



Studi Preliminari per la coltura d'organo come modello per trattamenti antineoplastici

INTRODUZIONE

I processi ossidativi, legati alla presenza dei radicali liberi, sono coinvolti nella promozione e nello sviluppo del cancro.

La causa principale del meccanismo di stress ossidativo, sono i radicali liberi, cioè sostanze con elevata reattività chimica. Gli organismi viventi tendono a mantenere costante la concentrazione di questi agenti ossidanti, per poter garantire i normali processi biologici.

Lo stress ossidativo, danneggia le strutture della membrana cellulare, in particolare l'ATPasi sodio/potassio, detta pompa Na^+/K^+ . Si attua quindi, una depolarizzazione ed una sempre maggiore alterazione del meccanismo di trasporto attivo di questi due elettroliti, che hanno funzioni molto diverse, ma fondamentali nell'economia cellulare. Il potassio, regolatore principale dei processi metabolici intracellulari, attraverso la reazione reversibile, dei gruppi amminici ed imminici di enzimi e proteine, in ambiente lievemente acido, e l'altro, il sodio, regolatore principale della riserva alcalina dell'organismo, a livello extracellulare, con la reazione reversibile dei gruppi carbossilici di enzimi e proteine in ambiente lievemente basico. In tal modo, si verifica la modificazione dell'ambiente acido-base e delle reazioni di ossido-riduzione fra le molecole presenti nel citoplasma.

E' noto, che la cellula neoplastica è carente di potassio e ricca di sodio, con uno sbilanciamento nel rapporto, che cresce all'aumentare della degenerazione cellulare. Inoltre, per dividersi attivamente la cellula neoplastica, brucia elevate quantità di glucosio. A causa del sinporto della pompa $\text{Na}^+/\text{glucosio}$, si attua un rilevante trasporto di glucosio nel

citoplasma, con una velocità che aumenta con la sempre maggiore alterazione della pompa stessa.

La pompa sodio/potassio

Questa pompa si comporta da "antiporto", infatti, permette di trasportare contro gradiente di concentrazione tre ioni di Na^+ verso l'ambiente extracellulare e due ioni di K^+ verso l'ambiente intracellulare sfruttando l'energia derivante dall'idrolisi dell'adenosintrifosfato (ATP). All'inizio del processo di trasporto tre ioni di Na^+ vanno a legarsi ai siti specifici ad alta affinità della proteina veicolo rivolti verso l'interno della cellula. Questo legame stimola la fosforilazione dipendente dall'ATP della pompa determinando un cambio conformazionale della proteina veicolo, la quale esporrà i siti di legame per gli ioni Na^+ verso l'ambiente extracellulare, abbassando così la propria affinità per questi ioni cosicché essi vengano rilasciati al di fuori della cellula. Contemporaneamente alla fuoriuscita degli ioni Na^+ , due ioni K^+ vanno a legarsi ai siti specifici esposti verso l'ambiente extracellulare stimolando la defosforilazione della proteina, la quale tornerà al suo stato conformazionale di partenza e rilascerà questi ioni all'interno della cellula. Una volta completata l'operazione, la proteina sarà pronta a ripetere il ciclo. Questo processo contribuisce ad evitare che vengano dissipati i gradienti ionici che stanno alla base della differenza di potenziale esistente tra ambiente intracellulare ed ambiente extracellulare, pari a circa -70 mV . Tale differenza è detta potenziale di membrana.

La pompa sodio/glucosio

Il simporto Na^+ -glucosio è un cotrasportatore (SGLT), presente nella membrana plasmatica, che permette l'introduzione nella cellula di una molecola di glucosio e di due ioni di sodio. Il legame del sodio provoca una modificazione conformazionale che facilita il legame del glucosio e viceversa; poiché la concentrazione di Na^+ è molto più alta nello spazio extracellulare che nel citoplasma a causa della pompa sodio-potassio, il trasportatore riesce quindi ad immagazzinare glucosio nella cellula contro il suo gradiente di concentrazione.

Danno cellulare da accumulo di glucosio

Questi processi di accumulo di glucosio, influenzano la respirazione cellulare, con riduzione della fosforilazione ossidativa ed aumento sostanziale della glicolisi anaerobia. Viene quindi incrementata anche la produzione di acido lattico, formato per riduzione dal piruvato. Il piruvato è un inibitore dell'entrata in fase S della mitosi e la sua costante diminuzione nel citoplasma (per conversione in acido lattico), rimuove tale blocco sulla mitosi, spingendo la cellula verso una proliferazione incontrollata.

Warburg individuò infatti, come differenza fondamentale tra le cellule sane e quelle cancerose la velocità di flusso della glicolisi e spiegò così la probabile causa del cancro: “Il cancro, ancor più che per altre malattie, ha una serie illimitata di cause secondarie. Ma, anche per il cancro, c'è una causa primaria. La prima causa del cancro è la sostituzione della respirazione dell'ossigeno nelle normali cellule del corpo con la fermentazione del glucosio in acido lattico.

Incrementare il potassio intracellulare di una cellula tumorale può indurre la corrispondente fuoriuscita di sodio e quindi riduzione del glucosio, dall'ambiente intracellulare. In questo modo si potrebbe ottenere una rapida diminuzione delle riserve nutritive della cellula tumorale, riducendo la glicolisi e reintroducendo un blocco potenziale sulla mitosi. Dovrebbe, quindi essere possibile inibire il processo di proliferazione incontrollata[1].

Siamo convinti che i componenti del Citozym agiscano nel ridurre la fermentazione del glucosio, riducendo i livelli di acido lattico e l'apporto di glucosio alla cellula tumorale. Lo studio futuro dei meccanismi alla base dell'azione potenzialmente antineoplastica del Citozym porteranno alla luce questo aspetto cruciale nel controllo del cancro.

[1] Jansson B., Potassium, sodium, and cancer: a review J Environ Pathol Toxicol Oncol. 1996;15(2-4):65-73.

Modelli per l'oncologia sperimentale

Premessa

Il numero di animali usati nella ricerca è aumentato con l'avanzamento della ricerca e sviluppo nella tecnologia medica. Ogni anno, milioni di animali da esperimento sono utilizzati in tutto il mondo. Il dolore,

l'angoscia e la morte degli animali durante gli esperimenti scientifici sono stati un fonte di discussione per lungo tempo. Oltre questo importante problema di etica, sono stati evidenziati i punti deboli della sperimentazione animale, come ad esempio, la necessità di manodopera qualificata, i protocolli in termini di tempo e di costo elevato. Diverse alternative alla sperimentazione animale, sono state proposte per superare gli inconvenienti connessi con l'uso di animali ed evitare le procedure non etiche. Diversi metodi e organismi alternativi, sono stati proposti per attuare questa strategia. Questi metodi, sono stati giudicati scientificamente poco adatti, poiché forniscono dati non trasferibili direttamente all'uomo. Sempre più successo incontra l'organo coltura, per quanto le difficoltà di mantenimento e di trattamento dell'organo presenti ancora serie difficoltà.

Scopo della ricerca

Il fine del nostro progetto è quello di creare modelli *in vitro* di tessuto umano affetto da cancro, per mezzo della coltura di organi derivati da biopsie ottenute da pazienti con tale patologia. Preliminarmente, abbiamo definito, in un modello animale, le condizioni di crescita per polmone e per fegato (risultati precedenti) e intendiamo estenderle all'intestino tenue, crasso, pancreas, polmone e fegato, dove viene conservata l'istologia del tessuto. Nelle fasi precedenti del nostro studio, abbiamo sviluppato le condizioni ottimali per il trattamento, sia di organi sani e invasi da cellule tumorali. L'utilizzo di questi particolari condizioni, nel polmone e nel fegato, ha dato risultati interessanti, mostrando che il Citozym può rallentare la crescita cellulare. La ricerca è in progresso e risultati che presentiamo in questo contesto, sul fegato di topo C57BL/6, hanno evidenziato che tale sperimentazione può essere applicata a organi umani.

La **figura 1** mostra la netta riduzione della crescita di un carcinoma epatico, ove l'organo in coltura è stato trattato con soluzioni di perfusione contenenti Citozym (1:2 v/v). Questi risultati indicano che la coltura d'organo, ha la potenzialità per essere usata come alternativa all'uso di animali, in quanto questa rappresenta un modello appropriato, molto simile *al vivo* rispetto alla coltura cellulare e altri approcci sperimentali.

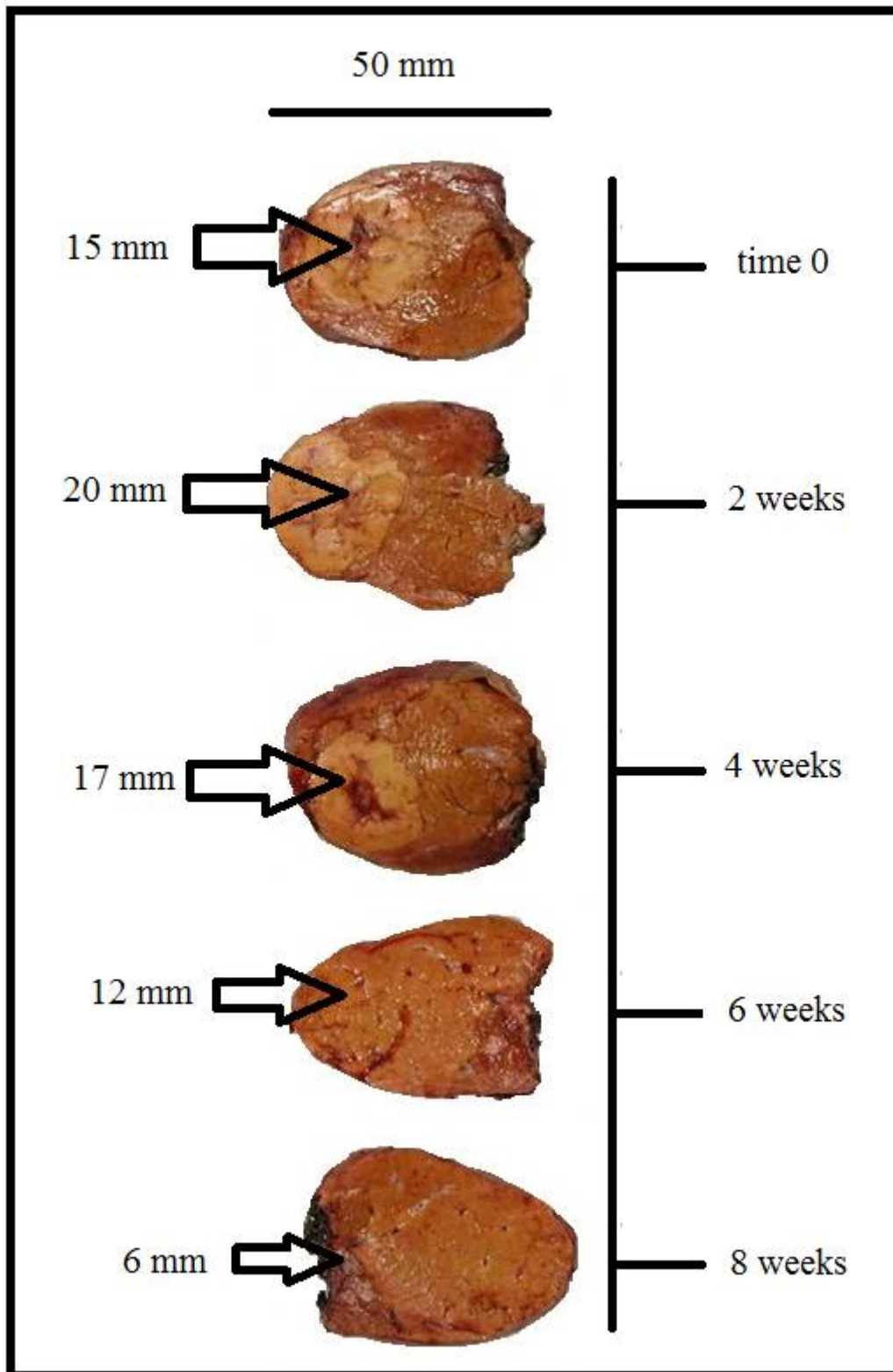


Figura 1. Riduzione di carcinoma epatico indotto nel fegato di topo C56 con inoculo di cellule H22. dopo 56 giorni di trattamento con soluzione di Citozym (1:2 v/v) somministrato per perfusione. Oltre le 8 settimane di perfusione si osservano fenomeni di degenerazione cellulare con aumenti dei livelli di lattico deidrogenasi (LDH).

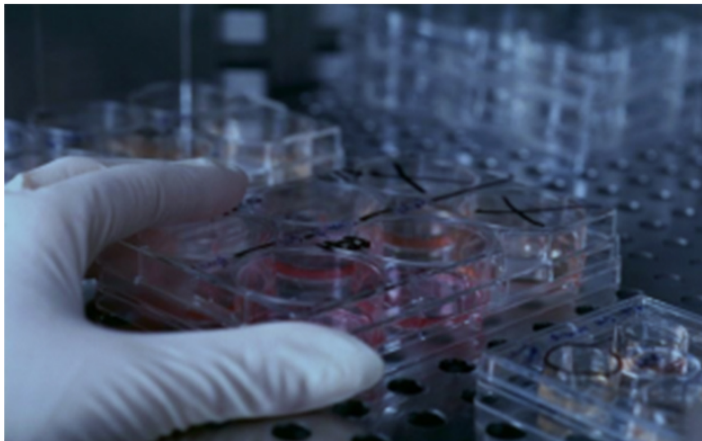
c) Istologia

Per l'esame istologico le biopsie epatiche sono state fissate in formalina al 10% per 48 ore, disidratate in etanolo ed incluse in paraffina. Sezioni di tessuto seriali sono state ottenute e valutate al QuantiMet al fine di valutare la crescita tumorale [2]

[2] (Beninati et al. European Journal of Cancer, 2000).

Asportazione dell'organo

Gli animali sono stati anestetizzati con una miscela di isofluorano / O₂. Il fegato è stato asportato e posto in ghiaccio, immerso in una soluzione isotonica di conservazione fino all'inizio della perfusione



Perfusione dell'organo

Due tipi di liquidi di perfusione sono stati utilizzati. Il PERF1 e il PERF2 che contiene KHCO₃. Il PERF1 è stato utilizzato per i controlli in assenza di KHCO₃.

Il sistema di perfusione è costituito da un circuito primario di perfusione del fegato e un circuito secondario di dialisi. Questo permette di utilizzare una piccola quantità di soluzione nutritiva ossigenata per fornire un elevato supporto dal circuito primario, pur mantenendo il vantaggio di un grande serbatoio di nutrienti e di diluizione dei rifiuti attraverso il circuito secondario. Il circuito primario contenente liquido di perfusione PERF1 o PERF2 (tamponato con KHCO₃), ricircola al flusso di 0.2

Animali

Topi maschi C57BL/6 sono stati ottenuti da Charles River (Sulzfeld, Germania). I topi sono stati alloggiati con temperatura e umidità controllate e con ciclo di 12 h luce / buio. Cibo e acqua *ad libitum* (Harlan Laboratories BV, Horst, Paesi Bassi). Gli animali sono stati acclimatati per almeno sette giorni prima dell'inizio dell'esperimento. Tutti gli esperimenti sono stati approvati dal comitato etico interessato (n. progetto CD23471N18). I protocolli sperimentali sono stati effettuati seguendo le linee guida proposte dal Consiglio Nazionale Italiano Ricerche (CNR), il MiUR e l'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

Sviluppo del tumore

a) Linea cellulare e reagenti

Cellule B16-F10 altamente metastatiche di melanoma murino sono state propagate in condizioni di coltura standard. Dulbecco Modified Eagle Medium (D-MEM), Roswell Park Memorial Institute medio (RPMI), Calf Serum fetale (FCS), e tutti gli altri mezzi di coltura sono stati ottenuti da Gibco (Grand Island, NY, USA). [14C] -methylamine (46,6 mCi / mmol) è stata fornita da Amersham International (Bucks, UK). Il Matrigel (MG), l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), la melanina sintetica e tutti i reagenti sono della Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA).

b) Tumori primari e metastasi epatiche sperimentali

La linea cellulare di melanoma murino B16-F10 è il modello comunemente utilizzato per sviluppare *in vivo* la formazione di tumori e metastasi in topi C57BL/6. Questa linea cellulare singenica, sviluppa facilmente tumori primari, quando iniettata nel sottocute degli animali e grazie alla loro elevata invasività, sono in grado di indurre la formazione di metastasi nel fegato dopo iniezione nella milza. Sono state iniettate nella milza 10^5 cellule vitali, sospese in 0,1 ml di PBS sterile. L'analisi della frequenza di formazione di metastasi è stata condotta a 10, 15 e 20 giorni post-iniezione.

mL/min, tramite una pompa peristaltica attraverso una camera di perfusione, un ossigenatore a membrana, uno scambiatore di calore, ed il gorgogliatore. L'ossigenatore produce una miscela di 74% N₂ / 21% O₂ / 5% CO₂ a pH costante. Il flusso dei gas è di circa 0.5 mL/min/g di fegato. I volumi di perfusato e dializzato sono mantenuti costanti variando il flusso del dializzato attraverso il dializzatore nel circuito secondario. La temperatura del fluido di perfusione è mantenuta a 37° C tramite un apparato a camicia d'acqua. Il liquido di perfusione (PERF1 o PERF2), a pH costante, è arricchito con una soluzione di Citozym (1:2 v/v) in William's medium E (Sigma Chemical). Questo è arricchito con penicillina (40.000 U/L)/ streptomina (40.000 mg /L; (Gibco e Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), L-Glutamina (0.292 g/L; Gibco), idrocortisone (10 mg/l Solu Cortef, Pfizer, New York, NY, USA), ed eparina (1000 U/L). Il volume totale del fluido di perfusione utilizzato per organo è di 55-60 ml. Tutti i controlli sono stati effettuati in assenza e presenza di Citozym (1:2 v/v) e gli elementi del liquido di perfusione non hanno mostrato alcun tipo di influenza sul trattamento con Citozym.

Controllo del danno epatico in seguito alla perfusione

L'eventuale perdite di lattico deidrogenasi (LDH) dall'organo al mezzo di perfusione durante il periodo di perfusione, è stata utilizzata come marcatore di danno cellulare. Il mezzo di perfusione, prima della dialisi è stato raccolto dopo ogni ciclo di perfusione e conservato a 4 ° C fino all'analisi. Il test è stato eseguito utilizzando il Cyto Tox-ONE omogenea Membrane Integrity Kit Assay (Promega, Madison, USA). 50 ml di mezzo di perfusione sono stati miscelato con 50 ml di Citozym a temperatura di 36°C per ottenere una soluzione diluita 1:2 v/v. Aliquote del liquido di perfusione sono state raccolte dopo il trattamento e distribuite in 96 pozzetti. La reazione è stata fatta procedere per 10 minuti, dopo di che è stato aggiunto alla miscela un reattivo di arresto della reazione. La fluorescenza dei campioni è stata letta a λ_{ec} 590 nm ed λ_{em} 560 nm. Il contenuto iniziale di LDH dell'organo è stato utilizzato come valore di controllo e posto a 100. Per questo, tre biopsie epatiche sono state raccolte omogeneizzate e i campioni centrifugati a 16.100 x g per 2.5 min. In seguito, i supernatanti sono stati raccolti e processati. La **Figura 3** mostra l'evidente riduzione del danno epatico quando viene utilizzato il fluido di perfusione PERF2 contenente KHCO₃.

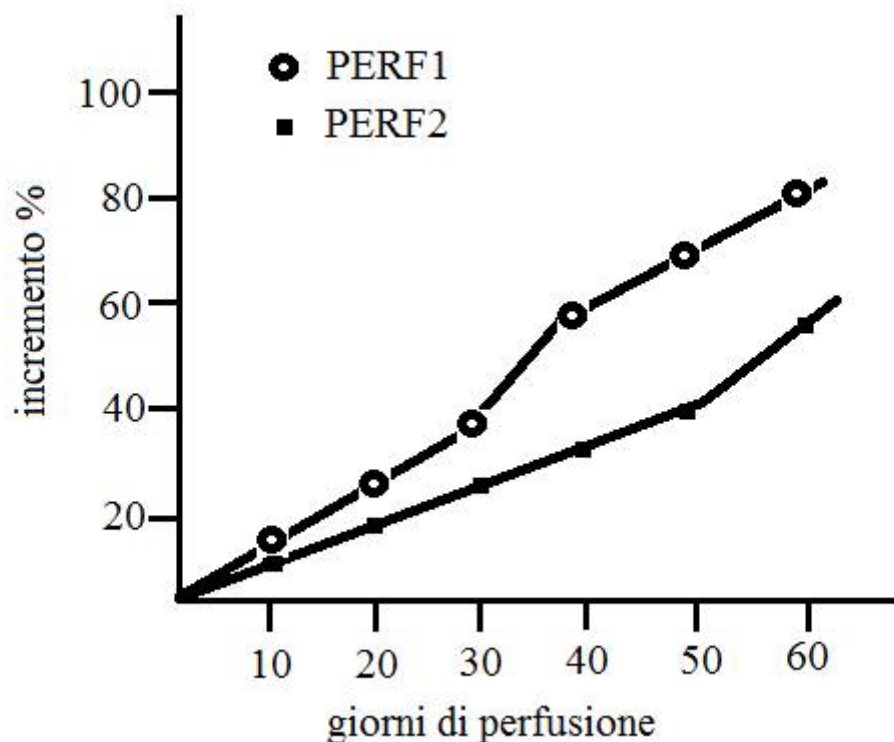


Figura3: riduzione del danno epatico (livelli di LDH) ottenuta con liquido di perfusione PERF2 contenente KHCO_3

Risultati

- a) Organo coltura del fegato di controllo in assenza o in presenza di KHCO_3

L'organo di controllo, perfuso con PERF1 (**Figura 4a**) e non trattato con Citozym, ha evidenziato la presenza di cataboliti tossici a causa delle capacità detossificanti dell'organo, come precedentemente osservato nel sistema ad incubazione (relazione preliminare del 24/01/2015). L'analisi biochimica del mezzo di perfusione prima della dialisi, ha evidenziato la sintesi di urea, ammoniaca, aldeidi e chetoni, che si riduce drasticamente in presenza nel liquido di perfusione PERF2, contenente KHCO_3 (**Figura 4b**).

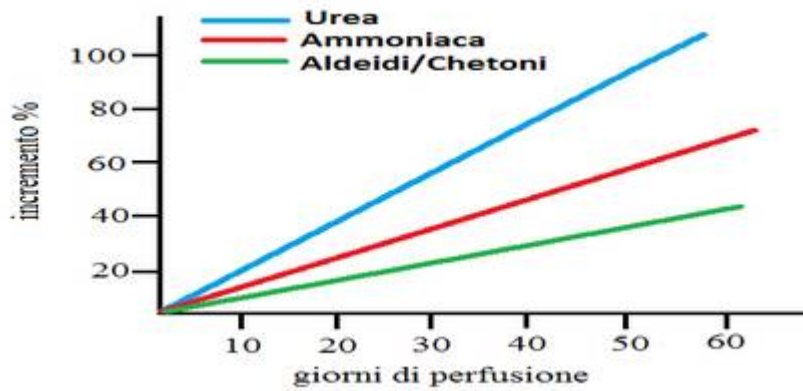


Figura 4a. Presenza di cataboliti epatici durante la perfusione epatica di controllo con fluido PERT1 .

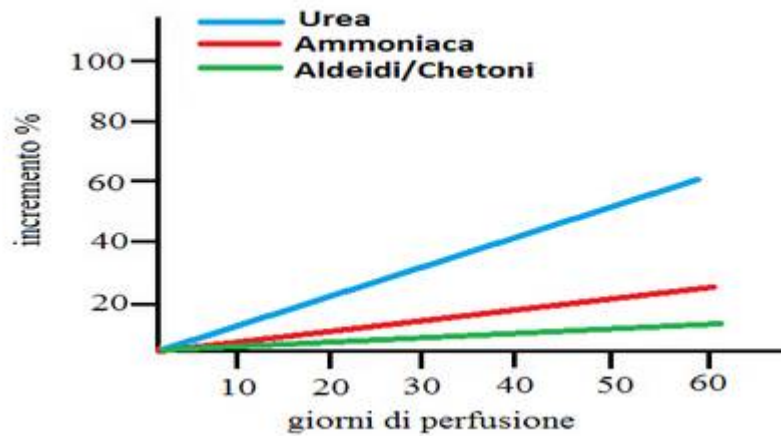


Figura 4b. Presenza di cataboliti epatici durante la perfusione epatica di controllo con fluido PERT2 .

Riduzione delle metastasi epatiche

E' evidente dalla **Figura 5** la marcata riduzione del volume medio delle metastasi epatiche dopo trattamento con PERF2 in presenza di Citozym 1:2 (v/v). I dati ottenuti con PERF1 in presenza di Citozym 1:2 (v/v) sono chiaramente ridotti, dalla presenza di metaboliti tossici e dalla degradazione dell'organo durante il periodo di perfusione.

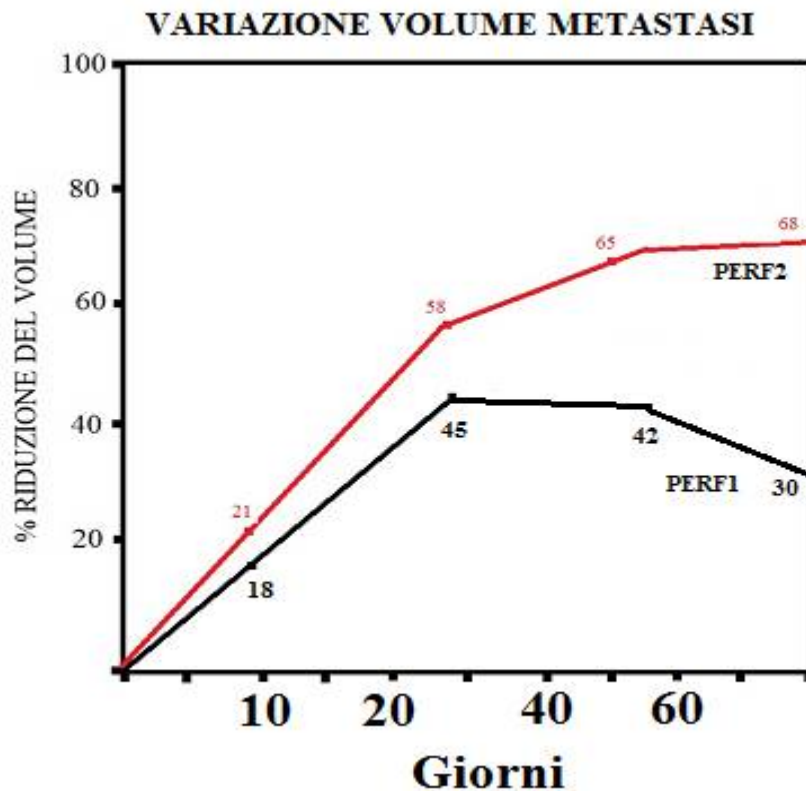


Figura 5. Variazioni percentuali del volume medio delle metastasi epatiche ottenute con inoculo di cellule della linea tumorale B16-F16. Gli organi sono stati mantenuti in perfusione per 7 settimane in presenza di Citozym 1:2 (v/v). Un gruppo con liquido di perfusione PERF1, privo di KHCO_3 e un gruppo con liquido di perfusione PERF2 contenente KHCO_3 .

Conclusioni

La ricerca di nuovi farmaci richiede la sperimentazione dell'efficacia e della tossicità sugli animali prima del test umano. I modelli animali, hanno una limitata capacità di prevedere con precisione le risposte sull'uomo a xenobiotici e altri insulti chimici. Pressioni sociali, si stanno anche concentrando sulla riduzione dell'uso di animali e quindi in ultima analisi, si chiede la sostituzione dei test sugli animali con modelli alternativi. Tuttavia, una varietà di modelli *in vitro*, esplorati nell'ultimo decennio, non sono stati sufficientemente positivi, per poter sostituire i modelli animali. Nuove iniziative cercano di affrontare questo problema, finanziando lo sviluppo di modelli fisiologicamente rilevanti di organi umani. L'obiettivo finale è quello di coltivare una porzione di organo umano, sostituendo in tal modo la sperimentazione animale, nella scoperta e sviluppo di farmaci antineoplastici. La parte preliminare del nostro lavoro, ha permesso di evidenziare la possibilità di poter incubare in coltura, organi di animali, mantenendoli grazie alla presenza di miscele di incubazione ricche di sostanze nutritive, per un periodo relativamente esteso, che permette di trattare neoplasie presenti nell'organo. Ad estensione di questo progetto, abbiamo sperimentato la perfusione, in sostituzione dell'incubazione in mezzo di coltura, ottenendo dati interessanti e privi dell'influenza di prodotti di degradazione, che potrebbero rendere discutibili i dati ottenuti. I risultati hanno evidenziato l'azione antiossidante del Citozym, che si esplica riducendo drasticamente le metastasi sperimentali, indotte con modelli classici di oncologia sperimentale. Tutto ciò rende possibile, la futura estensione del nostro progetto, che è quella di coltivare e mantenere per perfusione organi di origine umana, invasi da neoplasie. Il fine di tale ricerca è evidenziare che il Citozym, possa essere utilizzato come adiuvante nella terapia antitumorale, permettendo di ridurre drasticamente i livelli dei farmaci, utilizzati per la chemioterapia.

Roma 29/11/2015

Prof. Simone Beninati



Dott. Francesco Antonelli

