

Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro"



Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare

Ciclo XXII

Relazione 3° anno

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

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

SOMMARIO

INTRODUZIONE	4
Risultati precedenti.....	6
SCOPO DEL LAVORO	6
MATERIALI E METODI.....	7
Materiali.....	7
Isolamento degli epatociti.....	7
Conservazione e trattamento degli epatociti nel modello di danno da ipossia/riossigenazione	7
Trattamento degli epatociti nel modello di danno da CCl ₄	8
Trattamento degli epatociti nel modello di danno da menadione	8
Trattamento degli epatociti nel modello di danno da paracetamolo	8
Epatociti in sospensione.....	8
Epatociti in coltura.....	8
Determinazione della morte cellulare	9
Analisi dello stato di fosforilazione di PKB/Akt e del livello di espressione di PTEN	9
Composizione delle soluzioni usate per il trattamento degli epatociti.....	10
Analisi statistica dei dati	10
RISULTATI	11
Effetti del postcondizionamento con CGS21680 sulla vitalita' nei diversi modelli di danno epatico.....	11
□ Modello cellulare di danno da riossigenazione dopo conservazione nella soluzione UW	11
□ Modello cellulare di danno da CCl ₄	13
□ Modello cellulare di intossicazione da menadione.....	14
□ Modello cellulare di intossicazione da paracetamolo.....	15
Effetti del postcondizionamento con CGS21680 sullo stato di fosforilazione della chinasi PKB/Akt e sul livello di espressione della fosfatasi PTEN nel modello di danno da riossigenazione.....	17

Effetti dell'inibitore di PTEN bpV(HOpic) sulla vitalità nel modello di danno da riossigenazione.	19
Effetti dell'inibitore di PTEN bpV(HOpic) sullo stato di fosforilazione della chinasi PKB/Akt.....	20
Effetti del postcondizionamento con CGS21680 sull'apoptosi	21
□ Modello di danno da ipossia/riossigenazione	21
□ Modello di danno da paracetamolo.....	22
DISCUSSIONE	24
BIBLIOGRAFIA.....	27
ATTIVITA' FORMATIVA	31
Partecipazione a seminari	31
Inglese.....	33
CONGRESSI	34
Partecipazione a congressi	34
Comunicazioni a congressi	34
PUBBLICAZIONI	36
Articoli	36
Abstracts	36

INTRODUZIONE

Il preconditionamento ischemico epatico, ottenuto mediante una interruzione transitoria del flusso ematico applicata prima di un periodo di ischemia prolungato, conferisce protezione dal danno da ischemia/riperfusione (Murry, 1986; Yellon, 2000; Selzner, 2003). Questa procedura sta assumendo un'importanza sempre maggiore nel campo della chirurgia epatica e nel trapianto di fegato (Serracino-Inglott, 2001; Clavien, 2003; Banga, 2005; Varotti, 2005) e i meccanismi alla base di questo fenomeno sono stati studiati e caratterizzati sia in modelli in vivo (Peralta 1997, 1999; Yoshizumi 1998; Teoh 2002) che in vitro (Carini, 2001). I mediatori intracellulari del preconditionamento ischemico sono stati parzialmente chiariti e coinvolgono, tra gli altri, i recettori A2a dell'adenosina (A2aR) che attivano una cascata di segnali che include anche l'attivazione della fosfatidil-inositolo 3 chinasi (PI3K) e del suo effettore PKB/Akt (Carini, 2003; Carini, 2004). Tale effetto risulta associato con l'abbassamento dell'espressione epatica della fosfatasi PTEN (Cescon, 2009), nota per regolare negativamente l'attività di PI3K. PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted from Chromosome 10) blocca la trasduzione dei segnali PI3K dipendenti alle proteine chinasi a valle (tra cui PKB/Akt) mediante defosforilazione del fosfatidil-inositolo-trifosfato PI(3,4,5)P3 (Tanguney, 2007); è presente ubiquitariamente nelle cellule e il suo livello intracellulare riflette il suo grado di attività (Tanguney, 2007; Gericke, 2006).

Recentemente nel cuore è stato descritto un fenomeno nuovo, detto postcondizionamento ischemico, che consiste nella applicazione successiva di brevi cicli di ischemia durante il periodo di riperfusione che segue la fase di ischemia prolungata. Applicando questa procedura si ottiene una riduzione del danno miocardico da riperfusione e una riduzione dell'area infartuata simile a quella che si ottiene con il preconditionamento (Tsang, 2004; Yellon, 2005; Zhao, 2006).

Nuovi studi sul fegato hanno evidenziato come il postcondizionamento ischemico epatico, attraverso l'applicazione di brevi interruzioni consecutive del flusso sanguigno nella fase iniziale della riperfusione, migliori la funzionalità epatica post-trapianto nel ratto, ma i mediatori coinvolti in questo processo non sono ancora stati identificati (Wang KX, 2008; Wang N, 2009).

La possibilità che anche nel fegato i mediatori del preconditionamento siano attivabili non solo prima, ma anche dopo la produzione del danno sarebbe di estrema importanza dal punto di vista clinico, aprendo la possibilità di ottenere un intervento efficace anche quando l'insulto epatico è già in atto.

La stimolazione di segnali intracellulari in grado di attivare sistemi endogeni di epatoprotezione efficaci anche dopo la produzione di un danno potrebbe essere inoltre utile non solo nell'affrontare gli effetti dell'ischemia/riperfusione, ma anche nei confronti di insulti epatici ad eziologia diversa. In particolare in questo studio si è analizzata la

possibilità che il postcondizionamento con l'agonista dei recettori A2a dell'adenosina CGS21680 sia in grado di indurre protezione nei confronti del danno da esposizione al tetracloruro di carbonio (CCl₄), nella tossicità da menadione e nell'intossicazione da paracetamolo.

Il CCl₄ è un composto chimico responsabile di avvelenamenti acuti e cronici in campo sia domestico (contenuto negli smacchiatori) sia industriale (usato come solvente per il lavaggio a secco, come liquido di raffreddamento e negli estintori). A causa della dimostrata tossicità negli ultimi decenni il suo utilizzo è diminuito, ma continua ad essere utilizzato come sostanza modello per lo studio dei meccanismi d'azione di effetti epatotossici. Nel fegato il CCl₄ induce perossidazione lipidica attraverso un meccanismo che coinvolge il citocromo P450 e la catena respiratoria mitocondriale causando necrosi attraverso uno stress di tipo ossidativo e inducendo apoptosi (Weber, 2003; Iida, 2007).

Il menadione (2-metil-1,4-naftochinone) è un precursore delle vitamine K, è utilizzato come micronutriente nei mangimi per animali, ma a concentrazioni tossiche causa morte cellulare ossidativa mediante generazione di anione superossido (Czaja, 2003; Singh, 2007).

Il paracetamolo o acetaminofene è un principio farmacologico ampiamente usato come analgesico e antipiretico; è sicuro se usato a dosi terapeutiche, ma un'assunzione eccessiva è in grado di causare epatotossicità severa fino all'insufficienza epatica sia nell'uomo che nell'animale (Rumack, 2004). La tossicità ha origine dalla formazione di un metabolita reattivo che inizialmente causa deplezione del glutathione ridotto e quindi lega covalentemente le proteine cellulari (Jaeschke, 2005). Si causa quindi una disfunzione mitocondriale che porta alla formazione di specie reattive dell'ossigeno e al crollo del potenziale di membrana mitocondriale con conseguente necrosi oncotica degli epatociti (Jaeschke, 2005). Benchè la morte per necrosi sembri essere il meccanismo di danno principale, alcuni studi riportano anche un possibile ruolo di meccanismi di tipo apoptotico nel danno epatico da overdose di paracetamolo (Ferret, 2001; Macanas-Pirard, 2005; Vaquero, 2007).

Risultati precedenti

Nel corso del primo anno di dottorato ho iniziato a verificare la possibilità che i mediatori coinvolti nel preconditionamento epatico fossero attivati anche nel postcondizionamento. Per questo è stato impostato 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, utilizzata per la preservazione degli organi nei trapianti.

Gli esperimenti effettuati nei precedenti anni di dottorato hanno evidenziato che il trattamento postcondizionante con CGS21680 riduce significativamente la morte cellulare conseguente a riossigenazione rispetto al controllo non trattato. Gli effetti protettivi ottenuti mediante postcondizionamento con CGS21680 si associano ad un aumento della fosforilazione in Ser⁴⁷³ di PKB/Akt, effettore di PI3K e marker del coinvolgimento di quest'ultima nel processo che conduce al postcondizionamento. La presenza dell'inibitore di PI3K wortmannina abolisce completamente la fosforilazione di PKB/Akt e l'azione protettiva del postcondizionamento con CGS21680 sulla vitalità degli epatociti.

SCOPO DEL LAVORO

- Approfondire le conoscenze sui mediatori coinvolti nel postcondizionamento epatico nel danno da ipossia/riossigenazione dopo conservazione a freddo nella soluzione Wisconsin, esaminando l'effetto dell'inibizione farmacologica dei mediatori individuati sulla citoprotezione indotta dal postcondizionamento.
- Valutare la capacità del postcondizionamento di prevenire il danno cellulare epatico indotto da agenti diversi dall'ipossia/riossigenazione, ma responsabili "in vivo" di necrosi epatica, come avviene nell'intossicazione da agenti xenobiotici quali il tetracloruro di carbonio, il menadione e il paracetamolo.
- Analizzare l'eventuale citoprotezione da parte del postcondizionamento sull'induzione dell'apoptosi nel modello di danno da ipossia/riossigenazione e intossicazione da paracetamolo.

MATERIALI E METODI

Materiali

Le sostanze chimiche utilizzate sono state ottenute dalle seguenti ditte: la collagenasi (tipo IV), l'HEPES, l'insulina, il desametasone, la wortmannina, il paracetamolo, il menadione, il terreno DMEM D5671, il propidio ioduro, l'RNAsi, l' MTT dalla Sigma (St.Louis, MO, USA); il tetracloruro di carbonio dalla Riedel De-Haen (Hanover, Germania); il bpV (HOpic) dalla EMDbiosciences (Darmstadt, Germania); l'annesina V Fluos dalla Roche (Mannheim, Germania); la soluzione ViaSpan dalla Bristol-Myers Squibb S.L. (Garden City, NY); il Percoll dalla GE Healthcare BioSciences (Uppsala, Svezia); l'ECL dalla Perkin Elmer (Boston, MA, USA); tutti gli altri reagenti dalla Merck (Darmstadt, Germania).

Isolamento degli epatociti

Gli epatociti primari di ratto sono stati isolati mediante la tecnica di perfusione del fegato con collagenasi, utilizzando ratti maschi di ceppo Wistar di 180-250 gr di peso (Harlan, Italy), e sono stati purificati mediante successive centrifugazioni a 50g per 5 min seguite da un'ulteriore centrifugazione a 350 g attraverso uno strato di Percoll. La purezza cellulare è stata determinata secondo il metodo descritto da Benten et al. (Benten, 2005).

La vitalità cellulare all'inizio di ogni esperimento è risultata compresa tra l'82% e il 90%.

Conservazione e trattamento degli epatociti nel modello di danno da ipossia/riossigenazione

Gli epatociti isolati sospesi nel terreno di coltura DMEM sono stati risospesi nella soluzione University of Wisconsin (UW) preparata aggiungendo insulina (40 U/l) e desametasone (16mg/l) alla soluzione Via Span a 4°C. Gli epatociti risospesi nella soluzione UW a alla densità di 10^6 /ml sono stati conservati per 24h a 4°C in atmosfera ipossica (95% N₂ – 5% CO₂). Dopo 24h gli epatociti sono stati riossigenati nella soluzione tampone Krebs-Henseleit-HEPES (contenente 20 nmol/l HEPES) a pH 7.4 e a 25°C con densità cellulare finale di 10^6 /ml. Il postcondizionamento degli epatociti è stato effettuato all' inizio della riossigenazione aggiungendo alla soluzione il CGS21680 (2p-(2-carboxiethyl) phenyl-amino-5'-N-ethylcarboxyamido-adenosine); anche gli inibitori wortmannina e bpV-HOpic sono stati aggiunti all'inizio della riossigenazione.

Trattamento degli epatociti nel modello di danno da CCl₄

Gli epatociti isolati sospesi nel terreno di coltura DMEM sono stati risospesi nella soluzione tampone Krebs-Henseleit-HEPES. Il danno da CCl₄ è stato provocato conservando gli epatociti in fiasche da 50 ml chiuse, con un pozzetto centrale in cui sono stati posti 10 µl di CCl₄. In questo modo la concentrazione finale di CCl₄ nel mezzo di incubazione è approssimativamente 172 µM (Poli, 1979). Il postcondizionamento degli epatociti è stato effettuato dopo 15 minuti dall'inizio dell'esposizione al CCl₄ aggiungendo alla soluzione il CGS21680. L'inibitore di PI3K wortmannina è stato aggiunto all'inizio dell'esposizione al CCl₄.

Trattamento degli epatociti nel modello di danno da menadione

Gli epatociti isolati sospesi nel terreno di coltura DMEM sono stati risospesi nella soluzione tampone Krebs-Henseleit-HEPES. Il danno da menadione è stato provocato aggiungendo alla soluzione menadione 50 µM sciolto in DMSO. Il postcondizionamento degli epatociti è stato effettuato dopo 5 minuti dall'inizio dell'esposizione al menadione aggiungendo alla soluzione il CGS21680. L'inibitore di PI3K wortmannina è stato aggiunto all'inizio dell'esposizione al menadione.

Trattamento degli epatociti nel modello di danno da paracetamolo

Epatociti in sospensione.

Gli epatociti isolati sospesi nel terreno di coltura DMEM sono stati risospesi nella soluzione tampone Krebs-Henseleit-HEPES. Il danno da paracetamolo è stato provocato aggiungendo alla soluzione paracetamolo 50 µM sciolto in DMSO. Il postcondizionamento degli epatociti è stato effettuato 5 minuti dopo l'inizio dell'esposizione al paracetamolo aggiungendo alla soluzione il CGS21680. L'inibitore di PI3K wortmannina è stato aggiunto all'inizio dell'esposizione al paracetamolo.

Epatociti in coltura.

Gli epatociti isolati sospesi nel terreno di coltura DMEM sono stati piastrati su piastre da 6 cm di diametro ad una densità di 1.5×10^6 epatociti/piastra con terreno DMEM F-HAM addizionato con il 10% di siero bovino. Dopo 24 ore di crescita in terreno DMEM F-HAM addizionato con il 10% di siero bovino, insulina e desametasone, i trattamenti sono stati effettuati in semplice terreno DMEM F-HAM. Il danno da paracetamolo è stato provocato aggiungendo alla soluzione paracetamolo 60 mM sciolto in DMSO. Il postcondizionamento

degli epatociti è stato effettuato dopo 5 minuti dall'inizio dell'esposizione al paracetamolo aggiungendo alla soluzione il CGS21680. L'inibitore di PI3K wortmannina è stato aggiunto all'inizio dell'esposizione al paracetamolo.

Determinazione della morte cellulare

La morte cellulare è stata stimata al microscopio ottico con il metodo di esclusione al Trypan Blue.

Per l'analisi dell'apoptosi al citofluorimetro sono state utilizzate aliquote da 500.000 cellule. Le cellule sono state lavate con PBS e risospese in 95.5 µl di binding buffer contenente 10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ e con l'aggiunta di 2 µl di Annexina V Fluos e 2.5 µl di propidio ioduro (50 µg/ml); dopo 15 min di incubazione al buio le cellule sono state analizzate con un analizzatore FACScan (Becton-Dickinson, San Jose, CA) utilizzando il programma CellQuest. E' stata effettuata una compensazione della fluorescenza. Per ciascun campione sono stati analizzati 10.000 eventi.

La vitalità degli epatociti in coltura è stata valutata mediante test MTT (Sigma) come da indicazioni del fornitore.

L'apoptosi degli epatociti in coltura è stata valutata mediante analisi della frammentazione del DNA. Aliquote da 500.000 cellule sono state lavate con PBS e poi risospese in una soluzione di etanolo freddo al 70%. Successivamente le cellule sono state lavate con PBS ed il pellet è stato risospeso in 450 µl di PBS 1X con l'aggiunta di 50µl di RNase A e 10 µl di propidio ioduro (1mg/ml). Dopo 1 ora di incubazione il DNA cellulare è stato analizzato al FACScan.

Analisi dello stato di fosforilazione di PKB/Akt e del livello di espressione di PTEN

Per le analisi in western blotting 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%.

Le proteine sono state trasferite su membrane di nitrocellulosa e sono state rivelate utilizzando anticorpi specifici verso PKB/Akt (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) e PTEN (Santa Cruz Biotechnology).

Per l'analisi dello stato di fosforilazione di PKB/Akt le membrane di nitrocellulosa sono state saturate con latte al 5% ed incubate prima con anticorpi verso Ser⁴⁷³ fosfo-Akt (1:500) e dopo lo stripping con anticorpi anti-Akt (1:500); mentre per l'analisi del livello di espressione di PTEN, dopo aver effettuato la saturazione con latte al 5%, le membrane sono state incubate prima con anticorpi verso PTEN (1:1000) e quindi con l'anticorpo anti-actina (1:500) (Sigma, Saint Louis, MO, USA). Il legame di ciascun anticorpo primario è stato poi rivelato, dopo incubazione con l'anticorpo secondario coniugato con l'enzima HRP (horseradish peroxidase), mediante metodo Enhanced Chemi Luminescence (ECL) utilizzando il rivelatore di immagini VersaDoc (Bio-Rad laboratories Inc, Hercules, CA). Le immagini digitalizzate sono state analizzate con il software Quantity One 1-D ver. 4.5.0 (Bio-Rad laboratories Inc, Hercules, CA). Il risultato è stato espresso come rapporto tra la forma fosforilata e non fosforilata di PKB-Akt e come rapporto fra la quantità relativa di PTEN rispetto alla quantità relativa di actina.

Composizione delle soluzioni usate per il trattamento degli epatociti

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; raffinosa 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 unità 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%.

Analisi statistica dei dati

I dati sono stati espressi come media \pm DS.

Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno quattro volte.

RISULTATI

Effetti del postcondizionamento con CGS21680 sulla vitalità nei diversi modelli di danno epatico

- **Modello cellulare di danno da riossigenazione dopo conservazione nella soluzione UW**

Rispetto alle prove effettuate nel primo anno di dottorato, sono state attuate alcune modifiche al modello sperimentale di danno da ipossia/riossigenazione. In particolare gli epatociti sono stati postcondizionati con l'agonista dei recettori dell'adenosina CGS21680 sin dall'inizio della riossigenazione, inoltre il CGS21680 è stato utilizzato ad una concentrazione più elevata (5 μ M).

Come già evidenziato negli esperimenti effettuati in precedenza, 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 parzialmente ridotta rispetto alla vitalità degli epatociti appena isolati dal fegato (61% vs 85%)

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:

- Controllo (non trattato)
- CGS21680 5 μ M somministrato all'inizio della riossigenazione in KHH
- CGS 5 μ M + Wortmannina 500 nM somministrati al momento della riossigenazione.
- Wortmannina 500 nM somministrata al momento della riossigenazione

A 0, 30, 60, 90, 120 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 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 più importante 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%. Fig 1

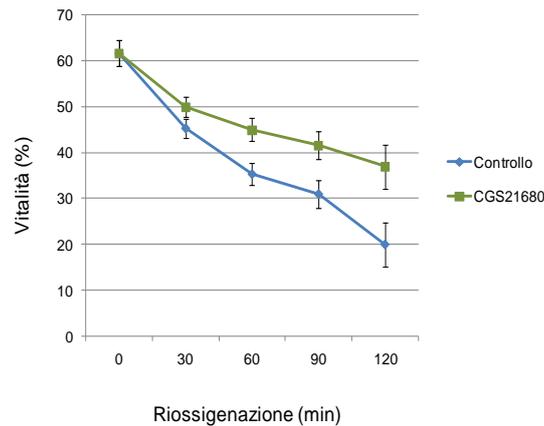


Fig. 1 Vitalità cellulare di epatociti di controllo e postcondizionati con CGS21680 durante la riossigenazione dopo conservazione in ischemia fredda nella soluzione UW.

Visto il coinvolgimento di PI3K nel postcondizionamento, evidenziato negli anni precedenti, 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 mostra un andamento della vitalità simile a quello osservabile nel controllo. Fig 2

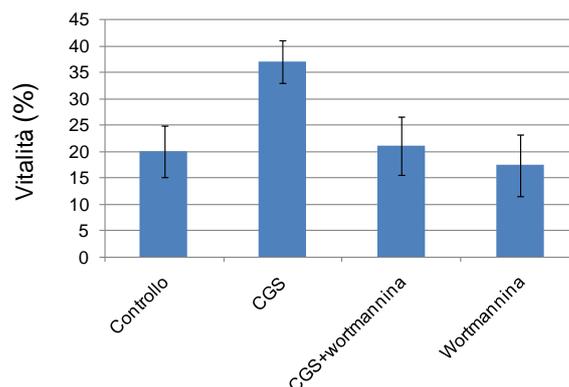


Fig 2 Effetto dell'inibizione di PI3K con wortmannina sulla citoprotezione da postcondizionamento farmacologico con CGS21680, misurato 120 minuti dopo l'inizio della riossigenazione.

- **Modello cellulare di danno da CCl₄**

Gli epatociti risospesi nella soluzione KHH, sono stati suddivisi nelle seguenti condizioni sperimentali:

- Controllo (non trattato)
- CCl₄ 172 μM
- CCl₄ μM + CGS21680 5 μM somministrato 15 minuti dopo il CCl₄.

A 30, 60, 90, 120 minuti dall' inizio dell'esperimento 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 la morte cellulare conseguente alla presenza di CCl₄. L'effetto protettivo del CGS21680 è evidente a 30 e 60 minuti, mentre gradualmente si riduce ai tempi successivi fino a scomparire a 120 minuti. Fig. 3

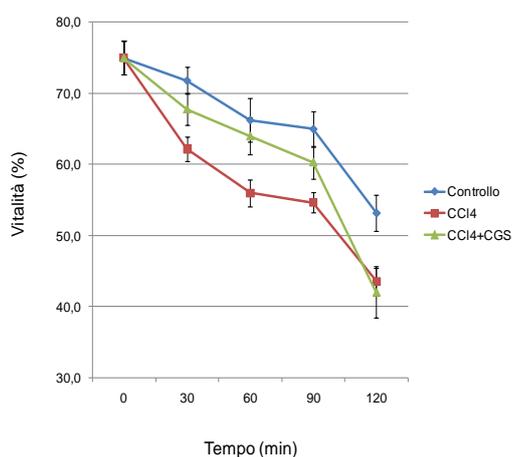


Fig. 3 Vitalità cellulare di epatociti di controllo e postcondizionati con CGS21680 nel modello cellulare di danno da CCl₄.

▪ **Modello cellulare di intossicazione da menadione**

Gli epatociti risospesi nella soluzione KHH, sono stati suddivisi nelle seguenti condizioni sperimentali:

- Controllo (non trattato)
- Menadione 50 μ M
- Menadione 50 μ M + CGS21680 5 μ M somministrato 5 minuti dopo il menadione.

A 30, 60, 90, 120 minuti dall'inizio dell'esperimento 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 la morte cellulare conseguente alla presenza di menadione nella soluzione KHH. L'effetto protettivo del CGS21680 è evidente a 30 e 60 minuti, mentre scompare ai tempi successivi (90 e 120 minuti). Fig. 4

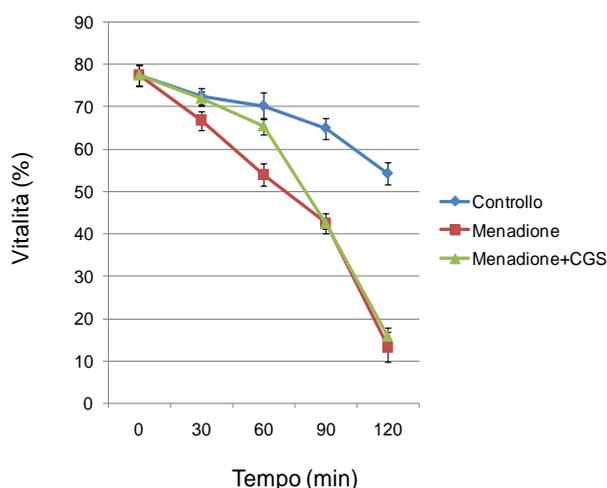


Fig. 4 Vitalità cellulare di epatociti di controllo e postcondizionati con CGS21680 nel modello cellulare di intossicazione da menadione.

▪ **Modello cellulare di intossicazione da paracetamolo**

Per la valutazione dell'efficacia del postcondizionamento con CGS21680 sulla protezione dalla morte cellulare causata dall'intossicazione da paracetamolo sono stati messi a punto due diversi modelli sperimentali:

• Epatociti in sospensione

Gli epatociti risospesi nella soluzione KHH, sono stati suddivisi nelle seguenti condizioni sperimentali:

- Controllo (non trattato)
- paracetamolo 50 mM
- paracetamolo 50 mM + CGS21680 5 μ M somministrato 5 minuti dopo il paracetamolo.

A 60,120, 180 minuti dall' inizio dell'esperimento 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 la morte cellulare conseguente alla presenza di paracetamolo nella soluzione KHH. L'effetto protettivo del CGS21680 inizia ad evidenziarsi dopo 60 minuti e perdura nel tempo. Fig. 5

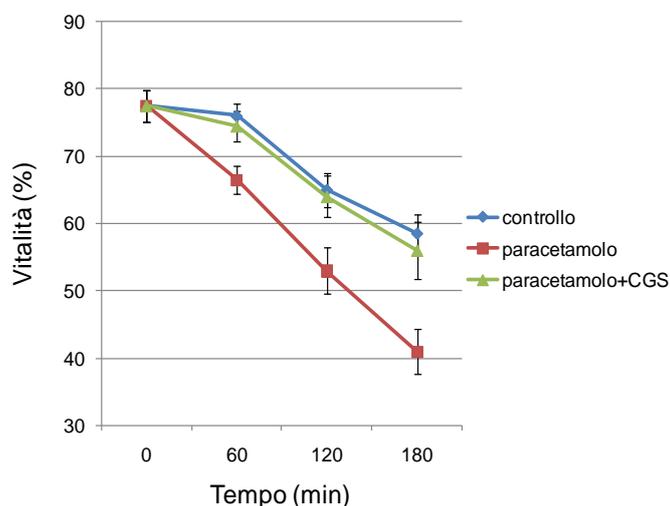


Fig. 5 *Vitalità cellulare di epatociti di controllo e postcondizionati con CGS21680 nel modello cellulare di intossicazione da paracetamolo in cellule in sospensione.*

- Epatociti in coltura

Gli epatociti in coltura sono stati suddivisi nelle seguenti condizioni sperimentali:

- Controllo (non trattato)
- paracetamolo 60 mM
- paracetamolo 60 mM + CGS21680 5 μ M somministrato 5 minuti dopo il paracetamolo
- CGS21680 5 μ M

A 16 ore dal trattamento con paracetamolo è stata valutata la vitalità degli epatociti mediante test MTT. Ponendo al 100% la vitalità degli epatociti di controllo, il trattamento con CGS21680 induce in media una protezione del 14% sulla morte cellulare da paracetamolo. Tab. 1

	Vitalità (%)
<i>Controllo</i>	100
<i>Paracetamolo</i>	61
<i>Paracetamolo+CGS</i>	82
<i>CGS</i>	97

Tab. 1 Vitalità cellulare di epatociti di controllo e postcondizionati nel modello cellulare di intossicazione da paracetamolo in cellule in coltura. Un esperimento rappresentativo su sei.

Effetti del postcondizionamento con CGS21680 sullo stato di fosforilazione della chinasi PKB/Akt e sul livello di espressione della fosfatasi PTEN nel modello di danno da riossigenazione.

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:

- Controllo (non trattato)
- CGS21680 5 µM somministrato all'inizio della riossigenazione in KHH
- Wortmannina 500 nM + CGS21680 somministrati all'inizio della riossigenazione in KHH
- Wortmannina 500 nM somministrata all'inizio della riossigenazione in KHH

Lo stato di fosforilazione di PKB/Akt ed il livello di espressione di PTEN sono stati analizzati mediante western blotting su aliquote prelevate da ogni campione a 15' dalla riossigenazione. 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.

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 35 %. Fig 6

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

Il postcondizionamento con CGS21680 inoltre induce una diminuzione dell'espressione di PTEN. Fig. 7

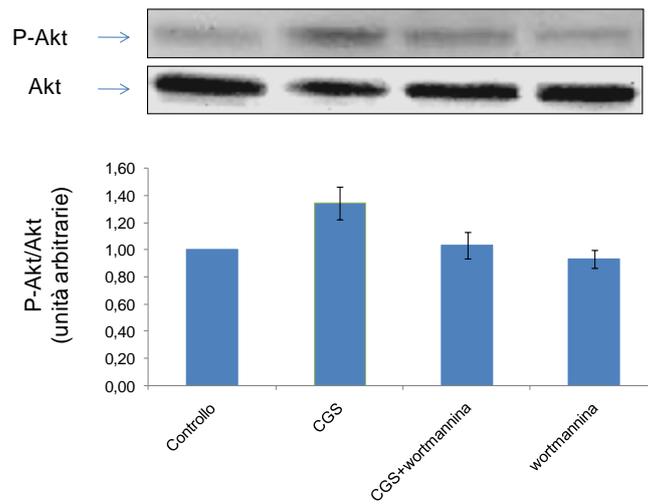


Fig. 6 Fosforilazione di PKB/Akt in epatociti postcondizionati con l'agonista dei recettori A2a dell'adenosina CGS21680 ed effetto dell'inibitore di PI3K wortmannina

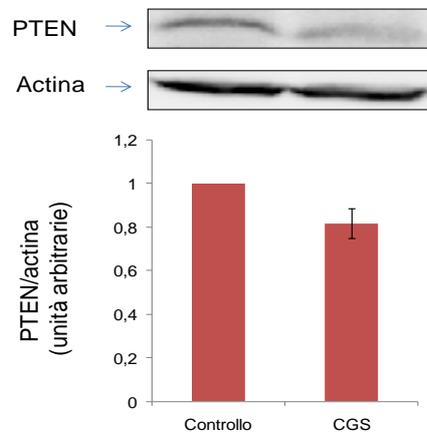


Fig. 7 Espressione della fosfatasi PTEN in epatociti postcondizionati con l'agonista dei recettori A2a dell'adenosina CGS21680

Effetti dell'inibitore di PTEN bpV(HOpic) sulla vitalità nel modello di danno da riossigenazione.

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:

- Controllo (non trattato)
- bpV(HOpic) 100 nM somministrato all'inizio della riossigenazione in KHH

A 30, 60, 90, 120 minuti dall' inizio dell'esperimento è stata determinata la vitalità dei diversi campioni con conta al microscopio impiegando il test di esclusione al Trypan blue. Il trattamento degli epatociti con l'inibitore bpV(HOpic) riduce la morte cellulare durante la riossigenazione rispetto al controllo non trattato. Fig. 8

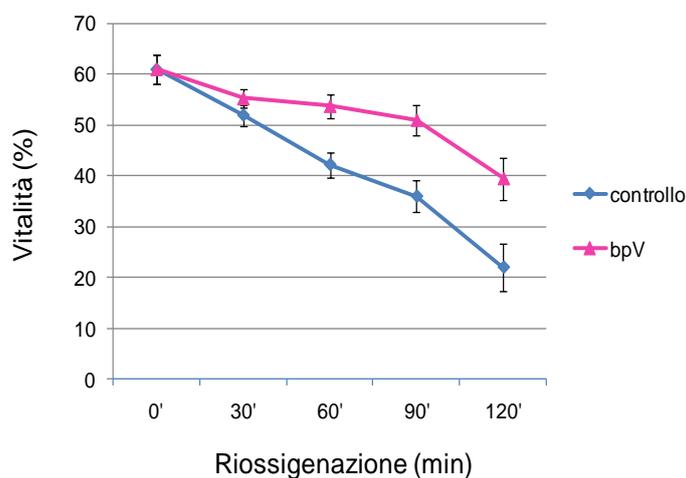


Fig. 8 Vitalità cellulare di epatociti di controllo e trattati con l'inibitore di PTEN bpV(HOpic) durante la riossigenazione dopo conservazione in ischemia fredda nella soluzione UW

Effetti dell'inibitore di PTEN bpV(HOpic) sullo stato di fosforilazione della chinasi PKB/Akt

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:

- Controllo (non trattato)
- bpV(HOpic) 100 nM somministrato all'inizio della riossigenazione in KHH

Lo stato di fosforilazione di PKB/Akt è stato analizzato mediante western blotting su aliquote prelevate da ogni campione a 15 min dalla riossigenazione.

Il trattamento con l'inibitore di PTEN bpV(HOpic) all'inizio della riossigenazione di epatociti di ratto isolati conservati per 24 ore nella soluzione UW aumenta la fosforilazione in serina di PKB/Akt. Fig 9

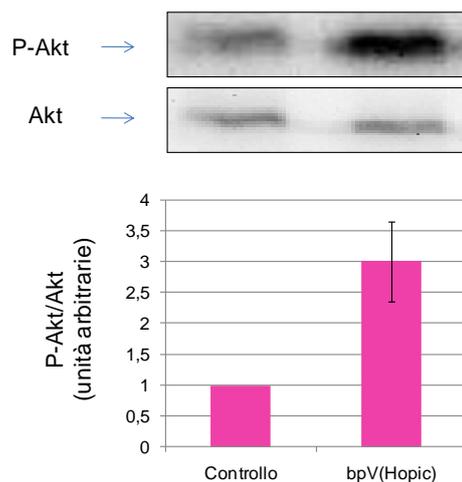


Fig. 9 Fosforilazione di PKB/Akt in epatociti trattati con l'inibitore di PTEN bpV(HOpic)

Effetti del postcondizionamento con CGS21680 sull'apoptosi

- **Modello di danno da ipossia/riossigenazione**

La valutazione con citometria di flusso dell'apoptosi mediante marcatura con annessina V / propidio ioduro di epatociti trattati secondo il modello di danno da ipossia/riossigenazione ha evidenziato, 30 minuti dopo l'inizio della riossigenazione, che il trattamento con l'agonista dei recettori A2a dell'adenosina CGS21680 dimezza l'apoptosi degli epatociti (7.30 ± 1.64 SD) rispetto al controllo non trattato (13.94 ± 2.33 SD).

La presenza contemporanea dell'inibitore di PI3K wortmannina abolisce parzialmente la protezione indotta dal CGS21680 (9.46 ± 2.85 SD), ma non modifica il grado di apoptosi delle cellule di controllo. Fig 10

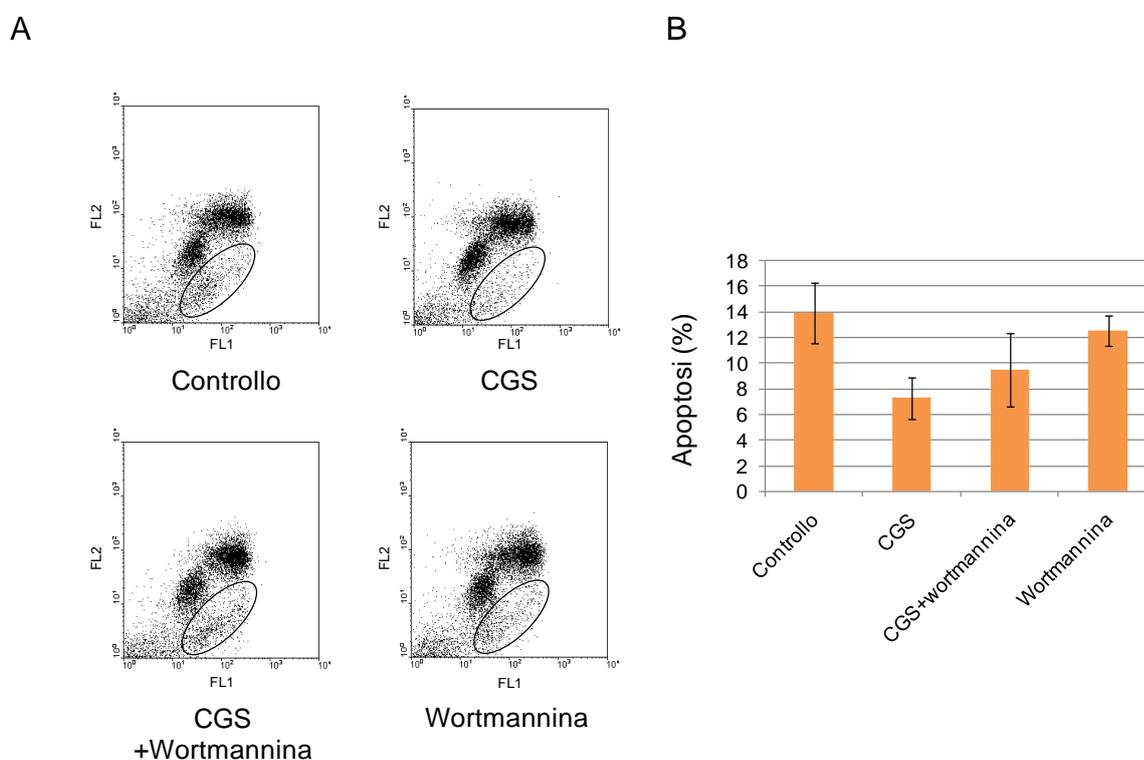


Fig. 10 Valutazione citofluorimetrica dell'apoptosi degli epatociti nel danno da ipossia/riossigenazione mediante marcatura con annessina V / propidio ioduro. A: un esperimento rappresentativo. B: valori medi

- **Modello di danno da paracetamolo**

Cellule in sospensione

La valutazione citofluorimetrica dell'apoptosi mediante marcatura con annessina V / propidio ioduro di epatociti trattati secondo il modello di danno da paracetamolo ha evidenziato, 120 minuti dopo il trattamento con paracetamolo, che le cellule postcondizionate mediante l'aggiunta dell'agonista dei recettori A2a dell'adenosina CGS21680 sono meno positive all'annexina V rispetto alle cellule non postcondizionate. Fig. 11

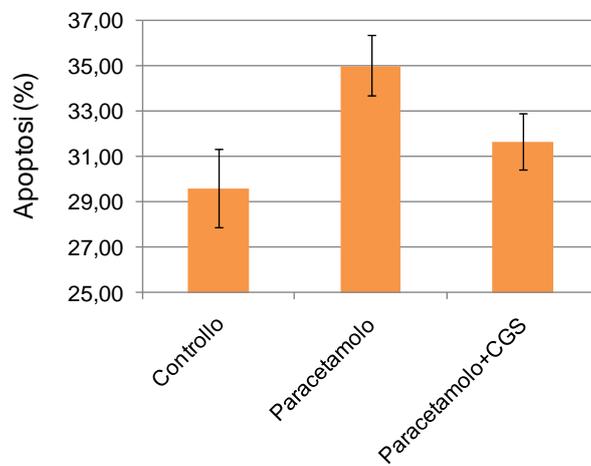


Fig. 11 Apoptosi in cellule di controllo e trattate con paracetamolo più o meno postcondizionamento con CGS21680, 120 minuti dopo il trattamento con paracetamolo.

Cellule in coltura

A 6 ore dal trattamento con paracetamolo è stata effettuata l'analisi citofluorimetrica della frammentazione del DNA con propidio ioduro di epatociti in coltura suddivisi nelle seguenti condizioni sperimentali:

- Controllo (non trattato)
- paracetamolo 60 mM
- paracetamolo 60 mM + CGS21680 5 μ M somministrato 5 minuti dopo il paracetamolo
- CGS21680 5 μ M

Il postcondizionamento con CGS21680 riduce la percentuale di frammentazione del DNA di epatociti sottoposti a intossicazione da paracetamolo. Fig. 12

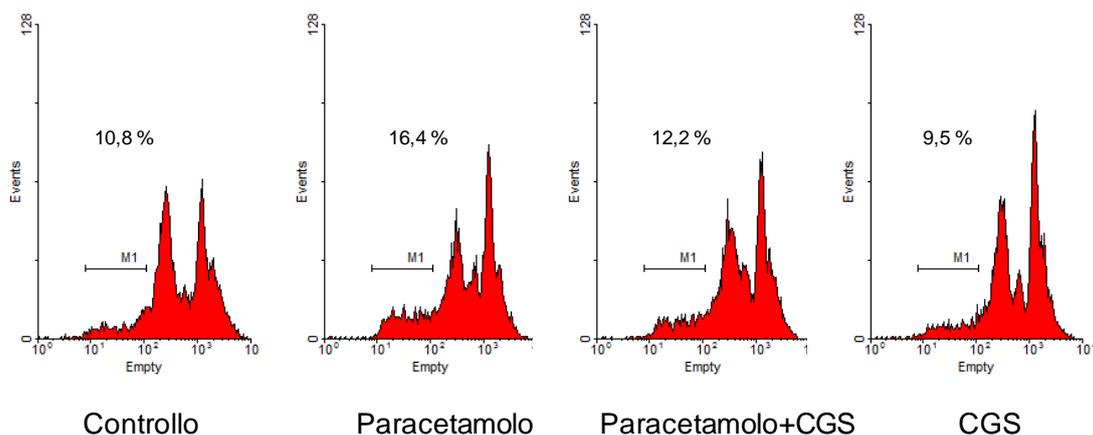


Fig.12 Percentuale di frammentazione del DNA di cellule di controllo e trattate con paracetamolo più o meno CGS21680. Un esperimento rappresentativo su quattro.

DISCUSSIONE

Studi effettuati in precedenza sui meccanismi alla base del preconditionamento ischemico del fegato hanno stabilito come questo fenomeno può essere indotto non solo mediante una breve ischemia transitoria applicata prima di un prolungato periodo ischemico (Peralta 1997, 1999; Yoshizumi 1998; Yellon, 2000), ma anche mediante la diretta stimolazione farmacologica dei recettori A2a dell'adenosina (Peralta 1997, 1999; Carini, 2003, 2004).

Utilizzando un modello sperimentale di danno da ipossia/riossigenazione che ha l'intento di riprodurre la fase di riossigenazione successiva al periodo di ischemia fredda a cui sono sottoposti gli organi nei trapianti, si è verificato come l'agonista dei recettori A2a dell'adenosina CGS21680 sia in grado di innescare i fenomeni protettivi del preconditionamento anche se aggiunto successivamente alla fase ipossica, all'inizio della riossigenazione. In parallelo con quanto descritto sul postcondizionamento ischemico nel cuore (Hausenloy, 2006, 2007), è ragionevole classificare questo meccanismo endogeno di epatoprotezione come postcondizionamento epatico.

I dati ottenuti sulla vitalità cellulare dimostrano 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 Ser⁴⁷³ di PKB/Akt, effettore e marker di PI3K, ne conferma il ruolo. L'attivazione di PI3K stimola diverse vie di segnalamento, molte mediante la chinasi a valle PKB/Akt, implicate nella crescita, nella sopravvivenza e migrazione cellulare (Cantley, 2002; Manning, 2002).

Il preconditionamento ischemico aumenta la fosforilazione di PKB/Akt non solo in modelli sperimentali (Carini, 2003; Izuishi, 2006), ma anche nel fegato umano durante la riperfusione (Cescon, 2009) e tale effetto è correlato con l'abbassamento dell'espressione epatica di PTEN (Cescon, 2009), regolatore negativo dell'attività di PI3K (Tanguney, 2007). Anche un recente studio sul miocardio ha mostrato una diminuzione sia del livello che dell'attività di PTEN in parallelo con l'attivazione di PKB/Akt in seguito a preconditionamento (Cai, 2005). Queste ricerche hanno indicato come il preconditionamento ischemico moduli sia regolatori positivi che negativi dei segnali PI3K dipendenti. Nel modello sperimentale di danno da ipossia/riossigenazione messo a punto l'espressione della fosfatasi PTEN risulta diminuita in seguito a trattamento con CGS21680. Sembra quindi che il postcondizionamento sia modulato anche attraverso il regolatore negativo PTEN.

L'inibitore chimico bpV(HOpic) fa parte di un compound di molecole derivate dal vanadato note per essere inibitori competitivi reversibili delle proteine tirosino-fosfatasi a concentrazioni elevate, mentre a concentrazioni di ordine nano molare sono efficaci inibitori specifici di PTEN (Schmid, 2004). Negli esperimenti effettuati il trattamento con

bpV(HOpic) all'inizio della riossigenazione protegge gli epatociti dalla morte cellulare rispetto al controllo non trattato. L'inibizione specifica di PTEN è confermata dall'aumento di fosforilazione di PKB/Akt, noto target a valle nella via di segnalamento PTEN dipendente (Stocker, 2002). L'insieme di questi dati individua nell'inibitore bpV(HOpic) un nuovo agente in grado di indurre il postcondizionamento farmacologico degli epatociti. L'importanza dell'inibizione farmacologica di PTEN è supportata da recenti studi sul ratto che hanno evidenziato come gli inibitori di PTEN prevengono il danno ischemico nel cervello (Lee, 2004; Wu, 2006). Inoltre in un recente lavoro Cai mostra che la cardioprotezione indotta da preconditionamento ischemico viene persa in topi knock-out per la subunità LMP-2 dell'immunoproteasoma, responsabile della degradazione di specifiche proteine tra cui la fosfatasi PTEN, e che il pretrattamento di questi topi knock-out con l'inibitore di PTEN bpV (HOpic) riduce la dimensione dell'area infartuata e migliora la funzionalità cardiaca (Cai, 2008).

L'attivazione di un meccanismo endogeno di epatoprotezione da parte del CGS21680 è risultata possibile anche nella simulazione di tipi danno diversi dall'ipossia/riossoigenazione, ma responsabili "in vivo" di necrosi epatica. In particolare si è osservato come il CGS21680 sia stato in grado di ridurre la mortalità quando somministrato nelle fasi iniziali del danno prodotto da intossicazione con CCl₄ e menadione, ritardando la morte delle cellule.

Il CGS21680 ha evidenziato inoltre di avere un'azione protettiva sul danno epatocitario causato dall'eccesso di paracetamolo, inducendo protezione in entrambi i modelli sperimentali testati. Tradizionalmente nell'avvelenamento acuto da paracetamolo viene utilizzato come antidoto l'N-acetilcisteina (Jones, 1998), essendo una fonte eccellente di gruppi sulfidrilici, avendo azione diretta di scavenger di radicali liberi (Gillissen, 1998) ed essendo un'importante precursore della sintesi cellulare del glutatione (Kelly, 1998). Il meccanismo d'azione del CGS21680 nella protezione sul danno da paracetamolo rimane ancora da chiarire e in futuro si vorrà verificare il possibile coinvolgimento del mediatore centrale del pre- e postcondizionamento ischemico epatico PI3K nel mediare tali effetti protettivi.

Nei modelli di danno da ipossia/riossoigenazione e da paracetamolo è stata inoltre valutata la presenza di apoptosi con tecniche citofluorimetriche, mediante marcatura con annessina V / propidio ioduro e mediante valutazione della frammentazione del DNA cellulare.

Nell'ipossia/riossoigenazione la quota di cellule rilevata in apoptosi è limitata, indicando che il danno causa principalmente morte per necrosi. Ciò nonostante il postcondizionamento con CGS21680 ha dimostrato di proteggere anche dalla morte cellulare programmata, e tale azione positiva è risultata legata all'attivazione di PI3K, come evidenziato dall'abolizione della protezione causata dalla presenza dell'inibitore wortmannina. E' noto che la chinasi PKB/Akt, risultata attivata nel postcondizionamento, è in grado di bloccare l'apoptosi interferendo con le funzioni di Bad, caspasi 9 e cFLIP (Brazil, 2002): uno dei

prossimi obiettivi sarà quindi verificare il coinvolgimento di questi mediatori nel postcondizionamento.

Anche nel modello sperimentale di danno da paracetamolo è stata evidenziata la presenza di apoptosi e il trattamento con CGS21680 è stato in grado di ridurre tale fenomeno.

Riassumendo si può concludere che la stimolazione farmacologica dei recettori A_{2a} dell'adenosina, mediante l'agonista CGS21680, è in grado di stimolare l'attivazione di un sistema endogeno di epatoprotezione efficace su diversi tipi di danno ed evocabile anche dopo l'instaurarsi di un insulto patogeno. I risultati ottenuti ampliano lo spettro di applicabilità clinica del postcondizionamento, che non si limiterebbe più all'ischemia/riperfusion, ma potrebbe essere utile se applicato in forma di trattamento farmacologico in casi di avvelenamento da sostanze xenobiotiche. Obiettivo per il futuro è l'approfondimento delle conoscenze sui mediatori coinvolti in questo fenomeno nei diversi tipi di danno epatico e la conferma dei risultati ottenuti in modelli "in vivo".

BIBLIOGRAFIA

- Banga RN, Homer-Vanniasikam S, Graham A, Al-Mukhtar A, White Sa, Prasad KR. Ischemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver. *Br J Surg* 2005; 92:528-538.
- Benten D, Follenzi A, Bhargava KK, Kuraman V, Palestro CJ, Gupta S. Hepatic targeting of transplanted liver sinusoidal endothelial cells in intact mice. *Hepatology* 2005;42:140-148.
- Brazil DP, Park J, Hemmings BA. PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell* 2002;111(3):293-303
- Cai ZP, Shen Z, Van Kaer L, Becker LC. Ischemic preconditioning-induced cardioprotection is lost in mice with immunoproteasome subunit low molecular mass polypeptide-2 deficiency. *FASEB Journal* 2008; 22: 4248-4257
- Cantley LC. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science* 2002; 296: 1655-1657
- Carini R, Albano E. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology* 2003;125:1480-91.
- Carini R, De Cesaris M, Splendore R, Vay D, Domenicotti C, Nitti MP, Paola D, Pronzato MA, Albano E. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology* 2001; 33: 131-139
- Carini R, Grazia De Cesaris M, Splendore R, Baldanzi G, Nitti MP, Alchera E, Filigheddu N, Domenicotti C, Pronzato MA, Graziani A, Albano E. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in the development of hepatocyte preconditioning. *Gastroenterology* 2004;127:914-923.
- Cescon M, Carini R, Grazi G, Caraceni P, Alchera E, Gasloli G, Ravaioli M, Tuci F, Imarisio C, Dal Ponte C, Pertosa AM, Bernardi M, Pinna AD, Albano E. Variable activation of phosphoinositide 3-kinase influences the response of liver grafts to ischemic preconditioning. *Journal of Hepatology* 2009; 50: 937–947
- Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W. A prospective randomized study in 100 patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003;238:843-850.
- Czaja MJ, Liu H, Wang Y. Oxidant-induced hepatocyte injury from menadione is regulated by ERK and AP-1 signaling. *Hepatology*. 2003 Jun;37(6):1405-13.

- Ferret PJ, Hammoud R, Tulliez M, et al. Detoxification of reactive oxygen species by a non peptidyl mimic of superoxide dismutase cures acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse. *Hepatology* 2001; 33: 1173-1180
- Gericke A, Munson M, Ross AH. Regulation of the PTEN phosphatase. *Gene* 2006;374:1-9.
- Gillissen A, Nowak D. Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy. *Respir Med.* 1998 Apr;92(4):609-23
- Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion. *Pharmacology and Therapeutics* 2007; 116: 173-191
- Hausenloy DJ, Yellon DM. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovascular Research* 2006; 70: 240-253
- Iida C, Fujii K, Kishioka T, Nagae R, Onishi Y, Ichi I, Kojo S. Activation of mitogen activated protein kinase (MAPK) during carbon tetrachloride intoxication in the rat liver. *Arch Toxicol.* 2007 Jul;81(7):489-93.
- Izuishi K, Tsung A, Hossain MA, Fujiwara M, Wakabayashi H, Masaki T, Billiar TR, Maeta H. Ischemic preconditioning of the murine liver protects through the Akt kinase pathway. *Hepatology.* 2006;44:573-580
- Jaeschke H, Bajt ML. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci.* 2006 Jan;89(1):31-41
- Jones AL. Mechanism of action and value of N-acetylcysteine in the treatment of early and late acetaminophen poisoning: a critical review. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1998;36(4):277-85
- Kelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev.* 1998 Apr;3(2):114-27
- Lee JH, Kim KY, Lee YK, Park SY, Kim CD, Lee WS, et al. Cilostazol prevents focal cerebral ischemic injury by enhancing casein kinase 2 phosphorylation and suppression of phosphatase tensin homologues deleted from chromosome 10 phosphorylation in rats. *J Pharm Exp Ther* 2004;308:896-903.
- Manning BD, Cantley LC. Akt/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007; 129: 1261-1274
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124.
- Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rossellò-Catafau J. 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.

- Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Bulbena O, Rosellò-Catafau J. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by the activation of adenosine A₂ receptors. *Hepatology* 1999; 29:126-132.
- Poli G, Gravela E, Albano E, Dianzani MU. Studies on fatty liver with isolated hepatocytes. II. The action of carbon tetrachloride on lipid peroxidation, protein, and triglyceride synthesis and secretion. *Exp. Mol. Pathol.* 1979; 30: 116-127
- Rumack BH. Acetaminophen misconceptions. *Hepatology.* 2004 Jul;40(1):10-5.
- Schmid AC, Byrne RD, Vilar R, Woscholski R. Bisperoxovanadium compounds are potent PTEN inhibitors. *FEBS Letters* 2004; 566: 35-38
- Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003; 125: 917.
- Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie R. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001;181:160-166.
- Singh R, Czaja MJ. Regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007 Jun;22 Suppl 1:S45-8
- Stocker H, Andjelkovic M, Oldham S, Laffargue M, Wymann MP, Hemmings BA, Hafen E. Living with lethal PIP3 levels: viability of flies lacking PTEN restored by a PH domain mutation in Akt/PKB. *Science* 2002;295: 2088-2091
- Tanguney T, Stokoe D. New insights into PTEN. *J Cell Sci* 2007;120:4071-4079.
- Teoh N, Dela Pena A, Farrel G. Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-κB, p38 kinase and cycle entry. *Hepatology* 2002; 36. 94.
- Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanau MM, Yellon DM. Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ. Res.* 2004;95:230-2.
- Vaquero J, Belanger M, James L et al. Mild hypothermia attenuates liver injury and improves survivals in mice with acetaminophen toxicity. *Gastroenterology* 2007; 132:372-383
- Varotti G, Grazi GL, Vetrone G, Ercolani G, Cescon M, Del Gaudio M, et al. Causes of early acute graft failure after liver transplantation: analysis of a 17-year single-centre experience. *Clin Transplant* 2005; 19: 492-500.
- Wang KX, Hu SY, Jiang XS, Zhu M, Jin B, Zhang GY, Chen B. Protective effects of ischaemic postconditioning on warm/cold ischaemic reperfusion injury in rat liver: a

comparative study with ischaemic preconditioning. *Chin Med J (Engl)*. 2008 Oct 20;121(20):2004-9.

- Wang N, Lu JG, He XL, Li N, Qiao Q, Yin JK, Ma QJ. Effects of ischemic postconditioning on reperfusion injury in rat liver grafts after orthotopic liver transplantation. *Hepatol Res*. 2009 Apr;39(4):382-90.
- Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*. 2003;33(2):105-36.
- Wu DN, Pei DS, Wang Q, Zhang GY. Down-regulation of PTEN by sodium orthovanadate inhibits ASK1 activation via PI3K/Akt during cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 2006;287:28258-28263
- Yellon DM, Dana A. The preconditioning phenomenon. A tool for the scientist or a clinical reality. *Circ. Res*. 2000; 87: 543-550.
- Yellon DM, Hausenloy DJ. Realizing the clinical potential of ischemic preconditioning and postconditioning. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med*. 2005; 2: 568-75.
- Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, Maeda T, Uchiyama H and Sugimachi K. Amelioration of the liver injury by ischemic preconditioning. *Br. J. Surg*. 1998 ; 85 : 1636-1640.
- Zhao Z, Vinten-Johansen J. Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury. *Cardiovasc. Res*. 2006; 70: 200-11.

ATTIVITA' FORMATIVA

Partecipazione a seminari

5 dicembre 2008, ***Production of bio-farmaceuticals in plants***, Luca Santi, Dipartimento di Biologia, Facoltà di Scienze, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata".

12 dicembre 2008 , ***Le cellule Mesenchimali Staminali per il trattamento delle malattie neurologiche***, Antonio Uccelli, Università degli Studi di Genova.

9 gennaio 2009, ***La malattia celiaca***, Riccardo Troncone, Università "Federico II" di Napoli

13 gennaio 2009, ***Porpora trombocitopenica autoimmune:nuovi orientamenti fisiopatologici e terapeutici***, Francesco Zaja, Università di Udine

27 gennaio 2009, ***Interazioni geni - ambiente nella eziologia della sclerosi multipla: studi sui gemelli***, Marco Salvetti, Università "La Sapienza" di Roma

10 febbraio 2009, ***Non solo motoneuroni: il contributo del muscolo scheletrico alla patogenesi della sclerosi laterale amiotrofica***, Antonio Musarò, Dipartimento di Istologia e Embriologia, Università "La Sapienza" di Roma

20 febbraio 2009, ***When a fine tuner of signaling pathways becomes a dangerous amplifier: the case of the Prolyl-isomerase Pin1 in cancer***, Giannino Del Sal, Università di Trieste, Laboratorio Nazionale CIB, Padriciano, Trieste

26 febbraio 2009, ***Il metabolismo degli endocannabinoidi e la sua rilevanza terapeutica***, Mauro Maccarrone, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Teramo

18 marzo 2009, ***La proteomica: un nuovo modo di guardare al mondo delle proteine***, Piero Pucci, Dipartimento di Biochimica Clinica e Organica, Università di Napoli Federico II

18 marzo 2009, ***Cellule staminali tumorali: implicazioni terapeutiche***, Giorgio Stassi
Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche, Università di Palermo

19 marzo 2009, ***Le nanotecnologie applicate alla medicina***, G. Peluso
Istituto di Biochimica delle proteine, CNR di Napoli

23 marzo 2009, ***Enzima P e il Social Network per l'Innovazione***, Salvatore Timpanaro,
Responsabile Scientifico del Social Network per l'Innovazione, Politecnico di Torino

23 marzo 2009, ***Tecnologie innovative in ergonomia, ginecologia, medicina del lavoro e dello sport***, Roberto Merletti, Responsabile del Laboratorio di Ingegneria del Sistema Neuromuscolare, Dipartimento di Elettronica del Politecnico di Torino

26 marzo 2009, ***Regulation of integrin functions in vascular systems***, Federico Bussolino, Department of Oncological Sciences, Università di Torino

9 aprile 2009, ***I bioreattori nella Medicina Rigenerativa: dalla ricerca alla realtà di una start-up***, Sara Mantero, Dipartimento di Bioingegneria, Politecnico di Milano

28 aprile 2009, ***Polycystin-1, the product of the PKD1 gene mutated in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD), is an orphan receptor regulating cell migration and polarity***, Anna Boletta, Dulbecco Telethon Institute, San Raffaele Scientific Institute, Milano

30 aprile 2009, ***Polarized inflammation in tumour development***, Antonio Sica,
Dipartimento di Scienze Chimiche, Alimentari, Farmaceutiche e Farmacologiche (DISCAF), Università del Piemonte Orientale

5 maggio 2009, **Effetti anti-steatogeni ed anti-tumorali degli agonisti del recettore dell'ormone tiroideo**, Amedeo Columbano, Dip. Tossicologia, Sezione Oncologia e Patologia Molecolare, Università di Cagliari

6 maggio 2009, **Integrated nanoparticle–biomolecule hybrid systems: design of stimuli-responsive nanomaterials for cancer diagnosis and therapy**, Barbara Palazzo, Department of Chemistry, University of Bologna.

12 maggio 2009, **Ipercolesterolemia e progressione di malattia in patologia umana**, Giuseppe Poli, Il Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Torino

12 maggio 2009, **Neurotossicità delle proteine 'misfolded' nelle malattie del motoneurone**, Angelo Poletti, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Milano

14 maggio 2009, **Tecniche di split liver nel trapianto di fegato adulto e pediatrico**, V. Corno, Divisione di Chirurgia Generale, Centro Trapianto di Fegato e Centro Trapianto di Polmone Ospedali Riuniti di Bergamo

14 maggio 2009, **Functional Genomics of Brain**, Stefano Gustincich, SISSA di Trieste Basovizza, Trieste ITALY

10 giugno 2009, **Marcatori molecolari nel carcinoma coloretale: dalla teoria alla pratica clinica**, Milo Frattini, Responsabile Laboratorio di Diagnostica Molecolare Istituto Cantonale di Patologia, Locarno (Svizzera)

Inglese

Partecipazione ai Journal Club per dottorandi

CONGRESSI

Partecipazione a congressi

Molecular, cellular, physiological and pathogenic responses to hypoxia. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. 15-20 gennaio 2008, Fairmont Hotel Vancouver, Vancouver, Canada.

43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. 23-27 aprile 2008, Milano, Italy.

The International Liver Congress 2009 - 44rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. 22-26 aprile 2009, Copenhagen, Danimarca.

Comunicazioni a congressi

Presentazione del poster ***Molecular mechanisms involved in the delayed resistance to hypoxic damage of preconditioned hepatocytes.*** Alchera E, Tacchini L, Imarisio C, Dal Ponte C, De Ponti C, Gammella E, Cairo G, Albano E, Carini R.

Molecular, cellular, physiological and pathogenic responses to hypoxia. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. 15-20 gennaio 2008, Fairmont Hotel Vancouver, Vancouver, Canada.

Presentazione del poster ***Stimulation of adenosine A2a receptors induces postconditioning in isolated hepatocytes.*** Dal Ponte C, Alchera E, Imarisio C, Albano E, Carini R.

43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. 23-27 aprile 2008, Milano, Italy.

Presentazione del poster ***Role of HIF-1 and carbonic anhydrase IX in the induction of the late protective effects of hepatocyte preconditioning.*** Alchera E, Tacchini L, Imarisio C, Dal Ponte C, De Ponti C, Gammella E, Cairo G, Albano E, Carini R.

43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. 23-27 aprile 2008, Milano, Italy.

Presentazione del poster ***Molecular mechanisms involved in hepatocarcinoma cells resistance to hypoxia: role of HIF-1 and of carbonic anhydrase IX.*** Alchera E, Dal Ponte C, Imarisio C, Tacchini L, Albano E and Carini R.

The International Liver Congress. 44rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. 22-26 aprile 2009, Copenhagen, Danimarca.

Presentazione del poster ***Down regulation of diacylglycerol kinase α activity mediates the cytoprotective effect of hepatic preconditioning.*** Baldanzi G, Alchera E, Imarisio C, Gaggianesi M, Dal Ponte C, Nitti P, Domenicotti P, Van Blitterswijk WJ, Albano E, Graziani A and Carini R.

The International Liver Congress. 44rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. 22-26 aprile 2009, Copenhagen, Danimarca.

Presentazione del poster ***The efficacy of ischemic preconditioning in protecting human transplanted liver from ischemia/reperfusion injury is associated to the activation of phosphoinositide-3kinase*** Cescon M, Carini R, Grazi G, Caraceni P, Alchera E, Gasloli G, Ravaioli M, Tuci F, Imarisio C, Dal Ponte C, Pertosa AM, Bernardi M, Pinna AD, Albano E.

The International Liver Congress. 44rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. 22-26 aprile 2009, Copenhagen, Danimarca.

PUBBLICAZIONI

Articoli

Alchera E, Tacchini L, Imarisio C, Dal Ponte C, De Ponti C, Gammella E, Cairo G, Albano E, Carini R. *Adenosine-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) induces late preconditioning in liver cells.* Hepatology 2008;48:230-239

Cescon M, Carini R, Grazi G, Caraceni P, Alchera E, Gasloli G, Ravaioli M, Tuci F, Imarisio C, Dal Ponte C, Pertosa AM, Bernardi M, Pinna AD, Albano E. *Variable activation of phosphoinositide 3-kinase influences the response of liver grafts to ischemic preconditioning.* Journal of Hepatology 2009; 50: 937–947

Abstracts

Alchera E, Tacchini L, Imarisio C, Dal Ponte C, De Ponti C, Gammella E, Cairo G, Albano E, Carini R. ***Molecular mechanisms involved in the delayed resistance to hypoxic damage of preconditioned hepatocytes.*** Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology-2008 Abstract Book, n° 144.

Dal Ponte C, Alchera E, Imarisio C, Albano E, Carini R. ***Stimulation of adenosine A2a receptors induces postconditioning in isolated hepatocytes.*** Journal of Hepatology, Supplement n. 2, Vol. 48, 2008, n° 150.

Alchera E, Tacchini L, Imarisio C, Dal Ponte C, De Ponti C, Gammella E, Cairo G, Albano E, Carini R. ***Role of HIF-1 and carbonic anhydrase IX in the induction of the late protective effects of hepatocyte preconditioning.*** Journal of Hepatology, Supplement n. 2, Vol. 48, 2008, n° 147.

Alchera E, Dal Ponte C, Imarisio C, Tacchini L, Albano E and Carini R. ***Molecular mechanisms involved in hepatocarcinoma cells resistance to hypoxia: role of HIF-1 and of carbonic anhydrase IX.*** Journal of Hepatology, Supplement n.1, Vol.50, 2009, n°503.

Baldanzi G, Alchera E, Imarisio C, Gaggianesi M, Dal Ponte C, Nitti P, Domenicotti P, Van Blitterswijk WJ, Albano E, Graziani A and Carini R. ***Down regulation of diacylglycerol kinase α activity mediates the cytoprotective effect of hepatic preconditioning.*** Journal of Hepatology, Supplement n.1, Vol.50, 2009, n°158.

Cescon M, Carini R, Grazi G, Caraceni P, Alchera E, Gasloli G, Ravaioli M, Tuci F, Imarisio C, Dal Ponte C, Pertosa AM, Bernardi M, Pinna AD, Albano E. ***The efficacy of ischemic preconditioning in protecting human transplanted liver from ischemia/reperfusion injury is associated to the activation of phosphoinositide-3kinase.*** Journal of Hepatology, Supplement n.1, Vol.50, 2009, n°153.