



**SciencePG**

Science Publishing Group

## **Micronutrienti multipli utilizzati nella perfusione di espianti di fegato umano invaso da epatocarcinoma (HCC) - riduce la proliferazione delle cellule tumorali inibendo lo stress ossidativo**

**Torricelli Piera<sup>1</sup>, Antonelli Francesco<sup>2</sup>, Ferorelli Pasquale<sup>2</sup>, De Martino Angelo<sup>2</sup>, Shevchenko Anna<sup>3</sup>, Siciliano Alberto<sup>2</sup> and Beninati Simone<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>Department SPES, University of Molise, Campobasso, Italy,

<sup>2</sup>University of Tor Vergata, Department of Biology, Rome Italy,

<sup>3</sup>People's Friendship University of Russia, Moscow, Russia.

**Email address:**

beninati@bio.uniroma2.it (Beninati S)

**To cite this article:**

**Torricelli P, Antonelli F, Ferorelli P, De Martino A, Shevchenko A, and Beninati S., Perfusion with multiple micronutrients supplement of explants of HCC-invaded human liver reduces proliferation of cancer cells by Inhibition of oxidative stress.. Cancer Research Journal August 4, 2016;**

**Research Journal. Vol. 4, No. 5, 2016, pp. 69-72. doi:**

**10.11648/j.crj.20160405.11**

**Received: August 4, 2016; Accepted: August 26, 2016; Published: September 21, 2016**

### **ABSTRACT**

L'organo perfuso che viene utilizzato per la chemioterapia perché permette la somministrazione del chemioterapico in un modo più efficace "somministrazione sistemica".

Il tumore è esposto ad una maggiore concentrazione del farmaco, mentre i tessuti normali anche se sensibili all'azione tossica vengono risparmiati per la tecnica della perfusione isolata.

Le neoplasie fatali osservati nell'uomo si verificano soprattutto nella zona addominale del corpo, lo sviluppo di una tecnica clinicamente applicabile per la perfusione di questa zona potrebbe essere l'ideale.

La presente relazione riguarda gli studi di laboratorio effettuati per la perfusione epatica in cui i risultati ottenuti ci hanno permesso di evidenziare l'azione antitumorale del Citozym, prova preliminare, del

meccanismo di attività antineoplastica di Citozym che si esprime nella riduzione dello stress ossidativo.

Parole chiave: antiossidanti, perfusione di organi, lo stress ossidativo, metastasi epatiche, epatocarcinoma.

## **Introduzione**

I modelli espianto di organi offrono diversi vantaggi , pertinenti a studi di meccanismi fisiopatologici ,come ad esempio l'età, la secrezione, la differenziazione, e lo sviluppo di tumori . Organi o piccoli espienti rimossi in vivo e messi in coltura per lunghi periodi, una particolare attenzione è rivolta alla composizione del terreno di coltura , la selezione del substrato , l'incubazione, del tessuto umano ottenuto da autopsia o un intervento chirurgico , ulteriore attenzione deve essere rivolta alla gamma post mortem , come la temperatura , l'umidità e la causa di morte. **Nel nostro laboratorio, abbiamo utilizzato colture di organi da espianto invasi da tumori maligni per determinare le possibilità di azione diretta degli agenti antineoplastici , in un ambiente mobile , caratterizzato da vari tipi di cellule e tessuti di un organo per studiare l'azione antineoplastica in vivo , di un integratore alimentare , disponibile in commercio come Citozym , che ha messo in evidenza una potenziale azione protettiva.**

(Vai su Ricerca e pubblicazione)

<https://www.citozeatec.ch/ricerca-carcinoma-epatico/>

Questo lavoro si basa su di uno studio di perfusione diretta a livello addominale – viscerale, per evitare la degradazione gastrica delle molecole attive , utilizzando come bersaglio direttamente l'organo affetto da cancro. tale test dovrebbe fornire nuove evidenze dell'elevata efficacia dell'agente somministrato direttamente in circolo ed essere molto più attivo rispetto alla somministrazione orale . Noi crediamo che questi test saranno importanti per proporre in futuro un trials clinico sulla base dei nostri precedenti esperimenti , condotti su fegato di topi C57BL / 6, il terreno di coltura utilizzato per gli espienti per la perfusione di fegato umano invaso da epato - carcinoma è arricchito con una concentrazione del 15% di Citozym.

Il fegato in grado di ripristinare l'energia durante la perfusione è in relazione sia con il tempo di conservazione che con lo stato nutrizionale del donatore, e la soluzione di conservazione utilizzata.

Tuttavia, ci sono alcuni elementi che aiutano il fegato a preservare l'accumulo di energia, queste possono essere farmaci o metabolite utilizzati, che vengono aggiunti per mantenere ad es. l'accumulo di glicogeno durante il tempo di conservazione, e permettono all'organo di ripristinare la sua energia durante perfusione.

Abbiamo potuto sperimentare che la soluzione di Citozym è altamente antiossidante e ricca di elementi essenziali per il metabolismo della cellula ed è in grado di proteggere il fegato, riducendo fortemente lo stress ossidativo durante la perfusione.

Lo stato funzionale e la vitalità cellulare possono essere controllati attraverso la valutazione dei livelli di lattato deidrogenasi (LDH) l' LDH è coinvolta nella fase di iniziazione del metabolismo del tumore. Le cellule tumorali si basano su l'aumentata attività della glicolisi conseguente ad un aumento della produzione di lattato invece che alla respirazione aerobica a livello mitocondriale anche in condizioni di ossigeno sufficienti.

Questo stato della glicolisi fermentativa è un meccanismo che permette alle cellule tumorali di convertire la maggior parte della loro disponibilità di glucosio in lattato a prescindere dalla disponibilità di ossigeno, spostando l'utilizzo dei metaboliti del glucosio dalla normale produzione di energia per la promozione della crescita delle cellule ed aumentata replicazione.

Per questo motivo, l'inibizione dell'attività dell' LDH A è stata identificata come un bersaglio promettente per i trattamenti contro il cancro incentrata prevalentemente sulla prevenzione dell'origine delle cellule cancerogene. Lo scopo della nostra ricerca è quello di effettuare studi su organi interi, quindi espunti di fegato interi in perfusione per testare l'eventuale miglioramento del potenziale antineoplastico del Citozym utilizzato per il trattamento per diversi giorni.

## **protocollo sperimentale**

### **2.1. Patients**

Quattro fegati di pazienti donatori con un'età media di 59 anni (range 52-68 anni); colpiti da epatocarcinoma (HCC) sono stati espuntati con lesioni prima dell'intervento e / o dopo l'intervento. I campioni sono stati

considerati come surplus di surgical tissue and donare dal Prof. Kisinawa (Chiba Clinica, Chiba, Ja-pan)). Due fegati espianati sono stati testati in perfusione con il 15% di CIZ, e due espianati di fegato sono stati perfusi con la stessa perfusione senza CIZ, ma con il 15% di saccarosio. Le procedure sperimentali sono state condotte secondo i principi espressi nella Dichiarazione di Helsinki. culture 2.2. fegato e perfusione.

Gli organi espianati sono stati istologicamente definiti come invasi da carcinoma epatocellulare in fase III C (fasi BCCG), soluzione salina (PBS 2%) e posti in coltura in presenza di ossigenazione continua. I Fegati espianati erano immersi in un mezzo privo di siero definita e incubato per 10 giorni a 37 ° C in una camera umidificata (5% CO<sub>2</sub>). perfusione media composizione senza siero è stato DMEM / F12 supplementato con 15 mM HEPES, bicarbonato di sodio 45 mM (pH 7,45) e transferrina 6 mM, il selenio 7 mM, l'insulina 8 mM, triiodotironina 2 mM di prostaglandina E1 6 mM e 100 UI / ml di penicillina e 100ug / ml di streptomycin, senza fungicida. **Gli espianati di fegato sono stati perfusi con il mezzo privo di siero realizzata con il 15% Citozym, mentre è stato trattato il gruppo di controllo con 15 % di saccarosio ( Figura 1 ) . il mezzo di perfusione è stato cambiato ogni 2 giorni . Il Citozym è stato ottenuto da Citozeatec , S.r.l. ( Peschiera Borromeo , Milano , Italia ) .Le principali componenti del CIZ sono i seguenti ( unità / 100 g ) : 500 mg di vitamina C ; 56 mg di vitamina B5 , 56 mg di vita- min D ; 3,3 mg di vitamina B9 ; 222 mg di acido piruvico , 120 mg di acido citrico , 250 mg di acido tartarico e 77,8 g di auto - bohydrates .**

### 2.3 Test Biologici

Il rilascio di lattato deidrogenasi (LDH) dal fegato nel mezzo, è stato considerato come marker di danno cellulare. Le aliquote del mezzo di perfusione (1 mL) ogni due giorni e testati per LDH. Il test è stato effettuato utilizzando il Mem-brane integrità Assay Kit Cito Tox-ONE™ (Promega, Madison, Stati Uniti d'America). La fluorescenza dei campioni è stata letta a  $\lambda_{590ex}$  e  $\lambda_{560em}$ . La valutazione dei livelli di due rappresentative CIZ componenti di espianato del fegato colta è stata effettuata analizzando la quantità di acido ascorbico e coledalciferolo, come marcatori, in aliquote del parenchima epatico di espianato da HPLC meth-ODS [5,6].

## **2.4. Analisi istopatologiche e immunoistochimiche**

Durante i 10 giorni di perfusione in paraffina le sezioni di biopsie di fegato espianati sono stati preparati utilizzando le procedure di routine per gli esami istopatologici e immunoistochimica-chimici.

Quattro sezioni in micron di spessore di forma-lin-fissi e fegati inclusi in paraffina sono stati preparati e colorate con ematossilina eosina per istopatologia. La molteplicità delle lesioni epatocellulari chiamati foci di alterazione cellulari sono stati valutati su una area (/ cm<sup>2</sup>) base e determinata secondo i criteri descritti da Frith et al. [7]. Il nome numero 2014; X (X): XX-XX 3

## **3. Risultati**

Abbiamo dimostrato che espianati di fegato perfuso ed in coltura per più di una settimana (10 giorni).invasi da HCC, ottenuti da donatori trapiantati sono sufficientemente validi come già riferito [8].

Due componenti principali di CYZ (vitamina C e D) sono stati assorbiti dagli espianati in quantità variabili.

Il peso degli espianati dei fegato tracciati con il peso della massa HCC, ha mostrato una riduzione del 50% del volume totale nei campioni perfusi con il 15% CIZ per 10 giorni (Figura 2a). I livelli di LDH, rilasciati nel mezzo di perfusione sono aumentati in saccarosio durante i 10 giorni di perfusione con CIZ, evidenziando la buona vitalità di espianati di fegato (Figura 2b). L'esame microscopico dei tessuti tumorali hanno dimostrato che le strutture epatiche normali erano state distrutte da invasione delle cellule tumorali.

I ROS Reattive specie dell'ossigeno (ROS) svolgono un importante ruolo nel cancro infatti il loro accumulo eccessivo lo può promuovere [9] . Al contrario delle cellule normali, producono aumenti di una difesa antiossidante giocando un ruolo cardine nel mediare l'apoptosi cellulare e la regolazione dello sviluppo di aterosclerosi [10], mentre NADPH ossidasi è una delle principali fonti di produzione di ROS vascolari, come il complesso enzimatico della NADPH ossidasi sono considerati una delle principali fonti di formazione di anione superossido [11] .Inoltre, NADPH ossidasi è anche fortemente coinvolto nella apoptosi endoteliale [12] **I nostri risultati indicano che CIZ sopprime la produzione di ROS, che aiuta a chiarire il meccanismo di base per l'effetto antineoplastico**

## Figura 2.

### Discussione

L'epatocarcinoma (HCC) è stato caratterizzato come un cancro da infiammazione cronica e gli studi di modelli animali di carcinoma epatico indotto chimicamente hanno rivelato il ruolo cruciale di segnalazione infiammatoria a l'insorgenza della malattia e la gravità [ 13 ] Abbiamo utilizzato questo modello per studiare l'attività antiinfiammatorie , anti – ossidazione, e proprietà anticancro [ 14 ] . 4 Autore Titolo Nome et al .:

Il CitozYM contiene molteplici fattori attivi , è un integratore alimentare di micronutrienti . Recentemente si è dimostrato utile nel ridurre i sintomi di diverse malattie , come la cirrosi epatica , la steatosi e l'iperplasia prostatica benigna [ 15-17 ] . Il ruolo della induzione di stress ossidativo come il meccanismo di azione di molti farmaci antitumorali sta acquisendo un crescente interesse . In tali casi , il successo della terapia antitumorale può essere condizionato dalle componenti antiossidanti presenti nel nostro corpo , (che può essere endogena ) o supplementi nutrizionali esogeni . Sebbene le cellule possiedono una grande repertorio di enzimi e antiossidanti , talvolta questi agenti sono insufficienti per normalizzare lo stato redox prodotto da uno stress ossidativo intenso [ 15 ] In questi casi , i supplementi antiossidanti esogeni possono essere necessari per ripristinare l'omeostasi redox cellulare [ 16 ] E 'stato suggerito che la supplementazione di antiossidanti può essere utilizzata contro con lo sviluppo di alcune malattie o che può invertire sullo stress ossidativo prodotto durante il loro corso . Nella zona di nostro interesse , cioè , il cancro , gli antiossidanti stanno acquisendo una grande importanza.

E 'stato riportato che gli antiossidanti possono prevenire il cancro a causa dei loro effetti sullo stress ossidativo [ 17 ] Abbiamo recentemente riportato che CIZ , protegge C57BL6 / N topi da melanoma cancerogenesi quando prima delle fasi di iniziazione e di promozione di melanoma [ 18 ] I vari componenti del CIZ , possono agire sinergicamente , amplificando gli antiossidanti e l'attività antineoplastica di molecole come l'acido piruvico , vitamina C (acido ascorbico) , e D3. ( Colecalciferolo ) e B5 (acido pantotenico ) e B9 complesso (acido folico)

I nostri risultati indicano chiaramente che CIZ sopprime la produzione di ROS , che sono noti per essere coinvolti nella migrazione e l'invasione delle cellule tumorali , in espianti di fegato HCC - invasivo può fornire una

visione nuova dei meccanismi sottostanti all' attività antineoplastica di questi molteplici integratori di micronutrienti.

### **Figura 3.**

Riduzione dei ROS in percentuale di attività durante il trattamento di espianti di fegato trattati con il 15 % CIZ come riportato in Materiali e Metodi e confrontato con l'attività di controllo.

### **Ringraziamenti**

Siamo grati a A.I.A.S. L'Italia , per il sostegno finanziario per lo studio della possibilità di terapie alternative per il cancro e il Prof. Kisinawa per il dono tipo di campione di fegato come surplus di tessuto chirurgico.

### **Referenze**

- [1] B. Uttara, A. V. Singh, P. Zamboni, and R. T. Mahajan, “Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 2009; 7(1): 65–74
- [2] R. Dutta and B. D. Trapp, “Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. *Neurology*. 2007;68 (22): S22–S31.
- [3] H. S. Mickel, “Multiple sclerosis: a new hypothesis. *Perspectives in Biology and Medicine*. 1975;18 (3): 363–374.
- [4] H. T. Besler and S. Comoglu. Lipoprotein oxidation, plasma total antioxidant capacity and homocysteine level in patients with multiple sclerosis. *Nutritional Neuroscience*. 2003; 6 (3):189–196.
- [5] J. A. Black, J. Newcombe, B. D. Trapp, and S. G. Waxman, Sodium channel expression within chronic multiple sclerosis Plaques. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2007; 66 (9): 828–837.
- [6] A. Ames III. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Research Reviews*. 2000; 34 (1-2): 42–68.
- [7] H. Andrews, K. White, C. Thomson et al. Increased axonal mitochondrial activity as an adaptation to myelin deficiency in the shiverer mouse. *Journal of Neuroscience Research*. 2006;83 (8): 1533–1539.