici inibitori farmacologici.

MATERIALI E METODI

MATERIALI

Le sostanze chimiche utilizzate sono state ottenute dalle seguenti ditte: la collagenasi (tipo I), l'HEPES, l'insulina, il desametasone, la wortmannina, l'SB203580, il terreno DMEM D5671 dalla Sigma (St.Louis, MO, USA); la soluzione ViaSpan dalla Bristol-Myers Squibb S.L. (Madrid, Spagna); gli anticorpi anti-Akt e anti-fosfo Akt, anti-p38 e anti-fosfo p38 MAPK dalla Cell Signalling Technology (Danvers, MA, USA); il Percoll dalla GE Healthcare BioSciences (Uppsala, Svezia); l'ECL dalla Perkin Elmer (Boston, MA, USA); tutti gli altri reagenti dalla Merck (Darmstadt, Germania).

ANIMALI

Sono stati usati ratti maschi di ceppo Wistar, con peso corporeo di 200-350 g (Harlan Italy, S. Pietro al Natisone, Italia).

I ratti sono stati alimentati con una dieta semisintetica con libero accesso all'acqua.

COMPOSIZIONE DELLE SOLUZIONI USATE PER L'ISOLAMENTO E IL TRATTAMENTO DEGLI EPATOCITI

- La soluzione tampone T₁ contiene: NaCl 143 mM, KCl 7 mM ed Hepes 10 mM (pH 7,4 con NaOH) .
- La soluzione tampone T₂ contiene: NaCl 100mM, KCl 40 mM, CaCl₂ 5 mM, la collagenasi di tipo 1 Sigma 0.05%, tampone Hepes-NaOH 50 mM (pH 7,4).
- La soluzione tampone Krebs-Henseleit-HEPES (KHH) contiene: NaCl 118 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.3 mM, NaHCO₃ 25 mM, Hepes 20 mM (pH 7.4 con NaOH) .
- La soluzione ViaSpan contiene in 1 litro: poli (o-2-idrossietil) amido (50,0 g/l) 0,40-0,50 MS1) (Pentafrazione*), acido lattobionico (come lattone) (35,83 g/l) 105 mmol/l; potassio idrossido 56% (14,5 g/l) 100 mmol/l; sodio idrossido 40% (3,679 g/l) 27 mmol/l; adenosina (1,34 g/l) 5 mmol/l; allopurinolo (0,136 g/l) 1 mmol/l; potassio

fosfato monobasico (3,4 g/l) 25 mmol/l; magnesio solfato x 7H₂O (1,23 g/l) 5 mmol/l; raffinoso x 5H₂O (17,83 g/l) 30 mmol/l; glutatione (0,922 g/l) 3 mmol/l 1) MS = moli di gruppi idrossietilici per moli di unita' anidroglicosidiche. La soluzione ha un'osmolalita' pari a circa 320 mosmol/kg, concentrazione finale di ioni sodio: 29 mEq/l, concentrazione di ioni potassio: 125 mEq/l e pH = 7,4 a temperatura ambiente.

- La soluzione Belzer University of Wisconsin (UW) è composta dalla soluzione ViaSpan addizionata di insulina rapida (40U/l) e desametasone (16mg/l).
- L'SDS Sample buffer contiene: Tris HCl pH 6.8 0.25 M, SDS 10%, glicerolo 100%, DTT 0,3 M, Blu di bromofenolo 0,02%.

ISOLAMENTO DEGLI EPATOCITI

Le cellule epatiche sono state isolate utilizzando la tecnica della perfusione “in situ” del fegato con collagenasi secondo il metodo Berry e Friend modificato¹⁷.

I ratti sono stati anestetizzati iniettando intraperitonealmente una soluzione di pentotal sodico (50 mg/Kg di peso corporeo) alla quale è stata aggiunta eparina (37 mg/Kg di peso corporeo). Agli animali è stata aperta la cavità addominale ed è stata incannulata la vena porta. Il fegato è stato perfuso per 5 min con il tampone salino T₁ mantenuto a 37° C, con un flusso costante di 7.4 unità di pressione, grazie all'utilizzazione di una pompa peristaltica.

Dopo questa prima fase di lavaggio, l'organo è stato perfuso con 200 ml di tampone salino T₂ contenente la collagenasi, anch'esso mantenuto a 37° C e iniettato ad un flusso costante di 3.4 unità di pressione.

Il fegato così digerito, è stato rimosso dall'animale e risospeso in 50 ml di terreno Dulbecco's Modified Medium Eagle (DMEM D5671), filtrato attraverso Dacron (con pori di 200 µm), sottoposto a 3 centrifugate da 500 rpm per 5' per separare gli epatociti dalle cellule non parenchimali, frazionato attraverso gradiente di Percoll per eliminare le cellule non vitali.

E' stato effettuato il conteggio delle cellule utilizzando una camera Burker (il numero di epatociti solitamente ottenuto è di circa 300-400 milioni per fegato perfuso) ed è stata valutata la vitalità cellulare con il test di esclusione al Trypan blue.

Gli epatociti ottenuti sono quindi stati risospesi in DMEM alla concentrazione di 10⁶/ ml.

PREPARAZIONE DEL MODELLO CELLULARE PER LA VALUTAZIONE DEL DANNO DA RIOSSIGENAZIONE DOPO CONSERVAZIONE A FREDDO NELLA SOLUZIONE WISCONSIN

Gli epatociti isolati sono stati centrifugati a 800 rpm per 2 min allo scopo di separarli dal terreno DMEM e risospesi nella soluzione Belzer University of Wisconsin (UW) per la conservazione a freddo degli organi^{18,19}, preparata aggiungendo insulina rapida (40U/l) e desametasone (16mg/l) alla soluzione Via Span alla temperatura di 4°C.

La soluzione UW contenente gli epatociti alla concentrazione di 10⁶/ml così ottenuta è stata posta in contenitore chiuso e successivamente flussato per 2 minuti con una miscela di 95% N₂ – 5% CO₂ per creare una condizione di ipossia, e quindi mantenuta a 4°C per 24 ore.

Dopo 24 ore gli epatociti sono stati riportati in ambiente normossico, risospesi nella soluzione tampone Krebs-Henseleit-HEPES (KHH) a pH 7,4 e a 25°C con densità cellulare finale di 10⁶/ml.

ANALISI DELLO STATO DI FOSFORILAZIONE DI PKB/AKT E P38 MAPK

Per analizzare lo stato di fosforilazione delle diverse chinasi sono state prelevate aliquote da 1ml di epatociti risospesi in Krebs al fine di ricavarne degli estratti cellulari totali. Ogni campione è stato immediatamente posto in ghiaccio e centrifugato a 1000 rpm per 2 minuti. Il pellet ottenuto è stato risospeso in SDS Sample buffer, sonicato e bollito.

Gli estratti cellulari sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di SDS poliacrilamide al 10% e successivamente ad analisi in Western Blot.

Le proteine sono state trasferite su membrane di nitrocellulosa usando il sistema di trasferimento a secco. Le membrane sono state saturate con BSA al 5% e incubate prima con anticorpi contro la forma fosforilata della chinasi, quindi strippate e incubate successivamente con anticorpi contro la forma non fosforilata. Le membrane sono state in seguito incubate con l'anticorpo secondario coniugato con l'enzima HRP (horseradish peroxidase) e le bande relative alle proteine di interesse sono state rivelate con il metodo Enhanced Chemi Luminescence (ECL) e l'utilizzo del rivelatore di immagini VersaDoc (Bio-Rad, Hercules CA, USA). I risultati sono stati espressi come rapporto della forma fosforilata rispetto alla forma totale mediante analisi con videodensitometro.

VALUTAZIONE DELLA MORTE CELLULARE

Il danno cellulare da riossigenazione dopo il mantenimento degli epatociti in condizione di ischemia fredda è stato valutato con conta al microscopio impiegando il test di esclusione al Trypan blue. Ad aliquote di sospensioni cellulari di 50 μ l sono stati aggiunti 50 μ l di Trypan blue allo 0.4%. Sono state considerate morte le cellule che assumono il colorante Trypan Blue e il numero è stato espresso come percentuale rispetto alle cellule totali.

ANALISI DEI DATI

I dati sono stati espressi come media \pm DS.

Tutti gli esperimenti sulla vitalità cellulare sono stati ripetuti almeno quattro volte.

RISULTATI

MODELLO CELLULARE DI DANNO DA RIOSSIGENAZIONE DOPO CONSERVAZIONE NELLA SOLUZIONE UW

Gli epatociti di ratto isolati risospesi in Krebs dopo conservazione per 24 ore in condizione di ipossia nella soluzione UW mostrano una vitalità iniziale media del 55%, quindi parzialmente ridotta rispetto alla vitalità osservata subito prima di porre gli epatociti nella soluzione UW (79%).

RUOLO DI PI3K NEL POSTCONDIZIONAMENTO DEGLI EPATOCITI

Per analizzare il coinvolgimento di PI3K nel postcondizionamento, gli epatociti risospesi in Krebs dopo 24 ore di conservazione a freddo nella soluzione UW sono stati posti in bagno termostatico a 37°C e suddivisi nelle seguenti condizioni sperimentali:

- 1 Controllo (non trattato)
- 2 CGS21680 1 μ M somministrato 15 minuti dopo la riossigenazione in KHH
- 3 Wortmannina 250 nM somministrata al momento della riossigenazione e seguita dopo 15 minuti dal CGS21680 come nel campione 2
- 4 Solo wortmannina 250 nM somministrata al momento della riossigenazione

Tutte le precedenti sostanze alle corrispondenti concentrazioni sono state utilizzate in quantità pari a 1 μ l/ ml di sospensione di epatociti.

A 30 minuti dalla riossigenazione sono state prelevate aliquote da ogni campione per ricavarne estratti cellulari totali da analizzare mediante western blotting.

E' stata utilizzata la fosforilazione in serina⁴⁷³ della proteina chinasi PKB/Akt, effettore della fosfatidil-inositolo 3 chinasi (PI3K), come marker del coinvolgimento di quest'ultima nel processo che conduce al postcondizionamento^{13,15}.

Il postcondizionamento con CGS21680 applicato al momento della riossigenazione di epatociti di ratto isolati conservati per 24 ore nella soluzione UW risulta associato ad un aumento della fosforilazione in serina di PKB/Akt in media del 32 %.

La presenza dell'inibitore di PI3K wortmannina abolisce completamente la fosforilazione di PKB/Akt. (Fig.2)

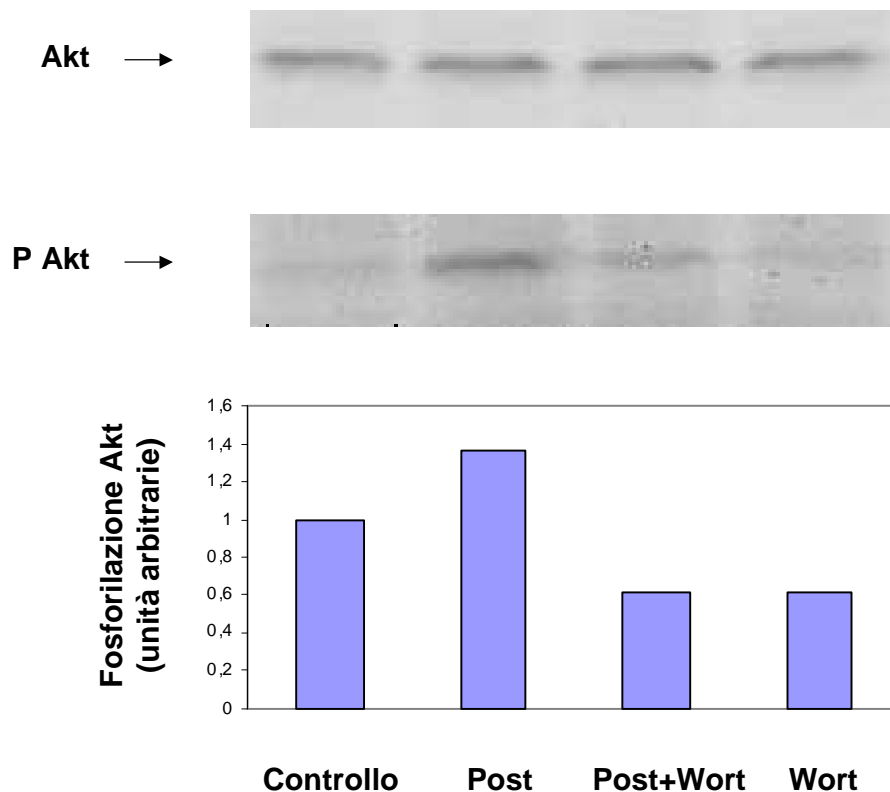


Fig.2 – Fosforilazione di Akt dopo riossigenazione di epatociti di ratto isolati sottoposti a postcondizionamento con l'agonista dei recettori A2a dell'adenosina CGS21680. Gli epatociti di ratto isolati, conservati per 24 ore in ipossia nella soluzione UW e risospesi nella soluzione KHH sono stati incubati per 15 minuti a 37 °C con wortmannina 250 nM prima della somministrazione di CGS21680 1 µM. Le condizioni sperimentali sono state le seguenti: **Controllo:** Epatociti non trattati; **Post:** Epatociti postcondizionati con CGS21680; **Post+Wort:** Epatociti postcondizionati pretrattati con wortmannina; **Wort:** Epatociti trattati con wortmannina. La fosforilazione di Akt è stata valutata mediante Western blotting usando anticorpi contro la forma fosforilata (Ser⁴⁷³) di Akt e contro Akt totale. L'intensità relativa delle bande fosforilate rispetto alle non fosforilate è stata misurata tramite videodensitometria ed è stato calcolato il rapporto tra la forma fosforilata (Ser⁴⁷³) e Akt totale. I risultati sono stati espressi come unità arbitrarie normalizzate a 1 per il campione Controllo. Un esperimento rappresentativo su 4.

RUOLO DI p38 MAPK NEL POSTCONDIZIONAMENTO DEGLI EPATOCITI

Per la valutazione dell'interessamento di p38MAPK, mediatore centrale della via del preconditionamento²⁰, ne è stata investigata la doppia fosforilazione (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²) in seguito a postcondizionamento con CGS21680 di epatociti esposti al danno da riossigenazione sopra descritto. Gli epatociti, conservati a 37°C in bagno termostatico, sono stati sottoposti ai seguenti trattamenti:

- 1 Controllo (non trattato)
- 2 CGS21680 1 µM somministrato 15 minuti dopo la riossigenazione in KHH
- 3 SB203580 10 µM somministrato al momento della riossigenazione ed eliminato dopo 5 minuti mediante centrifugazione e risospensione degli epatociti in terreno KHH fresco, seguito dopo 15 minuti dal CGS21680 come nel campione 2
- 4 Solo SB203580 10 µM somministrato al momento della riossigenazione ed eliminato dopo 5 minuti mediante centrifugazione e risospensione degli epatociti in terreno KHH fresco

Le precedenti sostanze alle corrispondenti concentrazioni sono state utilizzate in quantità pari a 1 µl/ ml di sospensione di epatociti.

Gli estratti cellulari analizzati sono stati prelevati a 60 minuti dalla riossigenazione.

Nel caso di p38 MAPK l'analisi in Western blotting non rivela alcun particolare effetto del postcondizionamento con CGS21680 sullo stato di fosforilazione. (Fig.3)

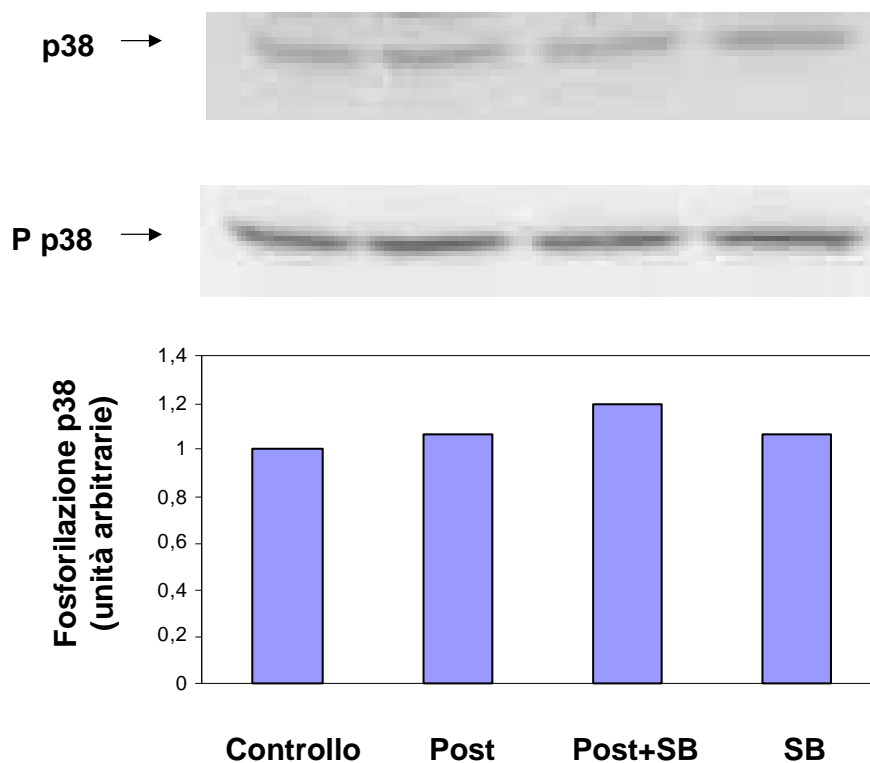


Fig.3 – Fosforilazione di p38MAPK dopo riossigenazione di epatociti di ratto isolati sottoposti a postcondizionamento con l’agonista dei recettori A2a dell’adenosina CGS21680. Gli epatociti di ratto isolati, conservati per 24 ore in ipossia nella soluzione UW e risospesi nella soluzione KHH sono stati incubati per 5 minuti a 37 °C con SB203580 10 μ M prima della somministrazione di CGS21680 1 μ M. Le condizioni sperimentali sono state le seguenti: **Controllo**: Epatociti non trattati; **Post**: Epatociti postcondizionati con CGS21680; **Post+SB**: Epatociti postcondizionati pretrattati con SB203580; **SB**: Epatociti trattati con SB203580. La fosforilazione di p38 MAPK è stata valutata mediante Western blotting usando anticorpi contro la doppia fosforilazione (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²) di p38 MAPK e contro p38 MAPK totale. L’intensità relativa delle bande fosforilate rispetto alle non fosforilate è stata misurata tramite videodensitometria ed è stato calcolato il rapporto tra la doppia fosforilazione di p38 MAPK e la p38MAPK totale. I risultati sono stati espressi come unità arbitrarie normalizzate a 1 per il campione Controllo. Un esperimento rappresentativo su 4.

EFFETTI DEL POSTCONDIZIONAMENTO CON CGS21680 SULLA VITALITA'

Gli epatociti conservati in condizioni ipossiche nella soluzione UW per 24 ore e riossigenati mediante risospensione nella soluzione KHH, sono stati suddivisi nelle seguenti condizioni sperimentali:

- 1 Controllo (non trattato)
- 2 CGS21680 1 μ M somministrato 15 minuti dopo la riossigenazione in KHH
- 3 Wortmannina 250 nM somministrata al momento della riossigenazione e seguita dopo 15 minuti dal CGS21680 come nel campione 2
- 4 Solo wortmannina 250 nM somministrata al momento della riossigenazione

Le precedenti sostanze alle corrispondenti concentrazioni sono state utilizzate in quantità pari a 1 μ l/ ml di sospensione di epatociti.

A 0, 30, 60, 90, 130 minuti dalla riossigenazione è stata determinata la vitalità dei diversi campioni con conta al microscopio impiegando il test di esclusione al Trypan blue.

Il trattamento postcondizionante con CGS21680 riduce significativamente la morte cellulare conseguente a riossigenazione e risospensione nella soluzione KHH rispetto al controllo non trattato. La differenza di vitalità che inizia ad evidenziarsi a 30 minuti, diventa significativa dopo 60 minuti dalla riossigenazione. Dopo 2 ore il 40% circa degli epatociti postcondizionati risulta ancora vitale, mentre nel controllo la vitalità è ridotta intorno al 20%.

Visto il coinvolgimento di PI3K nel postcondizionamento è stata inoltre investigata la vitalità in campioni trattati con wortmannina, seguiti o meno dal CGS21680.

Nei campioni in cui il trattamento postcondizionante è preceduto dal trattamento con l'inibitore di PI3K wortmannina si ottiene una riduzione di vitalità simile al controllo.

Il trattamento dei campioni con sola wortmannina induce una riduzione di vitalità non inferiore a quella osservabile nei controlli. (Fig.4)

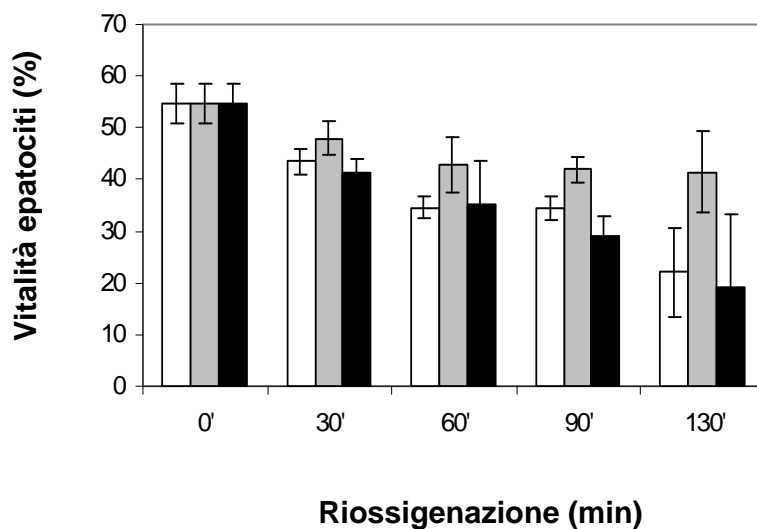


Fig.4 – Valutazione del danno cellulare da riossigenazione di epatociti di ratto isolati sottoposti o meno a postcondizionamento con l'agonista dei recettori A2a dell'adenosina CGS21680. Gli epatociti di ratto isolati, conservati per 24 ore in ipossia nella soluzione UW e risospesi nella soluzione KHH sono stati incubati per 15 minuti a 37 °C con wortmannina 250 nM prima della somministrazione di CGS21680 1 μ M. Le condizioni sperimentali sono state le seguenti: (□): controllo; (▨): epatociti postcondizionati con CGS21680; (■) epatociti pretrattati con wortmannina e postcondizionati con CGS21680. La vitalità degli epatociti è stata valutata mediante test di esclusione al Trypan blue a 0, 30, 60, 90, 130 minuti dalla riossigenazione. I risultati sono espressi come media \pm DS di 4 diversi esperimenti.

DISCUSSIONE

La dimostrazione del fenomeno del postcondizionamento nel fegato offre la possibilità di indurre gli effetti protettivi del preconditionamento a danno epatico già avvenuto, prospettando nuove applicazioni terapeutiche.

L'analisi degli induttori e dei mediatori del postcondizionamento e dei meccanismi d'azione coinvolti potrebbe essere il primo passo verso l'individuazione di un agente farmacologico^{21,22,23} in grado di innescare tale processo, con potenziali applicazioni cliniche in situazioni in cui il danno è già in atto o il preconditionamento chirurgico mediante clamping non è eseguibile. Oltre a quello da ischemia / riperfusione altri tipi di danno epatico, quali le intossicazioni da farmaci e xenobiotici o le reazioni immuni indotte da virus, in cui il fegato va incontro a necrosi acuta⁷, potrebbero infatti beneficiare di un trattamento farmacologico che inducesse una maggiore resistenza degli epatociti anche dopo l'insorgenza della sintomatologia.

Poiché gli esperimenti effettuati sulla vitalità degli epatociti esposti al modello cellulare di danno da ipossia / riossigenazione messo a punto mostrano l'effetto benefico del CGS21680 anche se applicato nelle prime fasi della riossigenazione dopo la conservazione del fegato in ischemia fredda, è ragionevole ipotizzare l'attivazione di un meccanismo endogeno di epatoprotezione classificabile come postcondizionamento epatico.

Si è voluto quindi verificare se il CGS21680, somministrato a danno epatocitario già avvenuto, fosse in grado di attivare due fondamentali mediatori della via del preconditionamento: PI3K e p38MAPK^{8,9,13,24,25}. I dati ottenuti sulla vitalità cellulare confermano il coinvolgimento di PI3K nel postcondizionamento, in quanto lo specifico inibitore di PI3K wortmannina abolisce la citoprotezione indotta dal CGS21680. Anche l'aumento in seguito a postcondizionamento della fosforilazione in serina⁴⁷³ di PKB/Akt, effettore e marker di PI3K, ne conferma il ruolo.

Si può quindi affermare che come nel preconditionamento anche nel postcondizionamento sembrano avere un ruolo fondamentale i recettori dell'adenosina, specificamente attivati dal CGS21680, che attiveranno una serie di segnali ancora da investigare che conducono all'attivazione di PI3K^{25,26}.

La possibilità che pre- e postcondizionamento possano avere gli stessi mediatori o condividere una stessa via di segnalamento lascia inoltre ipotizzare l'attivazione di meccanismi citoprotettivi simili. Nel preconditionamento PI3K induce l'attivazione e traslocazione nella plasmamembrana di un sistema alternativo di regolazione del pH: l'ATPasi vacuolare. Tale sistema protegge la cellula dall'acidosi ipossica e dal conseguente accumulo di Na⁺

responsabile della morte cellulare^{28,29}. Uno dei prossimi obiettivi sarà dunque verificare il coinvolgimento di questi meccanismi di protezione cellulare nel postcondizionamento.

Nel postcondizionamento degli epatociti con CGS21680 l'analisi della fosforilazione di p38MAPK, mediatore centrale del preconditionamento sia degli epatociti che del fegato in toto, non ha invece evidenziato un particolare ruolo per tale mediatore.

Anche nel postcondizionamento cardiaco il ruolo di p38MAPK è ancora controverso²⁴ e, al contrario del chiaro ruolo di Akt sia nel pre che nel postcondizionamento, per p38MAPK non è ancora certa l'azione giocata al momento della riperfusione. Uno studio del 2006 su cardiomiociti di ratto in coltura³⁰ attribuisce a p38MAPK un ruolo proapoptotico, mentre indica le chinasi Erk1/2 come modulatori della sopravvivenza cellulare dopo la riperfusione. Un altro studio sul cuore di coniglio isolato e perfuso riporta che l'inibizione con PD 98059 di Erk1/2 abolisce la riduzione della dimensione dell'infarto indotta dal postcondizionamento³¹.

L'analisi dello stato di fosforilazione delle chinasi Erk1/2 in seguito a postcondizionamento con CGS21680 sarà uno dei prossimi obiettivi che si vorranno verificare nel progetto, insieme al ruolo di altri mediatori classici del preconditionamento quali le proteine chinasi C δ e ϵ o il ruolo di nuovi potenziali mediatori del preconditionamento quali la fosfatasi PTEN³², che defosforila l'inositolo trifosfato antagonizzando l'effetto di PI3K, per poter definire con maggiore chiarezza la via di segnalamento che si attiva nel postcondizionamento. Si cercherà inoltre di testare il postcondizionamento su altri tipi di danno epatocitario allo scopo di estendere l'applicabilità clinica di tale fenomeno.

COMPETENZE ACQUISITE E ALTRE LINEE DI RICERCA

In questo primo anno di dottorato mi sono inizialmente dedicata all'acquisizione delle conoscenze e delle tecniche per lo svolgimento delle attività di ricerca del gruppo in cui sono inserita:

- Perfusione "in situ" del fegato di ratto con collagenasi
- Colture cellulari
- Western blotting
- Fluorimetria
- Citofluorimetria

Oltre alla linea di ricerca da me personalmente seguita, di cui ho descritto sopra i risultati, ho contribuito allo sviluppo di altri progetti nell'ambito del preconditionamento epatico:

1. Sviluppo di un modello di preconditionamento ritardato degli epatociti: attivazione della via di segnalamento coinvolgente i recettori A_{2a} dell'adenosina, il fattore inducibile dall'ipossia HIF-1, l'anidrasi carbonica IX quali eventi chiave nella prevenzione dell'acidosi ipossica e dell'associato accumulo di Na⁺ e nella induzione della tolleranza al danno ipossico.
2. Analisi dell'attivazione/aumentata espressione nel fegato preconditionato umano dei mediatori del preconditionamento identificati nei modelli sperimentali in correlazione con dati clinici e sierologici.
3. Studio delle vie di segnalamento attivate su fegati di ratto sottoposti a preconditionamento "in vivo" e trapiantati.
4. Ruolo della diacilglicerolo chinasi nello sviluppo del preconditionamento epatico.

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. Yoshizumi T et al. Amelioration of the liver injury by ischemic preconditioning. *Br. J. Surg.* 1998 ; 85 : 1636-1640.
4. 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.
5. Bedirli A et al. Effects of ischemic preconditioning on regenerative capacity of hepatocyte in the ischemically damaged rat livers. *J. Surg. Res.* 2005; 125: 42-8.
6. Franco-Gou R et al. Protection of reduced-size liver for transplantation. *Am. J. Transplant.* 2004; 4: 1408-20.
7. Rosser GB et al. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implication. *Gastroenterol.* 1995; 108:252-275.
8. 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.
9. Yellon DM, Hausenloy DJ. Realizing the clinical potential of ischemic preconditioning and postconditioning. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2005; 2: 568-75.
10. Zhao Z et al. Postconditioning: reduction of reperfusion–induced injury. *Cardiovasc. Res.* 2006; 70: 200-11.
11. Carini R et al. Signal pathway responsible for hepatocyte preconditioning by nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* 2003; 34:1047-1055.
12. 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.
13. Carini R et al.. Recent insides on the mechanisms of liver preconditioning *Gastroenterology* 2003; 125: 1480-1491.
14. Carini R. et al. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology*. 2001; 33: 131-139.
15. Carini R. et al. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in the development of hepatocyte preconditioning. *Gastroenterol.* 2004; 127: 914-23.

16. R. Carini et al. PI3K-dependent lysosome exocytosis in nitric oxide-preconditioned hepatocytes *Free Radical Biology and Medicine* 2006; 40: 1738-1748.
17. Seglen PO. Preparation of isolated liver rat cells. *Methods Cell Biol.* 1976; 13: 29-83.
18. Southard et al. Organ preservation. *Annual Review of Medicine* 1995; 46: 235-247
19. Straatsburg et al. Evaluation of rat liver apoptotic and necrotic cell death after cold storage using UW, HTK and Celsior. *Transplantation* 2002; 74(4): 458-464
20. Carini R et al. Stimulation of p38 MAP kinase reduces acidosis and Na⁺ overload in preconditioned hepatocytes. *FEBS Lett* 2001;491:180-183.
21. Carini R et al. Glycine protects against hepatocyte killing by KCN or hypoxia by preventing intracellular Na overload in the rat. *Hepatology* 1997; 26: 107-112.
22. Carini R et al. Mechanisms of hepatocyte protection against hypoxic injury by atrial natriuretic peptide. *Hepatology* 2003; 37:277-285.
23. Ito K et al. Doxorubicin preconditioning : A protection against rat hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 2000; 31: 416-419.
24. Hausenloy DJ, Yellon DM. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovascular Research* 2006; 70: 240-253.
25. Xi-Ming Yang et al. Postconditioning protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Basic Res Cardiol* 2005; 100: 57-63.
26. Carini R et al. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology* 2001; 33: 131-139.
27. R.Carini et al. Preconditioning-induced cytoprotection in hepatocytes requires Ca²⁺-dependent fusion of lysosomes with plasmamembrane. *JCell Sci.* 2004;117:1065-1077.
28. Carini R et al. Alterations of cell volume regulation in the development of hepatocyte necrosis. *Exp Cell Res* 1999; 248:280-29.
29. Carini R et al. Ischemic preconditioning reduces Na⁺ accumulation and cell killing in isolated rat hepatocytes exposed to hypoxia. *Hepatology* 2000; 31:166-172.
30. He-Ying Sun et al. Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Apoptosis* 2006; 11: 1583-1593.
31. Darling et al. Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of Erk 1/2. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 2005; 100: 57-63.
32. Oudit G et al. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2004; 37: 449-471.

PUBBLICAZIONI

E Alchera, L Tacchini, C Imarisio, C Dal Ponte, C De Ponti, E Gammella, G Cairo, E Albano, R Carini. **Adenosine-activated HIF-1 induces late preconditioning in hepatocytes by a novel survival mechanism.** In revisione per Gastroenterology

CORSI FREQUENTATI

- Corso di Inglese scientifico
- Corso di Statistica medica per Dottorati di ricerca e Scuole di specializzazione

PARTECIPAZIONE A SEMINARI

19/10/2006

Stem cells in cardiac pathophysiology and treatment

Dr. Paolo Di Nardo, Dip. Medicina Interna, Università Tor Vergata di Roma

29/11/2006

Nuove frontiere dei biomateriali: applicazioni cliniche

Prof. Rolando Barbucci, Dipartimento di Chimica, Università di Siena

10/01/07

Gene Silencing by RNA interference (RNAi)

Prof.ssa Paola Defilippi, Centro di Biotecnologie Molecolari, Università di Torino

12/01/07

Autoantibodies in systemic sclerosis: from clinical subsets to pathogenetic functions

Prof. Carlo Chizzolini, Dip. of Internal Medicine, Geneva University Hospital

17/01/07

Detection of miRNA target genes through statistical analysis of DNA motifs in human-mouse 3'-UTR region

Prof. Michele Caselle, Università di Torino

01/02/07

New thoughts and alternative treatments in phenylketonuria including gene therapy

Dr. Beat Thoni, University of Zurich

22/02/07

Fragile X Syndrome from RNA metabolism impairment to spine dysmorphogenesis

Prof.ssa Claudia Bagni , Dipartimento di Biologia, Università Tor Vergata di Roma

09/03/07

Vita opere e miracoli dell'epatocita

Prof. Tripodi, Università La Sapienza di Roma

14/03/07

Protein microarrays development of new surfaces for improved sensitivity

Dr. Marina Cretich, Istituto di chimica del riconoscimento molecolare - IRCM CNR- Milano

16/03/07

Drosophila as a model for aging and cancer

Prof. Dirk Bohmann, Department of Biomedical Genetics, University of Rochester

16/03/07

Microarrays di tessuti: una strategia per identificare nuovi biomarcatori tumorali

Dr. Maria Capra, Istituto Firc Oncologia Molecolare – IFOM – Milano

29/03/07

Marcatori farmacogenomici nel Carcinoma Coloretale: Quali prospettive per una terapia personalizzata?

Prof. Enrico Mini, Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica "M. Aiazzi Mancini",
Università degli Studi di Firenze

16/05/07

Difetti genetici del pre-B Cell Receptor

Dr.ssa Ferrari, Università di Bologna

25/05/07

The regulation of hematopoietic stem cells by SMAD signalling

Prof. Stefan Karlsson, Università di Lund (Svezia)

28/05/2007

Translating basic science into therapeutic strategies for Shwachman Diamond syndrome

Prof. Steve Ellis, Università di Louisville (Kentucky)

04/06/07

Sindromi autoinfiammatorie

Prof. Martini, Univ. di Genova

14/06/07

La genesi dei Gliomi e i suoi risvolti prognostici e terapeutici

Prof. Davide Schiffer, Università di Torino

21/06/07

Bioinformatics tools for the analysis of UTRs and for the prediction of alternative spliced transcripts

Dott. Flavio Mignone, Università di Milano

CONGRESSI

Intendo partecipare al congresso:

“Molecular, cellular, physiological and pathogenic responses to hypoxia”.

15-20 Gennaio 2008, Fairmont Hotel Vancouver - Vancouver, British Columbia - Canada.

E' stato inviato l'abstract “Molecular mechanisms involved in the delayed resistance to hypoxic damage of preconditioned rat hepatocytes” Elisa Alchera, Lorenza Tacchini, Chiara Imarisio, Caterina Dal Ponte, Cristina De Ponti, Elena Gammella, Gaetano Cairo, Emanuele Albano and Rita Carini.

Caterina Dal Ponte