

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE BIOMEDICHE**

**Ciclo XXVI**

**Settore Concorsuale di afferenza: 06/B1**

**Settore Scientifico disciplinare: MED 09**

**VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DELL'INFUSIONE  
INTRAEPATICA DI CELLULE STAMINALI (SC)  
AUTOLOGHE CD133<sup>+</sup> IN PAZIENTI AFFETTI DA  
CIRROSI ED INSUFFICIENZA EPATICA DI GRADO  
AVANZATO**

**Presentata da: Dr.ssa Elena Grandini**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Lucio Cocco**

**Relatore**

**Dr.ssa Annagiulia Gramenzi**

**Esame finale anno 2014**

# INDICE

---

## CAPITOLO 1 – LE CELLULE STAMINALI

1.1	CENNI STORICI.....	PAG 1
1.2	CHE COSA SONO LE CELLULE STAMINALI.....	PAG 2
1.3	PLASTICITA' DELLE CELLULE STAMINALI.....	PAG 5
1.4	CELLULE STAMINALI ED EMOPOIESI.....	PAG 6
1.5	LE CELLULE STAMINALI CD133 <sup>+</sup> .....	PAG 12
1.6	PROGENITORI ENDOTELIALI E CELLULE ENDOTELIALI CIRCOLANTI.....	PAG 14
1.7	CITOCHINE MOBILIZZANTI CELLULE STAMINALI/ PROGENITORI ENDOTELIALI.....	PAG 15

## CAPITOLO 2 – IL FEGATO

2.1	LA RIGENERAZIONE EPATICA.....	PAG 17
2.1.1	LA COMPONENTE PARENCHIMALE.....	PAG 17
2.1.2	LA COMPONENTE NON PARENCHIMALE.....	PAG 19
2.2	INSUFFICIENZA EPATICA E CIRROSI.....	PAG 21
2.3	IL TRAPIANTO DI FEGATO.....	PAG 23
2.4	ALTERNATIVE AL TRAPIANTO DI FEGATO.....	PAG 23
2.4.1	FEGATO BIOARTIFICIALE.....	PAG 24
2.4.2	TRAPIANTO DI EPATOCITI ISOLATI.....	PAG 24
2.5	LA TERAPIA CELLULARE NEI DISORDINI DEL FEGATO.....	PAG 25
2.6	UTILIZZO DEL G-CSF PER LA MOBILIZZAZIONE DI CELLULE STAMINALI MIDOLLARI.....	PAG 28

## CAPITOLO 3 – PARTE SPERIMENTALE

3.1	RAZIONALE ED OBIETTIVI DELLO STUDIO.....	PAG 30
3.2	SCOPO DELLO STUDIO.....	PAG 31
3.3	MATERIALI E METODI.....	PAG 32

3.3.1	DESCRIZIONE DELLO STUDIO CLINICO .....	PAG 32
3.3.2	STUDIO BIOLOGICO .....	PAG 34
3.3.3	CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE CD133+ CIRCOLANTI .....	PAG 34
3.3.4	CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DELLE CELLULE STAMINALI CIRCOLANTI .....	PAG 34
3.3.5	SEMINA DELLE CELLULE MONONUCLEATE SU PIASTRA PER LA VALUTAZIONE DELLA CAPACITA' CLONOGENICA DELLE CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE .....	PAG 36
3.3.6	SEMINA DELLE CELLULE MONONUCLEATE SU PIASTRA PER LA VALUTAZIONE DELLA CAPACITA' CLONOGENICA DELLE CELLULE STAMINALI ENDOTELIALI .....	PAG 36
3.3.7	SCONGELAMENTO DELLE SACCHE CONTENENTI CELLULE STAMINALI CD133 <sup>+</sup> ALTAMENTE PURIFICATE .....	PAG 37
3.3.8	DOSAGGIO DELLE CITOCHINE SIERICHE .....	PAG 37
<b>3.4</b>	<b>ANALISI STATISTICA .....</b>	<b>PAG 38</b>
<b>3.5</b>	<b>RISULTATI .....</b>	<b>PAG 38</b>
3.5.1	CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA – FASE DI MOBILIZZAZIONE .....	PAG 40
3.5.2	CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA – FASE DELLA REINFUSIONE .....	PAG 44
3.5.3	VALUTAZIONE DELLA CAPACITA' CLONOGENICA DELLE CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE .....	PAG 47
3.5.4	VALUTAZIONE DELLA CAPACITA' CLONOGENICA DELLE CELLULE STAMINALI ENDOTELIALI .....	PAG 49
3.5.5	CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE CD133 <sup>+</sup> ALTAMENTE PURIFICATE .....	PAG 50
3.5.6	VALUTAZIONE DELLE CITOCHINE SIERICHE.....	PAG 51
<b>3.6</b>	<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>PAG 56</b>

**3.7 CONCLUSIONI .....PAG 58**

**BIBLIOGRAFIA .....PAG 59**

# CAPITOLO 1

---

## LE CELLULE STAMINALI

### 1.1 CENNI STORICI

L'idea dell'esistenza di cellule capaci di autorigenerarsi e in grado di riparare tessuti danneggiati è nota da molto tempo. Già nella seconda metà del 1800 Virchow aveva ipotizzato che i tessuti si rigenerassero mediante processi di proliferazione e differenziazione cellulare (1).

All'inizio del secolo scorso Pappenheim introdusse il concetto vero e proprio di cellula staminale; egli postulò l'esistenza di una cellula staminale indifferenziata capace di originare le varie linee cellulari del midollo osseo (1). Ma è solo nel 1960 che, grazie a Joseph Altman e Gopal Das che presentarono prove di neurogenesi adulta e di attività da parte di cellule staminali nel cervello, si giunge ad una svolta in materia di cellule staminali (2).

Pochi anni dopo, nel 1963, arriva il contributo di McCulloch e Till che illustrano la presenza di cellule staminali autorinnovanti nel midollo osseo di topo, definendo tali cellule come Spleen Colony-Forming Unit (3,4). Successivamente si viene a formare il concetto che doveva esistere anche in altri distretti del nostro organismo, e non solo nel tessuto emopoietico, una popolazione di cellule staminali residenti (1).

Dagli anni '60 ad oggi le scoperte e gli studi si sono susseguiti con velocità sempre crescente e ora le cellule staminali rappresentano una grande frontiera e speranza della medicina.

## 1.2 CHE COSA SONO LE CELLULE STAMINALI

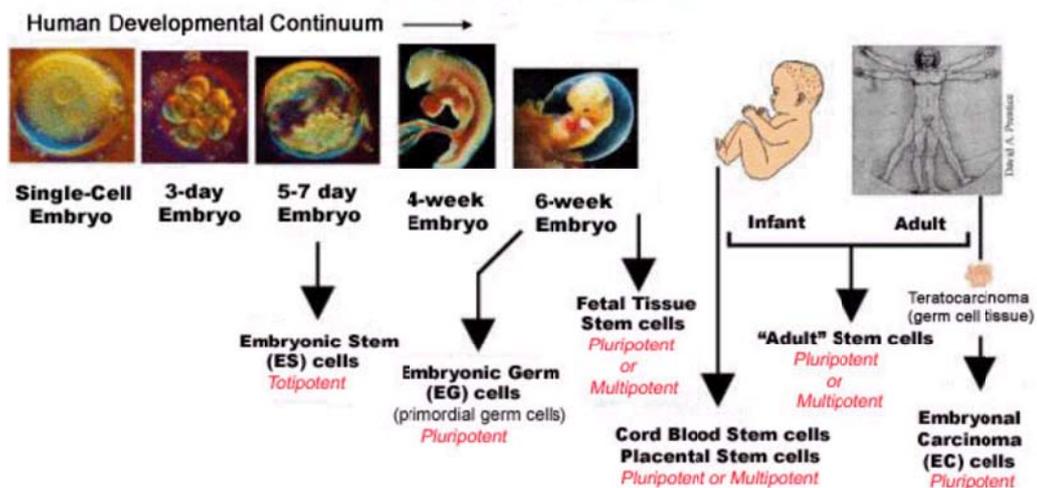
Le cellule staminali (CS) sono cellule indifferenziate definite dalla loro abilità di automantenersi (“self-renewal”) e contemporaneamente differenziare, producendo una progenie di cellule mature.

“Self-renewal” è la capacità della cellula staminale di andare incontro a divisioni cellulari in cui almeno una delle cellule figlie rimane staminale, mentre l’altra, nel caso di una divisione asimmetrica, inizia a differenziare. Le CS sono anche in grado di generare una progenie differenziata: sia progenitori non “self-renewal” che cellule effettrici terminalmente differenziate. Tuttavia le CS possono anche andare incontro a divisioni simmetriche, dove entrambe le cellule figlie continuano ad avere caratteristiche staminali. Questo accade durante le prime fasi dello sviluppo, ma raramente dopo la nascita, ad eccezione di casi in cui sia necessario aumentare il pool di CS, ad esempio dopo un grave danno tissutale o dopo un trapianto (5).

Un’altra caratteristica delle CS è la loro persistenza in uno stato mitotico quiescente: le cellule si dividono raramente e molto lentamente (6).

Le CS, in base al loro potenziale di sviluppo, sono state classificate in: totipotenti, pluripotenti, multipotenti, oligopotenti ed unipotenti (7)(Figura 1).

**Figura 1:** CS con diverso potenziale di sviluppo (8)



Tutti i mammiferi derivano da una singola cellula staminale, la cellula staminale totipotente. Dalla cellula staminale, in seguito a divisioni multiple, deriva la blastula, al cui interno si trova un piccolo gruppo di cellule denominato “inner cell mass” (ICM): queste sono le CS pluripotenti, che daranno origine all’embrione ma non sono in grado di dare origine a tessuti extraembrionali.

Le cellule della ICM successivamente si differenziano in epiblasto ed ipoblasto che daranno poi origine ai tre foglietti embrionali: ectoderma, endoderma e mesoderma definitivi ed infine a CS tessuto-specifiche. Ad ogni stadio del processo di differenziamento le CS diventano sempre più limitate nella loro capacità di self-renewal (5).

La pluripotenza è mantenuta grazie ad una combinazione di meccanismi epigenetici, trascrizionali e post-trascrizionali. Da studi di “loss of function” (9, 10) sono stati individuati numerosi fattori di trascrizione fondamentali per mantenere la pluripotenza della cellula staminale tra cui: Oct3a/Oct4, Nanog e Sox2. Tali fattori agiscono sopprimendo l’espressione di geni che inducono il differenziamento cellulare e stimolando l’espressione di geni che mantengono lo stato indifferenziato delle CS pluripotenti.

Popolazioni di CS adulte, pluripotenti e multipotenti, sono state identificate in vari organi ed in particolare nella pelle (11), midollo osseo (12), muscolo (13) e cervello (14).

La persistenza di popolazioni staminali durante la vita adulta può dipendere sia dalla sopravvivenza delle CS quiescenti, sia dalla capacità self-renewal, cioè dalla continua capacità di auto mantenersi.

Sebbene in condizioni di “steady state” il pool di CS di un tessuto rimane costante, può comunque espandersi rapidamente in risposta ad un danno tissutale. Il danno tissutale induce infatti l’espansione della popolazione di CS. Tali cellule iniziano a dividersi, stimolate da mitogeni prodotti dalle cellule che stanno morendo e dalla mancanza degli inibitori normalmente prodotti dalle cellule sane. È un sistema di feedback locale.

Il differenziamento comprende una prima fase in cui la cellula esce dallo stato indifferenziato, seguita dall’entrata in un particolare “pathway” di sviluppo. Non

è ancora chiaro se questi due processi siano regolati indipendentemente; è tuttavia possibile che alcuni fattori prodotti dall'ambiente inducano il differenziamento (sia positivi, che di repressione di segnali di mantenimento della staminalità) ma è altresì possibile che tutto dipenda dall'uscita dal microambiente che aveva mantenuto lo stato non commissionato.

La determinazione del "lineage" differenziativo di una cellula staminale può non essere definita in modo rigido, ma può essere flessibile, permettendo a queste cellule di rispondere a diversi segnali rigenerativi che provengono dal microambiente (15).

Ci sono evidenze che dimostrano la plasticità di alcune CS, cioè la capacità della cellula di una linea tissutale di convertirsi in una cellula di una linea tissutale completamente diversa. Sono stati ipotizzati vari meccanismi per spiegare la plasticità delle CS: transdifferenziamento o "lineage conversion" (16), dedifferenziamento, presenza di una cellula staminale pluripotente e la fusione cellulare. La fusione cellulare è un evento che accade già fisiologicamente durante la generazione delle miofibrille scheletriche multinucleate dai mioblasti e degli osteoclasti dalla linea cellulare dei monociti/macrofagi (17, 18). Alcuni esperimenti di genetica e citogenetica hanno dimostrato come la fusione cellulare sia implicata nel contributo delle cellule del midollo osseo trapiantate alla formazione di epatociti, miociti cardiaci e neuroni di Purkinje (19-22). Tuttavia, ad oggi, non ci sono evidenze che indichino che la fusione cellulare eterotopica sia necessaria per il normale mantenimento dei tessuti. Inoltre è un evento alquanto raro, quindi non è certamente il principale meccanismo di rigenerazione tissutale.

Questi esperimenti hanno dimostrato che lo stato differenziato delle CS nei mammiferi adulti non è fisso ed irreversibile, ma invece è regolato da un attivo processo dinamico che richiede una continua regolazione (15). In ogni momento lo stato differenziato è dato dal bilancio dei regolatori presenti nella cellula. Il microambiente, che include il contatto con le cellule circostanti, con la matrice cellulare, così come i fattori di crescita e differenziamento, gioca un ruolo chiave

nella determinazione della funzione di una cellula staminale. Sono quindi questi fattori all'interno del tessuto a determinare quali geni saranno attivati.

### **1.3 PLASTICITA' DELLE CELLULE STAMINALI**

Un tempo si credeva che le staminali adulte fossero in grado di differenziarsi solo nei tessuti da cui prendevano origine. Da recenti studi, tuttavia, è emerso che le cellule staminali adulte sono "multipotenti"; sono cioè in grado, se opportunamente stimolate, di dare origine a cellule diverse da quelle del tessuto di origine. Si parla quindi di "plasticità" delle cellule staminali adulte (1).

Nel modello animale è stato, infatti, dimostrato che cellule staminali del sistema nervoso centrale e del muscolo sono in grado di generare cellule emopoietiche, e, viceversa, che cellule staminali midollari sono in grado di dare origine a cellule muscolari, nervose, endoteliali ed epatiche. (23)

Gussoni et al. (24) hanno dimostrato con esperimenti di trapianto di cellule staminali emopoietiche "wild-type" in topi distrofici (con donatore-ricevente di sesso diverso) che queste cellule purificate potevano rigenerare il sistema emopoietico ma anche dare origine ad una progenie che poteva differenziare verso un tipo cellulare diverso, in questo specifico caso il tessuto muscolare. Un ulteriore studio più recente è quello del gruppo di Wolf che, trapiantando circa 2000 cellule staminali emopoietiche nel midollo osseo, dimostrò che era possibile rigenerare cellule muscolari cardiache ed endoteliali a seguito di un severo insulto ischemico conseguente alla legatura di un'arteria coronaria (24).

Questi lavori hanno dimostrato come nei tessuti adulti siano presenti cellule staminali in grado di migrare in siti molto diversi da quelli di origine e partecipare ai fenomeni di rigenerazione tissutale, senza limitazioni legate ai foglietti embrionali di origine. Sono stati, inoltre, condotti numerosi studi al fine di caratterizzare il tipo cellulare che meglio è in grado di differenziarsi verso altre linee cellulari e capace di riparare altri tessuti.

Le cellule staminali del midollo osseo sono quelle dotate della maggior plasticità. Le cellule staminali emopoietiche CD133<sup>+</sup> sono in grado di dare origine a cellule endoteliali, muscolari e nervose e sono state utilizzate anche per contribuire alla

rigenerazione del miocardio ischemico in pazienti infartuati e in pazienti che avevano subito una resezione epatica (25). Recentemente, inoltre, è stata isolata un'ulteriore sottoclasse di cellule staminali mesenchimali dal midollo osseo adulto, ovvero le Multipotent Adult Progenitor Cells (MAPC) (26). Esse hanno un enorme potenziale proliferativo e differenziativo e sono quindi in grado di differenziare sia verso la linea mesenchimale sia verso cellule mesodermiche viscerali (26), neuroectodermiche (27) ed endodermiche (28). Le MAPC sono CD34<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup> e MHC I e II negative ed esprimono inoltre anche markers genetici caratteristici delle cellule staminali embrionali (Oct-4; Rex-1; SSEA-I).

#### **1.4 CELLULE STAMINALI ED EMOPOIESI**

Nel midollo osseo sono state identificate due sottopopolazioni di cellule staminali: le cellule staminali mesenchimali (MSC) e le cellule staminali emopoietiche (HSC), che danno origine agli elementi circolanti del sangue periferico.

Cellule staminali emopoietiche e mesenchimali sono state isolate anche nel sangue cordonale e più recentemente anche nel liquido amniotico.

Le cellule staminali mesenchimali si trovano prevalentemente nel midollo osseo, ma le possiamo trovare in minor misura anche in altri tessuti come il tessuto muscolare, il tessuto renale, il derma ed anche nel circolo sanguigno. Esse sono fenotipicamente caratterizzate dall'espressione degli antigeni CD44, CD29, CD105, CD90 e CD13, mentre sono negative per gli antigeni emopoietici CD45, CD34 e CD133 e delle molecole HLA di classe II. Le cellule staminali mesenchimali sono in grado di differenziare, sia in vitro sia in vivo, verso tessuto adiposo, osseo e cartilagineo. Il loro numero si riduce all'aumentare dell'età con conseguente riduzione del potenziale di rimodellamento, riparazione e rigenerazione dei tessuti specializzati (29).

Il termine "emopoiesi" si riferisce alla formazione e alla maturazione di tutti i tipi cellulari del sangue a partire dai loro progenitori/precursori. In tutti gli embrioni di vertebrati la prima sintesi di emoglobina, e quindi la produzione di eritrociti,

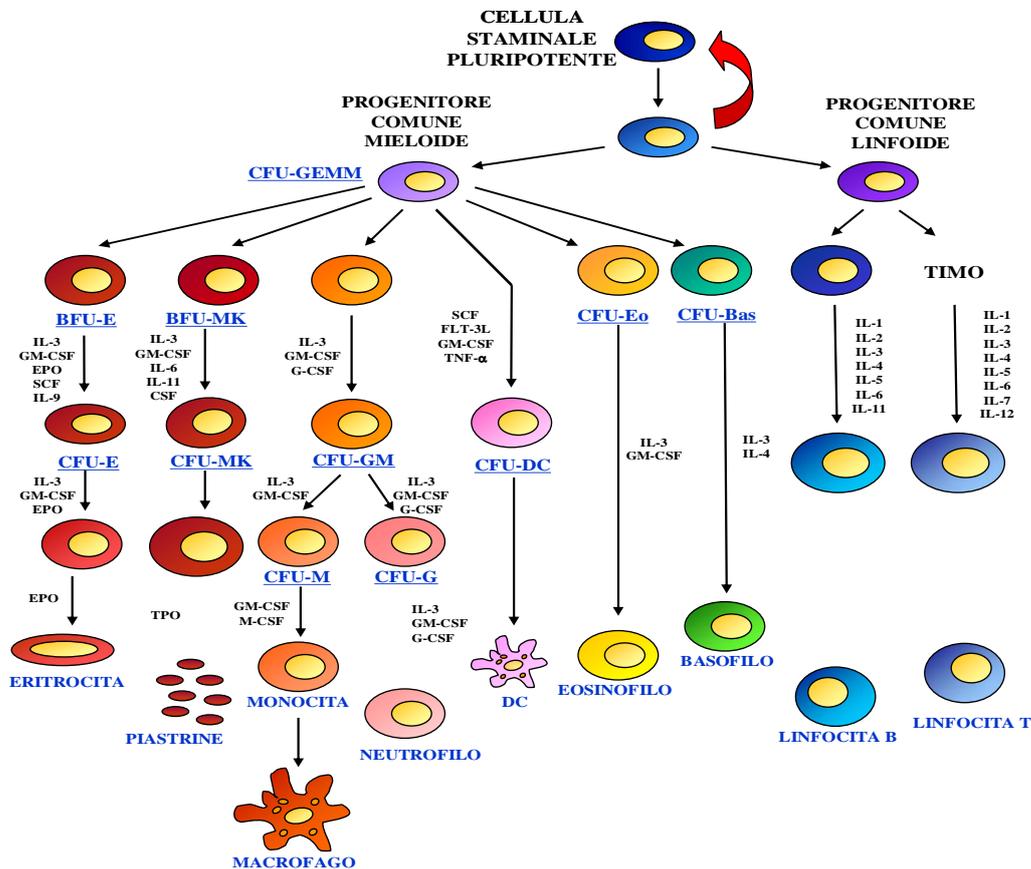
avviene nel sacco vitellino. All'inizio della sesta settimana la produzione eritrocitaria del sacco vitellino diminuisce ed inizia l'eritropoiesi intra-embriionaria a livello del fegato. A partire dalla dodicesima settimana essa è presente anche nella milza e, infine, dalla ventesima avviene nel midollo osseo. Sin dal periodo epatico sono presenti granuloblasti e megacariociti, ma è solo nel midollo che assumono pieno sviluppo (30).

In condizioni normali, nell'adulto l'emopoiesi avviene solo nel midollo osseo. Il midollo osseo è un ambiente particolarmente adatto alla crescita e allo sviluppo delle cellule del sangue; il microambiente del midollo, infatti, ha funzione non soltanto di supporto permissivo, ma anche di regolazione. In particolare esercita la sua funzione attraverso tre modalità: interazioni cellulari dirette o mediante segnali a breve raggio d'azione, secrezione di fattori con attività stimolatoria o inibitoria, elaborazione di una matrice extracellulare (30). L'emopoiesi avviene nella parte extravascolare del midollo rosso, che è formato da una fine rete di supporto disseminata di canali vascolari (sinusoidi) e cellule midollari in varie fasi di maturazione. Quando le cellule sono mature, lasciano il parenchima midollare ed entrano nel circolo periferico, passando attraverso sottili fenestrature. Le cellule mature del sangue sono destinate a vivere da poche ore a diverse settimane, prima di essere sequestrate e distrutte. Inoltre, la maggior parte delle cellule, una volta entrate in circolo, è incapace di ulteriori divisioni; devono essere, quindi, continuamente rimpiazzate da nuovi elementi provenienti dal midollo osseo (31).

I globuli rossi, i globuli bianchi e le piastrine derivano da un'unica cellula staminale emopoietica pluripotente. La cellula staminale emopoietica può seguire linee di maturazione morfologicamente e funzionalmente diverse; essa può dare origine ad altre cellule staminali oppure differenziare verso le due linee differenziali principali: la linea mieloide e la linea linfoide. In quest'ultimo caso ha inizio la linfopoiesi, mentre nel primo caso si sviluppa una cellula staminale emopoietica multipotente, già "commissionata" e capace di provvedere alla mielopoiesi, all'eritropoiesi e alla produzione di piastrine.

Nella linea neutrofilo-monocitaria sono stati identificati cinque tipi di progenitori: CFU-GEMM (Colony Forming Unit- Granulocyte-Eritrhocyte-Macrophage-Megakaryocyte), CFU-GM (Colony Forming Unit-Granulocyte Monocyte), CFU-G (Colony Forming Unit-Granulocyte), CFU-M (Colony Forming Unit-Monocyte) e CFU-DC (Colony Forming Unit-Dendritic Cell). Nella linea eritroide, invece, esistono due tipi di progenitori: BFU-E (Burst Forming Unit-Erythrocyte) e CFU-E (Colony Forming Unit-Erythrocyte). Le piastrine, infine, derivano dalle BFU-MK (Burst Forming Unit-Megakaryocyte) e CFU-MK (Colony Forming Unit-Megakaryocyte) (Figura 2) (30).

**Figura 2:** Albero differenziativo delle cellule emopoietiche

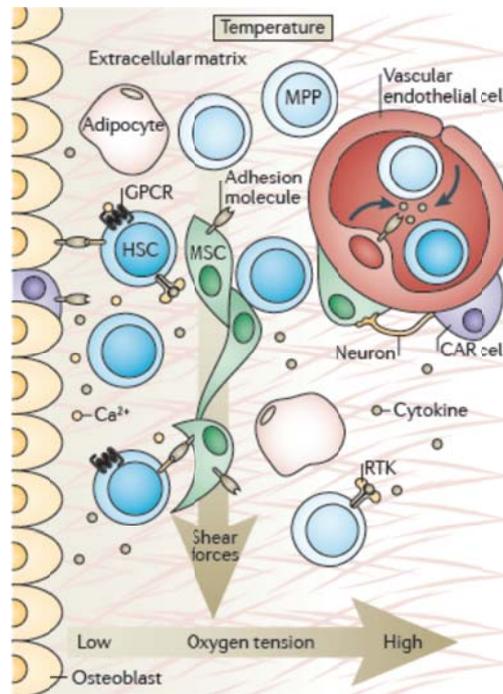


Si può quindi affermare che l'integrità funzionale e strutturale del sistema emopoietico è mantenuta da una popolazione relativamente piccola di CS localizzate principalmente nel midollo osseo. Tali cellule possono andare incontro a self-renewal per produrre più CS, o differenziare per produrre una

progenie che progressivamente è incapace di self-renewal e che è irreversibilmente commissionata ad uno o a un altro dei vari lineage emopoietici (32).

(Tesi Eugenia) Essenziale per il mantenimento ed il differenziamento delle CS emopoietiche (CSE) e per la loro maturazione è il microambiente a livello del midollo osseo, denominato nicchia della CSE (Figura 3). La nicchia staminale emopoietica è localizzata sulla superficie dell'osso trabecolare e si compone di una superficie endostale, interfacciata tra l'osso e la cavità del midollo osseo che è ricoperta da osteoblasti (nicchia osteoblastica), e un endotelio sinusoidale, a livello dei sinusoidi midollari (nicchia vascolare) (33). Le cellule della nicchia comprendono varie popolazioni stromali: oltre agli osteoblasti, ci sono cellule associate con le strutture vascolari quali cellule staminali mesenchimali, cellule CAR (CXCL12-abundant reticular cells) e cellule neuronali (34).

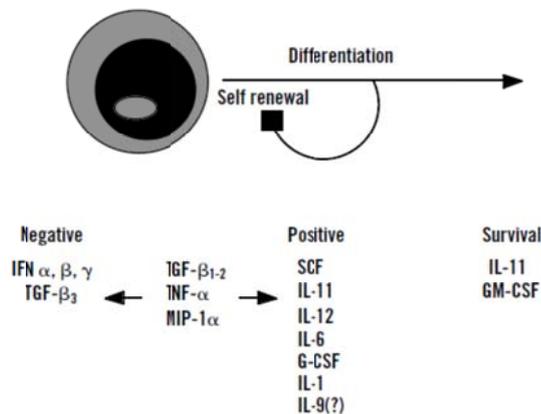
**Figura 3** La nicchia emopoietica (34).



La nicchia della CSE però, non svolge solo una funzione regolatoria (self-renewal, quiescenza e differenziamento), ma ha anche un fondamentale ruolo di attrazione, ritenzione e potenziale rilascio delle CS che vi risiedono (34).

I fattori prodotti sono essenziali per la sopravvivenza e proliferazione delle CS, tra questi: SCF, Trombopoietina, IL-3, IL-6, IL-11, FMS-like tyrosine kinase 3 (Flt-3) che agiscono in combinazione ed hanno effetto ridondante (35). A questi si unisce l'Osteopontina prodotta dagli osteoblasti. Oltre a regolatori positivi della crescita emopoietica, ci sono tutta una serie di mediatori solubili negativi come Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ), Interferone (INFs), Trasforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) e prostaglandine (Figura 4) (32).

**Figura 4** Effetto dei mediatori solubili su sopravvivenza (self-renewal) e differenziamento (34).



Sono numerose le molecole di adesione della famiglia delle integrine che hanno dimostrato di mediare l'interazione tra le CSE e le cellule stromali del midollo osseo, tra queste VCAM1, fibronectina, o ICAM (32).

Tuttavia recentemente si è iniziato a valutare come fattori della nicchia che regolano l'emopoiesi, anche alcuni fattori non proteici quali ioni di calcio, tensione di ossigeno, specie reattive dell'ossigeno (ROS), ma anche forze fisiche e meccaniche esercitate dai componenti della nicchia (34).

Le CSE sono state isolate sulla base della valutazione del fenotipo associato a saggi funzionali. Il primo marker di superficie individuato è stato l'antigene CD34, un ligando per la L-selectina, che è espresso dallo 0,5-5% delle cellule del sangue nel fegato fetale, nel cordone ombelicale e nel midollo adulto (35). L'antigene CD34 identifica una popolazione morfologicamente e immunologicamente eterogenea di cellule, che funzionalmente è caratterizzata

dalla capacità *in vitro* di generare aggregati clonali derivati dai progenitori precoci e tardivi, ed *in vivo* dalla capacità di ricostituire il sistema mielo-linfopoietico se iniettata in un ospite irradiato letalmente. L'espressione dell'antigene CD34 è associata alla concomitante espressione di molti altri "markers" che possono essere lineage-aspecifici, o lineage-specifici, cioè che identificano specifici "clusters" di differenziamento. Oltre a questi, le cellule CD34<sup>+</sup> esprimono recettori per numerosi fattori di crescita, che possono essere dotati di attività tirosin-chinasica, come il recettore per lo stem cell factor (CD117) e per il macrophage colony-stimulating factor, o senza attività tirosin-chinasica, come il recettore per il granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CDw116) (32).

I livelli di espressione di CD34 diminuiscono con il differenziamento, conseguentemente le cellule più immature (Colony Forming Unit-blast, Long Term Culture- Initiating Cell) esprimono i livelli più alti di CD34, mentre le più differenziate (CFU-G, CFU-M...) esprimono solo bassi livelli di CD34 (32).

La ricostituzione del sistema mielo-linfopoietico, in seguito a trapianto allogenico di CS CD34<sup>+</sup> in pazienti sottoposti ad un'alta dose di chemio- e radioterapia, identifica le cellule CD34<sup>+</sup> come le responsabili della ricostituzione emopoietica. Per le CSE la capacità a lungo termine di ricostituire le varie sottopopolazioni di cellule emopoietiche è stata valutata con lo xenotrapianto di modelli murini immuno-deficienti poi irradiati (35).

Già alla fine degli anni '90 (16) si era ipotizzato che le cellule derivanti dal midollo osseo potessero contribuire alla generazione di altri tessuti come muscolo, cuore, fegato e cervello. Studi di trapianto di CSE in topi letalmente irradiati (36) hanno dimostrato come le cellule dei donatori abbiano contribuito alla rigenerazione di tessuti non emopoietici: pelle, epitelio polmonare, intestinale e renale, ma anche parenchima epatico, pancreas, muscolo scheletrico, endotelio, miocardio e neuroni del sistema nervoso centrale nella corteccia e nel cervelletto (7).

Alcune CS possono migrare attraverso il sistema circolatorio e localizzarsi in tutti gli organi del corpo umano.

Le CS derivate dal midollo osseo possono migrare in diversi tessuti, alcuni dei quali sono stati documentati sperimentalmente: cuore, cervello, muscolo scheletrico, fegato (15). Il segnale di “homing” può derivare da un danno tissutale localizzato (e dai fattori prodotti: generici legati al danno o tessuto-specifici) e può influenzare la migrazione delle CS ad un sito specifico, in un modo che ricorda l’ ”homing” dei leucociti (15).

### **1.5 LE CELLULE STAMINALI CD133<sup>+</sup>**

L’antigene di superficie CD133 è una glicoproteina a 5 domini transmembranari, identificata sulla superficie di progenitori ematopoietici e precursori endoteliali, nel sangue periferico mobilizzato con G-CSF (37). L’espressione dell’ antigene CD133 diminuisce rapidamente quando i progenitori e le CS differenziano, e non risulta espresso su cellule endoteliali mature (38). L’espressione di CD133 è quindi downregolata durante il differenziamento (39), suggerendo che l’antigene debba essere considerato una “marker” precoce di staminalità. Infatti l’espressione dell’antigene CD133 è ristretta a cellule primitive e progenitori e ad alcuni sottogruppi di leucemie. Tuttavia il trascritto di CD133 lo si può ritrovare anche in normali tessuti non-linfoidei tra cui pancreas, rene, placenta.

Le cellule CD133<sup>+</sup> sono considerate emangioblasti, capaci cioè di differenziamento sia in senso ematopoietico che in senso endoteliale. Questo è stato dimostrato da Gehling et al., in uno studio di differenziamento *in vitro* (40). Le CS CD133<sup>+</sup>, ottenute da sangue periferico mobilizzato con G-CSF e separate con biglie immunomagnetiche, sono state fatte proliferare in coltura con Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e Stem Cell Factor (SCF). Dalle iniziali cellule CD133<sup>+</sup>, si sono originate due popolazioni di cellule: aderenti e non aderenti. L’analisi fenotipica sulla popolazione aderente, ha evidenziato l’espressione di “markers” endoteliali quali KDR, Tie-2, fattore vWF. Inoltre, le cellule aderenti, al microscopio elettronico, mostrano strutture compatibili con i corpi di Weibel-Palade, che si trovano esclusivamente nell’endotelio vascolare. Le cellule non aderenti, invece, sono in grado di dare origine sia a colonie emopoietiche che endoteliali in terreno semisolido. Quando poi, le cellule che

derivavano dalle cellule CD133<sup>+</sup> espansive in coltura sono state iniettate *in vivo* (topo SCID), sono state in grado di formare nuovi vasi sanguigni (40).

Le cellule CD133<sup>+</sup>, provenienti da midollo osseo, hanno anche dimostrato di ricostituire l'emopoiesi a lungo termine. Nell'esperimento di Yin et al., le CD133<sup>+</sup> umane da midollo osseo sono state trapiantate nel feto di pecora, dove hanno raggiunto con successo il midollo osseo. Le cellule CD133<sup>+</sup>, raccolte dal midollo osseo del primo ricevente, hanno attecchito con successo in un secondo ospite (41).

De Wynter et al. (42) hanno dimostrato che nelle colture a lungo termine con lo stroma midollare, le cellule CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> hanno capacità clonogenica superiore (di anche 100 volte) alle CD133<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>. Da questo lavoro risulta maggiore anche la capacità di attecchimento della popolazione CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> nel midollo osseo di topi NOD/SCID. Le cellule umane CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> sono rilevabili, nel midollo osseo del ricevente, già dopo 20 giorni dal trapianto, e continuano ad aumentare fino al 40° giorno, al contrario della popolazione CD133<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup> che non si dimostra in grado di raggiungere il midollo osseo. Questi risultati sono confermati anche da Gallacher et al (43), che hanno dimostrato che all'interno della popolazione del cordone ombelicale CD34<sup>-</sup> CD38<sup>-</sup> lineage<sup>-</sup>, le cellule CD133<sup>+</sup> erano l'unica sottopopolazione che poteva formare colonie emopoietiche in coltura. *In vivo*, queste cellule mostravano anche una capacità di attecchimento midollare 400 volte superiore alla sottopopolazione CD133<sup>-</sup>.

Anche nell'uomo, la popolazione CD133<sup>+</sup> dimostra di migliorare la ricostituzione midollare. Lang et al. hanno trapiantato 10 pazienti con due diverse popolazioni allogene: CD133<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>. Il pool di CS midollari è stato ricostituito con entrambe le popolazioni trapiantate. Le cellule CD133<sup>+</sup> quindi, possono essere impiegate con successo per il trapianto allogenico nell'uomo (44). Anche Bitan et al. (45) hanno riportato 5 ulteriori casi di trapianto di CS CD133<sup>+</sup>, da donatori di sesso diverso. Questa sperimentazione, oltre a dimostrare la completa ricostituzione midollare, ha evidenziato la sicurezza dell'utilizzo di cellule CD133<sup>+</sup> per il trapianto allogenico, in quanto non si verificano reazioni come la

Graft versus Host Disease (GvHD), sia letale acuta che cronica. Questi esperimenti confermano che CD133<sup>+</sup> è un importante marker di progenitori emopoietici.

Ma l'antigene CD133 risulta essere un marker staminale anche in altri tessuti oltre a quello emopoietico. Bussolati et al hanno dimostrato che una popolazione CD133<sup>+</sup>, isolata nell'adulto dal rene, è capace sia di self-renewal che di differenziamento multi-lineage *in vitro* e *in vivo*, e può contribuire alla rigenerazione tissutale nel rene, differenziando a formare sia la linea endoteliale che epiteliale (46).

Gli antigeni CD133 e CD34 sono espressi anche su progenitori endoteliali che contribuiscono all'angiogenesi ed alla vasculogenesi, sia durante la crescita tumorale che durante la cicatrizzazione delle ferite (47).

Anche nel tessuto nervoso sono state rilevate cellule CD133<sup>+</sup>, queste dimostrano *in vitro* capacità di differenziamento multi-lineage, sia in cellule gliali che in neuroni, come dimostra l'espressione di "markers" quali GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). Le cellule CD133<sup>+</sup> isolate dal tessuto nervoso, trapiantate in topi NOD/SCID, si dimostrano capaci di migrare nel cervello, attecchire, proliferare e differenziare in tessuto nervoso (48).

## **1.6 PROGENITORI ENDOTELIALI E CELLULE ENDOTELIALI CIRCOLANTI**

Oltre alle cellule emopoietiche e mesenchimali, nel midollo osseo è possibile ritrovare una popolazione di cellule staminali con potenzialità simili a quelle dell'angioblasto embrionale: queste cellule sono state definite precursori endoteliali. In particolare nel midollo sono presenti i Progenitori Endoteliali (CEP), mentre in circolo ritroviamo le Cellule Endoteliali Circolanti (CEC).

Le CEP hanno molte proprietà che le distinguono dalle CEC: la sopravvivenza, la capacità di formare colonie *in vitro* e la capacità di differenziarsi in cellule endoteliali mature. Le CEP, inoltre, possiedono la capacità di aumentare la rivascularizzazione e la rigenerazione endoteliale.

Al contrario, non è certo che le CEC siano in grado di sopravvivere, dal momento che sono meno capaci di formare colonie in vitro. Più in generale, le CEC e le CEP possono essere separate sulla base dell'identificazione dei loro markers di superficie: le CEP, essendo ad uno stadio più precoce, sono caratterizzate dall'espressione di markers di superficie immaturi, come il CD34, il CD133 ed il vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) (10). Le CEC, invece, sono ritrovate in circolo e si caratterizzano per una perdita dell'espressione del CD133 e del CD34, mentre sono CD146<sup>+</sup>. Esse sono molto rare e sono prodotte dal rivestimento dei vasi sanguigni e sono rilasciate in caso di danno a livello vascolare. Queste cellule sono da poco usate anche come marcatori tumorali, in quanto risultano livelli aumentati nei pazienti metastatici. Studi recenti mostrano come il numero delle CEC sembra essere più alto nei pazienti con malattie progressive, rispetto a quelli con malattie stabili, anche se in realtà ancora non si è definito un range di normalità dei loro livelli circolanti.

## **1.7 CITOCHINE MOBILIZZANTI CELLULE STAMINALI/PROGENITORI ENDOTELIALI**

La rigenerazione del parenchima epatico a seguito di un danno di natura meccanica, chimica o immune consiste in un evento estremamente complesso e controllato, fino al livello molecolare. Studi atti a chiarire i fattori che regolano questo processo necessariamente devono includere valutazioni morfologiche, fisiologiche, biochimiche e molecolari.

Un immediato deficit della funzione epatica, ad esempio indotto dalla perdita di parenchima successivo ad epatoresezione, produce un immediato rilascio del Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e dell'interleuchina 6 (IL-6) e dei fattori di crescita hepatocytes growth factor (HGF) e epidermal growth factor (EGF). Tali fattori indurrebbero lo shift epatocitaria dalla fase G0 a quella G1, promuovendo l'attività replicativa delle cellule epatiche.

Recenti evidenze hanno suggerito inequivocabilmente che IL-6 costituisce un fattore chiave nella rigenerazione epatica, i cui effetti sono mediati dall'interazione dal suo recettore STAT3. Tale interazione promuove una serie di

eventi biomolecolari che risultano in una marcata ed efficace proliferazione cellulare. L'attivazione del segnale indotto da IL6/STAT3 è importante non solo successivamente alla resezione, ma anche in seguito al danno da ischemia fredda/riperfusionione prima del trapianto (49).

Lo stromal derived factor-1-alpha (SDF-1 $\alpha$ ), mediante l'interazione con il suo recettore CXCR4, costituisce una citochina nota per giocare un ruolo chiave sull'emopoiesi fetale ed adulta.

Il ruolo di questa citochina è stato investigato anche nella rigenerazione epatica: in modelli animali di danno epatico massivo, il recettore CXCR4 è risultato sovraespresso sulle cellule emopoietiche, così come la concentrazione sierica del SDF-1 $\alpha$ . Da queste osservazioni è emerso che questa citochina si comporti come che mio-attrattivo nei confronti delle HSC, regolando la mobilitazione di progenitori cellulari dal midollo in circolo; e successivamente, mediante un gradiente di concentrazione, come tali cellule vengano specificamente indirizzate al sito del danno. Tali modificazioni non si sono ugualmente osservate in corso di danno epatico di lieve entità, suggerendo che il complesso SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 sia il principale fattore coinvolto nella regolazione dei tentativi di rigenerazione epatica da fonti extraepatiche, in corso di danno epatico (50).

## CAPITOLO 2

---

### IL FEGATO

#### 2.1 LA RIGENERAZIONE EPATICA

##### 2.1.1 La componente parenchimale

Peculiarità anatomiche e funzionali rendono il fegato un organo altamente specializzato ed essenziale per il mantenimento dell'omeostasi dell'organismo, ma anche per questo suscettibile ad insulti di diversa natura. La notevole riserva funzionale del fegato (n.b. il 30% della massa epatica è sufficiente a garantire lo svolgimento di una corretta funzione) è in grado di spiegare la capacità dell'organo di sostenere insulti di grandi proporzioni e di subire, spesso in modo silente, danni causati da virus, farmaci e agenti tossici.

Allo stato attuale delle conoscenze, si ritiene che la rigenerazione epatica sia mediata in primis dagli epatociti maturi, i quali, in seguito al verificarsi di un danno che comporti perdita di cellule vitali, sono in grado di rientrare nel ciclo cellulare passando dalla fase G0 alla fase G1. Gli studi condotti sugli animali da esperimento, in cui è stata realizzata una epatectomia sub- totale (>70% della massa epatica originale), hanno messo in evidenza che con soli 1.4 cicli per cellula la massa epatica originaria viene ripristinata entro 7 giorni dall'intervento. Questo dimostra l'esistenza di un "burst" replicativo in base al quale virtualmente il 90% degli epatociti rientra in ciclo cellulare dopo l'epatectomia (51).

L'esistenza di una componente staminale epatica, alternativa agli epatociti, è da tempo enormemente controversa. Nel 1958, Wilson e collaboratori (52) descrissero, per la prima volta, una popolazione di cellule localizzate nei dotti biliari più distali capaci di dare origine sia ad epatociti che a colangiociti. Anche studi successivi (53) suggerirono che gli epatociti ed i colangiociti potessero avere un progenitore comune.

I canali di Hering sono stati identificati come la sede di origine di questi elementi cellulari bipotenti, conosciuti alternativamente come "*cellule ovali*" nell'animale

da esperimento e “*progenitori epatici*” nell’uomo (51). Volendo applicare il concetto di cellula staminale a questo sistema, è verosimile che le cellule ovali, o progenitori epatici, rappresentino in realtà una progenie cellulare intermedia (“*transit amplifying cells*”) tra una cellula staminale epatica totipotente, per il momento non ancora identificata, e gli epatociti ed i colangiociti maturi. La capacità delle cellule ovali di proliferare in condizioni di danno tossico, quando gli epatociti sono necrotici o apoptotici, è verosimilmente secondaria alla minore espressione in queste cellule immature di diverse isoforme di citocromo e pertanto alla minore produzione di metaboliti tossici intermedi che invece danneggiano gli epatociti maturi (54).

L’attività replicativa delle cellule ovali si manifesta pertanto nell’ambito di un tessuto epatico fortemente compromesso dalla persistente necrosi epatocitaria e potrebbe essere finalizzata al ripristino della massa cellulare perduta (anche se le evidenze in letteratura in tal senso sono tuttora scarse).

Gli esperimenti condotti sui roditori sono stati cruciali per lo studio della risposta proliferativa mediata dalle cellule ovali in diversi modelli di danno epatico, risposta che in un fegato sano sottoposto esclusivamente ad epatectomia parziale è altrimenti mediata dagli epatociti e non dai progenitori. La bipotenzialità delle cellule ovali è testimoniata dall’espressione di marcatori di superficie tipici sia degli epatociti maturi [citocheratina (CK) – 18] che dei colangiociti (CK-19). Un’ulteriore conferma della bipotenzialità delle cellule ovali deriva da alcuni esperimenti in cui epatociti e colangiociti sono stati ottenuti *in vitro* dalla differenziazione di linee cellulari di cellule ovali. Tuttavia, la mancanza di un marcatore esclusivo per l’isolamento delle cellule ovali rende tale popolazione cellulare estremamente elusiva e questo ha generato negli anni numerose speculazioni. In particolare, alcuni anni fa (55), la scoperta dell’espressione di marcatori staminali emopoietici, quali il CD34 e Sca-1, sulle cellule ovali, ha dato origine all’ipotesi secondo la quale potrebbe esistere, tra midollo osseo e fegato, un traffico attivo di cellule staminali, e pertanto il midollo osseo potrebbe essere coinvolto nei meccanismi di rigenerazione epatica durante il danno.

Benché studiata da più tempo e pertanto maggiormente conosciuta nei roditori, l'attivazione dei progenitori epatici, nota anche come *reazione duttulare*, è stata descritta anche nelle malattie croniche del fegato nell'uomo. In tali patologie, il grado di attivazione dei progenitori aumenta all'aumentare della severità di malattia. Nell'infiammazione moderata e severa si osserva la comparsa di *epatociti intermedi* che hanno un fenotipo a metà tra il progenitore epatico/cellula duttulare e l'epatocita maturo. Il numero di questi epatociti intermedi aumenta progressivamente all'aumentare del grado di infiammazione e necrosi sia nelle epatiti virali che nell'epatopatia alcolica in stadio avanzato. Questo suggerisce un maggior grado di differenziazione dei progenitori epatici in epatociti quando il danno epatocitario è più severo. Falkowski e collaboratori (56) hanno documentato, in un modello tridimensionale *in vitro*, che nella cirrosi epatica piccoli accumuli isolati di epatociti sono presenti ai margini della reazione duttulare suggerendo una possibile origine dai progenitori epatici. Uno stimolo all'attivazione dei progenitori è certamente la perdita della capacità di proliferare da parte del compartimento cellulare maturo. Parallelamente a quanto conosciamo dai modelli sperimentali nei roditori, anche nelle malattie del fegato nell'uomo la replicazione degli epatociti maturi è deficitaria. Nelle patologie epatiche croniche nell'uomo, il deficit replicativo è secondario, sembra, alla senescenza degli epatociti, i cui telomeri si accorciano progressivamente a causa del perdurare della stimolo che induce necrosi e proliferazione (57). Anche l'infiammazione cronica, la presenza di fattori di crescita ed il danno al DNA legato alle specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, potrebbero giocare un ruolo importante nella senescenza degli epatociti.

### 2.1.2 *La componente non parenchimale*

Come già accennato, il tessuto epatico è formato da elementi epiteliali (epatociti, colangiociti), cellule non parenchimali (cellule di Kupffer, cellule endoteliali, cellule stellate, ecc...) e stroma. Lo stroma è presente negli spazi portali e nello spazio di Disse. L'importanza di questa "società di cellule" e dello stroma è illustrata dal fatto che gli epatociti che hanno una enorme capacità proliferativa

in vivo quando vengono isolati e messi in coltura difficilmente rimangono a lungo vitali e di rado sono in grado di proliferare.

Esiste uno scambio continuo di informazioni tra i diversi tipi cellulari e lo stroma circostante. Le cellule stellate producono fattori di crescita per gli epatociti e per i progenitori epatici, come il fattore di crescita epatocitario (“hepatocyte growth factor – HGF”), producono inoltre il TGF- $\beta$  (“transforming growth factor- $\beta$ ”) che blocca la proliferazione degli epatociti mentre non è in grado di disattivare la proliferazione dei progenitori epatici. Le cellule endoteliali producono il fattore di crescita noto come TWEAK (“transforming growth factor like weak inhibitor of apoptosis”) il quale sembra essere un fattore di crescita specifico per le cellule ovali non in grado invece di agire sugli epatociti maturi. Infine, i macrofagi e le cellule del Kupffer partecipano attivamente ai processi di rimodellamento della matrice extracellulare attraverso la produzione di specifici enzimi di degradazione noti come metallo-proteinasi (“matrix metalloproteinase” – MMP) (58). E’ da tempo noto che, non solo le interazioni cellula-cellula ma anche le interazioni cellula-matrice sono fondamentali nel regolare il comportamento ed il destino delle cellule staminali. E’ verosimile che l’interazione cellula-matrice giochi un ruolo importante nell’indirizzare la cellula staminale verso la divisione simmetrica o asimmetrica. La membrana basale dei dotti biliari nel fegato comprende laminina e collagene IV. L’espressione del gene della laminina è stata documentata nelle cellule non parenchimali ed in particolare sia nelle cellule stellate sia nelle cellule endoteliali (59). Nel modello di danno epatico nel ratto indotto dall’epatectomia parziale e dalla somministrazione di 2-AAF è stata documentata la presenza di una ricca membrana basale formata da laminina che circonda le cellule ovali. Il dato interessante è che non si osservano cellule ovali al di fuori dell’impalcatura di laminina (60). E’ ipotizzabile pertanto che anche nel tessuto epatico la membrana basale, prodotta dalle cellule non parenchimali attivate in risposta al danno, possa orientare la proliferazione e la differenziazione dei progenitori epatici verso la formazione di nuovi progenitori o verso la produzione di i epatociti intermedi, colangiociti e di epatociti maturi.

## 2.2 INSUFFICIENZA EPATICA E CIRROSI

Con il termine di *insufficienza epatica* si indentifica l'insieme di tutte quelle situazioni patologiche che hanno come comune denominatore una grave compromissione delle funzioni del fegato.

L'insufficienza epatica si distingue in acuta, quando insorge in pazienti senza precedenti di epatopatia (acute liver failure, ALF), acuta su patologia cronica quando si osserva uno scompenso acuto in corso di epatopatia cronica (acute on chronic) e cronica terminale (end stage liver disease, ESLD).

La causa di gran lunga più frequente di ESLD è la cirrosi epatica in stadio avanzato che comporta una grave alterazione delle fisiologiche attività del fegato. Il termine "cirrosi" è stato per la prima volta proposto da Laennec nel 1826, per descrivere il fegato di un paziente che all'autopsia mostrava superficie bozzoluta e raggrinzita, ed un colorito giallo-grigiastro (61).

La cirrosi è un processo irreversibile ed è caratterizzata dal rimaneggiamento della struttura epatica, che viene sostituita da noduli di rigenerazione e depositi di fibre di collagene. Nella cirrosi si hanno, quindi, da un lato cellule epatiche normali che risultano danneggiate e sostituite da tessuto cicatriziale (fibrosi) e dal altro la comparsa di noduli di rigenerazione di cellule epatiche mal funzionanti.

Tutto ciò provoca una grande alterazione della struttura epatica che influisce sulla circolazione sanguigna in quanto si verifica un aumento della pressione a livello della vena porta. Questa ipertensione si associa ad altre alterazioni di tipo metabolico, ormonale e renale. Inoltre l'anomalo funzionamento del fegato determina alcune complicazioni quali l'ittero, causato dalla ridotta secrezione di bilirubina; la comparsa di edemi periferici ed ascite provocati dalla ridotta produzione di albumina; aumento del rischio di emorragie causato dalla ridotta produzione di fattori della coagulazione aumenta il rischio di emorragie.

Le cause che portano allo sviluppo della cirrosi sono diverse, la più frequente in Italia e in molti Paesi sviluppati è l'epatite C (HCV). Si stima che nel nostro Paese questo virus sia presente anche nel 60-70% dei casi di cirrosi e di tumori al fegato. L'HCV è anche la più comune infezione trasmissibile per via parenterale.

Per quanto riguarda invece la cirrosi da epatite B (HBV), essa è in netto calo nel nostro Paese mentre rappresenta ancora la causa principale nella maggior parte dell'Asia e dell'Africa sub-sahariana. Nel caso dell'infezione da HBV, ci può essere anche un'associazione con l'infezione da epatite D (HDV), un virus "difettivo", che richiede cioè la contemporanea presenza dell'infezione del virus B per permetterne la produzione. In generale le persone con la duplice infezione HBV+HDV possono presentare una più rapida progressione verso la cirrosi epatica e la determinazione della fase di scompenso. È stimato che circa il 10% delle epatiti dei Paesi Occidentali sia rappresentato dalle epatiti virali.

Accanto alle epatiti virali grande importanza ha la cirrosi da epatite alcolica, che oltre ad essere causa di cirrosi come fattore singolo, può essere associata alla presenza di infezione da virus B o C. Si stima infatti che circa il 40% dei decessi per cirrosi sia dovuto ad epatopatia alcolica.

Oltre a queste principali cause di cirrosi possiamo ricordare anche le epatiti autoimmuni, iatrogene, criptogenetiche e epatopatie riconducibili a disordini metabolici o cause vascolari (62).

Il decorso della cirrosi si divide sostanzialmente in due fasi:

- a) la prima fase, di compenso, che può essere lunga ed asintomatica, in quanto non sono presenti disturbi.
- b) la seconda fase, di scompenso, caratterizzata dai sintomi tipici del problema ormai evoluto.

La probabilità di evoluzione alla seconda fase cresce con il passare del tempo e può essere determinata da un evento anche banale come un'infezione batterica. Sono rari i casi in cui la cirrosi rimane sempre asintomatica e viene diagnosticata casualmente o post-mortem durante autopsia eseguita per altre cause. Il rischio di sviluppare un tumore primitivo del fegato è di circa 2-7% l'anno (62).

Attualmente l'unico trattamento disponibile per i disordini epatici cronici in fase avanzata (ESLD) è il trapianto ortotopico di fegato. Ciò però non è sempre possibile a causa del ridotto numero di organi disponibili che, sebbene siano in crescita, non riescono a soddisfare tutte le richieste e per il fatto che non tutti i pazienti sono eleggibili per il trapianto. Inoltre, per quanto riguarda pazienti con

HCV, il trapianto di fegato non è curativo poiché il virus può colpire anche l'organo trapiantato. Sulla base di queste premesse risulta quindi importante sviluppare nuove strategie e approcci terapeutici.

### **2.3 TRAPIANTO DI FEGATO**

Il trapianto di fegato (in inglese Orthotopic Liver Transplantation, OLT) cioè la sostituzione del fegato nativo, malato, con un fegato sano o con parte di esso da donatore cadavere o vivente, rappresenta la terapia di scelta per pazienti affetti da epatopatie acute o croniche in fase avanzata che non abbiano opzioni medico-chirurgiche alternative. L'indicazione si pone quando il paziente è in condizioni cliniche tali da rendere poco verosimile una sopravvivenza prolungata senza sostituzione d'organo, ma è ancora in grado di tollerare la procedura chirurgica.

Purtroppo, nonostante il notevole impegno clinico e organizzativo, il numero di donatori disponibili non è sufficiente a poter effettuare il trapianto in tutti i pazienti che ogni anno sono già in lista e a quanti vengono inseriti come nuovi casi. Questo significa che una certa quota di pazienti non riuscirà ad essere trapiantata in tempo in rapporto alla progressione e alla severità della malattia epatica. Nel 2011 in Italia il tempo di attesa medio per un trapianto di fegato è stato di 2.1 anni ed il tasso di mortalità in lista del 7.13% (63).

Questi numeri da una parte sottolineano la validità complessiva del sistema trapianti di fegato, dall'altro chiaramente indicano che c'è bisogno di trovare strategie alternative per poter ridurre ulteriormente la mortalità in lista di attesa per trapianto. Inoltre, non dobbiamo dimenticare che alcuni pazienti arrivano allo stadio terminale dell'epatopatia senza poter fruire del trapianto di fegato per la presenza di controindicazioni.

### **2.4 ALTERNATIVE AL TRAPIANTO DI FEGATO**

Sebbene il trapianto di fegato costituisca una procedura standardizzata per le epatopatie terminali, la scarsa disponibilità di organi rende tuttora elevata la mortalità in lista d'attesa. In conseguenza, molti sforzi si stanno rivolgendo ad attuare delle misure alternative; fra queste, è oggetto di particolare attenzione la

possibilità di allestire una terapia cellulare epatologica, ossia l'utilizzo di cellule viventi per ripristinare, mantenere o migliorare la funzione dell'organo.

Questa strategia, in rapida evoluzione, si pone come alternativa, ed anche come supporto al trapianto di fegato, e comprende l'uso di sistemi extracorporei (fegato bioartificiale) ed il trapianto cellulare.

Lo sviluppo di queste metodologie fortemente innovative ha suscitato grandi aspettative, sia nella comunità scientifica che fra i pazienti, anche in seguito alla notevole diffusione dei media di informazioni; tuttavia, si tratta di metodiche ancora sperimentali, la cui efficacia non è stata sufficientemente dimostrata.

#### *2.4.1 Fegato bioartificiale*

Il concetto di supporto artificiale al fegato risale alla seconda metà del secolo scorso, mentre il termine di fegato bioartificiale (BAL) si può far risalire ad un lavoro orientale del 1986.

Il fegato bioartificiale (64) è un sistema di supporto delle funzioni epatiche, costituito da una componente biologica (epatociti) e da una struttura artificiale che funge da supporto alle cellule e da interfaccia con il sangue o con il plasma del paziente. Il sistema è collegato alla circolazione venosa del paziente e consiste generalmente in un apparato per la separazione del plasma, che viene poi convogliato attraverso il bioreattore contenente le cellule epatiche, ove avvengono gli scambi metabolici. Il plasma così trattato viene successivamente restituito al paziente.

Esiste un consenso generale a livello internazionale sul fatto che l'epatite fulminante costituisca la patologia elettiva per i sistemi di assistenza metabolica epatica, data la gravità e la relativa omogeneità della condizione clinica e la possibilità di recupero spontaneo della funzione epatica.

#### *2.3.2 Trapianto di epatociti isolati*

Il trapianto di epatociti isolati è oggetto di crescente attenzione come possibile terapia alternativa; le tecniche che consentono di isolare epatociti funzionalmente attivi dal fegato sono ormai ben standardizzate, ed il trapianto di epatociti è stato eseguito con successo negli ultimi 30 anni in molti modelli animali di deficit

congeniti del metabolismo epatici o di insufficienza epatica globale, con risultati significativi sia sulla correzione del difetto metabolico specifico che sulla sopravvivenza (65). Gli epatociti infusi nella circolazione portale superano l'endotelio vascolare e si integrano nella lamina degli epatociti nativi (66).

La valutazione del numero di epatociti necessari a supplire la funzione epatica in modo significativo costituisce un problema chiave per il successo di questa terapia.

Attualmente, le patologie epatiche sulle quali in trapianto cellulare potrebbe avere un impatto clinico rilevante sono l'insufficienza epatica acuta, i deficit funzionali dell'epatocita di natura ereditaria e le epatopatie croniche acquisite.

In sintesi, l'ostacolo maggiore per la diffusione del trapianto di epatociti è costituito dalla difficoltà di approvvigionamento di cellule da fegati giudicati non idonei per il trapianto d'organo, ma adeguati per isolamento e trapianto cellulare.

Inoltre, permangono dubbi sull'efficacia del trattamento a lungo termine. Lo sviluppo della terapia cellulare in epatologia attualmente ancora in fase sperimentale, dipenderà verosimilmente da due fattori principali: la disponibilità di una fonte adeguata di cellule adatte al trapianto (epatociti differenziati, epatociti fetali, cellule staminali e/o progenitrici, purchè in grado di svolgere le funzioni dell'epatocita in vivo). Il secondo fattore limitante è costituito da una migliore comprensione dei meccanismi che regolano la crescita delle cellule trapiantate

## **2.5 LA TERAPIA CELLULARE NEI DISORDINI DEL FEGATO**

Nel fegato esiste una popolazione di cellule staminali adulte, le cellule ovali, che hanno una grande capacità proliferativa. Queste cellule, assieme agli epatociti, sono in grado di sostenere il normale turnover fisiologico e di rigenerare il tessuto epatico in seguito a danno non molto esteso. Esse però sono cellule già adulte e quindi sono dotate di una scarsa capacità replicativa e, se il danno è severo, non sono in grado di intervenire. La terapia cellulare potrebbe quindi rappresentare una potenziale alternativa al trapianto d'organo.

In questi ultimi anni, numerosi studi condotti sia su modelli animali sia sull'uomo hanno dimostrato che cellule staminali di derivazione midollare possono differenziare in senso epatocitario e contribuire alla rigenerazione di epatociti e colangiociti. Tale fenomeno, poco evidente in condizioni fisiologiche, risulterebbe particolarmente rilevante in presenza di danno epatico.

Una delle prime evidenze decisive a supporto del concetto di transdifferenziazione (o plasticità) è stata portata da Lagasse et al. (67) che ha trapiantato circa 50 cellule emopoietiche purificate in topi affetti da un difetto epatico altrimenti letale. In particolare è stato preso in considerazione un topo deficitario per il gene codificante l'enzima FAH (Fumaril Acetoacetato Idrolasi) e sono state comparate le capacità di diverse popolazioni cellulari purificate del midollo osseo di rigenerare il fegato. L'unica popolazione risultata in grado di contribuire alla rigenerazione epatica è stata quella staminale emopoietica esprime fenotipicamente gli antigeni c-kit<sup>high</sup>, Thy1<sup>low</sup>, Sca1<sup>+</sup> e Lin<sup>low</sup>. Il trapianto di un così basso numero di cellule, la loro specifica caratterizzazione fenotipica e l'acquisizione della nuova funzionalità cellulare dimostrano la plasticità di queste cellule, anche se in realtà sembrerebbe determinante il meccanismo di fusione cellulare tra epatociti e precursori mielomonocitari piuttosto che una vera e propria transdifferenziazione (68).

Un ulteriore studio in cui sono state utilizzate cellule staminali emopoietiche in presenza di danno epatico è quello di Theise et al. (69), che ha mostrato come il trapianto di cellule staminali emopoietiche altamente purificate in animali mieloablati mediante radiazioni possa portare ad un ripopolamento epatico a breve termine.

In altri studi in modelli animali, ratti di sesso femminile, irradiati al fine di indurre una completa mieloablazione, e sottoposti a trattamento in grado di indurre un severo danno epatico (acetaminofuorene/tetracloruro di carbonio) sono stati trapiantati con cellule midollari di ratti di sesso maschile adeguatamente marcate. Nei casi in cui era stato causato il danno epatico, sono stati riscontrati nel fegato epatociti di origine del donatore (70). Anche nell'uomo sono state analizzate biopsie epatiche di pazienti di sesso femminile che avessero

ricevuto trapianti di midollo osseo da donatori di sesso maschile e pazienti di sesso maschile trapiantati con fegato di donatori femminili: i risultati hanno dimostrato un riscontro di cellule a fenotipo epatocitario positive per il cromosoma Y (71).

Evidenze sperimentali recenti dimostrano che cellule staminali midollari vengono mobilizzate dal midollo in periferia e, successivamente, vengono attratte verso la sede del danno contribuendo alla riparazione tissutale. Ghelting e Coll. hanno recentemente descritto la mobilizzazione spontanea di cellule staminali emopoietiche CD133<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> in donatori sani di fegato: tali cellule sono in grado di dare origine ad una popolazione cellulare esprimente marcatori epatocitari (72). Una mobilizzazione spontanea di progenitori emopoietici ed endoteliali è stata inoltre documentata in pazienti con malattia epatica terminale dopo trapianto di fegato (73). La lesione tissutale che causa cambiamenti nel microambiente, fattori proliferativi e differenziativi giocano sicuramente un ruolo importante nel “recruitment” delle cellule staminali. Sono stati, infatti, documentati segnali di “homing” capaci di influenzare la migrazione delle cellule circolanti. È stato infatti recentemente descritto in modelli murini che ci sarebbe un’upregolazione della produzione di Stromal Derived Factor-1 (SDF-1) da parte degli epatociti danneggiati, con conseguente “recruitment” di cellule staminali midollari circolanti CXCR4<sup>+</sup> (recettore per l’SDF-1) verso l’organo danneggiato (74).

Il danno epatico cronico è invariabilmente accompagnato da una progressiva fibrosi. Numerosi studi hanno dimostrato la capacità di cellule staminali di derivazione midollare di migliorare la fibrosi in modelli animali: cellule CD133<sup>+</sup> espanso ex-vivo, trapiantate in topi o ratti trattati con CCl<sub>4</sub>, si localizzano in aree di necrosi epatica e fibrosi, inducendo una riduzione della fibrosi epatica, un miglioramento della funzione epatica, un incremento della proliferazione degli epatociti e la rigenerazione dei sinusoidi epatici.

In un modello animale in cui veniva indotta la cirrosi in seguito a somministrazione di tetracloruro di carbonio (CCl<sub>4</sub>), si è visto che l’infusione di cellule staminali midollari ha permesso la ripopolazione del fegato, ma

soprattutto si è notata una riduzione della fibrosi, un aumento della sintesi di albumina ed un complessivo miglioramento della sopravvivenza (75).

Cellule CD133<sup>+</sup> espanse ex-vivo, trapiantate in topi o ratti trattati con CCl<sub>4</sub>, si localizzano in aree di necrosi epatica e fibrosi, inducendo una riduzione della fibrosi epatica, un miglioramento della funzione epatica, un incremento della proliferazione degli epatociti e la rigenerazione dei sinusoidi epatici.

Anche nell'uomo il trapianto di cellule staminali midollari autologhe ha portato risultati positivi. Infatti, si è avuta un'accelerazione nella rigenerazione epatica in tre pazienti sottoposti a epatectomia (25), mentre si è evidenziato un notevole miglioramento della funzionalità epatica in nove pazienti cirrotici (75).

## **2.6 UTILIZZO DEL G-CSF PER LA MOBILIZZAZIONE DI CELLULE STAMINALI MIDOLLARI**

La scoperta della possibilità di migrazione di cellule staminali midollari al fegato e di differenziare in senso epatocitario contribuendo alla rigenerazione epatica, ha suggerito l'ipotesi che sia possibile stimolare con fattori di crescita midollari una massiccia mobilizzazione di cellule staminali dal momento che, in condizioni non patologiche, ma anche nella cirrosi epatica, il numero circolante di tali cellule è ridotto. Il principale fattore di crescita utilizzato è il G-CSF, una glicoproteina di 19-22 Kda prodotta dai monociti/macrofagi, fibroblasti, cellule endoteliali e granulociti e il cui recettore specifico è il CD114. La sua funzione è quella di influenzare la proliferazione e la differenziazione dei granulociti (76). Il G-CSF è già comunemente utilizzato in ambito ematologico per stimolare la mobilizzazione di cellule staminali emopoietiche dal midollo. Viene inoltre utilizzato in pazienti epatopatici come terapia di supporto nelle neuropenie secondarie a terapia antivirale, ma anche in pazienti cirrotici al fine di ridurre il rischio di infezioni.

La somministrazione del G-CSF in modelli animali con epatectomia parziale accelera e aumenta la capacità rigenerativa del fegato, mentre in modelli animali con danno cronico dovuto a somministrazione di CCl<sub>4</sub> aumenta in maniera significativa il numero degli epatociti di origine midollare (77). Ciò che ancora

non è ben chiaro è il meccanismo d'azione del G-CSF. In particolare non si conosce esattamente se esso agisca indirettamente sulle cellule del midollo o se agisca a livello del microambiente epatico in maniera tale da stimolare la mobilizzazione delle cellule dal midollo. A tal proposito, uno studio del 2007 ha dimostrato che le cellule ovali epatiche esprimono sulla loro superficie il recettore per il G-CSF e che questo ha sulle cellule ovali un effetto chemoattrattivo (78).

Di conseguenza è stato ipotizzato che il G-CSF contribuisca alla rigenerazione epatica aumentando, da un lato, la migrazione dei progenitori midollari al fegato e, dall'altro, favorendo la reazione endogena delle cellule ovali del fegato.

### PARTE SPERIMENTALE

#### 3.1 RAZIONALE DELLO STUDIO

Il trapianto di fegato rappresenta l'unica terapia per le patologie epatiche terminali. Tuttavia solo una parte dei pazienti soddisfa i criteri di trapiantabilità e, tra i possibili candidati, un numero ancora molto rilevante e inaccettabile muore in lista d'attesa a causa della gravità della malattia e soprattutto della scarsità di organi disponibili. In questo scenario è di imprescindibile necessità la ricerca di strategie terapeutiche alternative. Tra queste l'uso di cellule staminali. Le evidenze sperimentali suggeriscono infatti che le cellule staminali extraepatiche, in particolare quelle di derivazione midollare emopoietica siano coinvolte nei processi di rigenerazione epatica e dunque potrebbero essere in grado di riparare il tessuto epatico danneggiato "dall'interno".

Nonostante alcuni studi su modelli animali (79-81), le esperienze sull'uomo sono limitate (71, 82-85). In particolare gli studi clinici sono del tutto preliminari, condotti su piccoli campioni di pazienti e con considerevole variabilità e scarsa caratterizzazione delle cellule staminali utilizzate. A tal proposito bisogna inoltre ricordare che non è ancora noto con esattezza quale tipo di cellula staminale di origine midollare sia in grado di ripopolare il fegato.

In una precedente esperienza, il nostro gruppo di ricerca (86) ha dimostrato che la somministrazione di G-CSF a pazienti affetti da cirrosi epatica è in grado di mobilitare cellule staminali CD133<sup>+</sup> nel sangue periferico al pari di quanto si osserva nel soggetto sano anche se le dosi necessarie alla mobilitazione sono superiori. Il trattamento con G-CSF è comunque privo di effetti collaterali e, rispetto al prelievo di midollo osseo, rappresenta un modo più semplice e meno traumatico, per ottenere cellule staminali autologhe. Sulla scorta di tale esperienza nella quale mediante leucoferesi erano state ottenute cellule CD133<sup>+</sup> dal sangue periferico di pazienti affetti da cirrosi epatica pretrattati con G-CSF a

dosi mobilizzanti, si è deciso di valutare gli effetti della reinfusione intraepatica di queste stesse cellule sulla funzione epatica residua.

La scelta di tale tipo cellulare deriva dal fatto che le cellule staminali midollari CD133<sup>+</sup> oltre a dare origine a cellule della serie emopoietica hanno anche un potenziale differenziativo in senso endoteliale e pertanto in caso di ischemia tissutale o in modelli animali di danno d'organo sono in grado di contribuire alla neoangiogenesi (87, 88). Inoltre, essendo espresso anche su linee di cellule embrionali, cellule neurali fetali e progenitori adulti multipotenti, l'antigene CD133 identifica verosimilmente una popolazione di cellule midollari multipotenti circolanti con maggiori capacità differenziative e di plasticità rispetto alle più conosciute, ma verosimilmente meno plastiche, cellule staminali emopoietiche CD34<sup>+</sup>.

E' stato quindi condotto uno studio clinico di fase I allo scopo di valutare la sicurezza di impiego e l'efficacia sulla funzione epatica residua della reinfusione intraepatica di un numero crescente di cellule staminali autologhe CD133<sup>+</sup> altamente purificate in pazienti affetti cirrosi epatica. Nell'ambito di tale studio clinico principale, è stato svolto uno studio biologico ancillare in collaborazione con l'Unità Operativa di Ematologia "L.&A. Seràgnoli" e con la Cell Factory Calori, Fondazione IRCSS Cà Granda, Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, allo scopo di caratterizzare fenotipicamente e funzionalmente le cellule staminali circolanti e di valutare l'influenza del trattamento di reinfusione delle cellule staminali CD133<sup>+</sup> sulla produzione di citochine coinvolte nell'"homing" delle cellule staminali e nella rigenerazione tissutale.

### **3.2 SCOPO DELLO STUDIO**

Gli obiettivi dello studio sono:

1. determinare il fenotipo delle cellule staminali circolanti mediante analisi citofluorimetrica con l'ausilio di anticorpi monoclonali specifici per antigeni endoteliali (CD31, CD146, CD45, KDR, CD105, CD117), emopoietici (CD34, CD90, CD184) e recettori epatocitari (C-Met);
2. valutare la capacità clonogenica dei progenitori emopoietici ed endoteliali;

3. caratterizzare fenotipicamente e funzionalmente le cellule staminali CD133+ altamente purificate;
4. valutare l'andamento di alcune citochine sieriche quali: Stromal Derived Factor-1 (SDF-1), Hepatocyte Growth Factor (HGF) e Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).

### **3.3 MATERIALI E METODI**

#### *3.3.1 Descrizione dello studio clinico*

Lo studio clinico prevedeva l'arruolamento di pazienti adulti ( $\geq 18$  anni) affetti da cirrosi epatica in fase terminale definita in base ad un punteggio di MELD (Mayo Model for End Stage Liver Disease) compreso tra 17 e 25. L'inserimento in lista per trapianto di fegato non costituiva criterio di esclusione. Tutti i pazienti venivano trattati con G-CSF (Lenograstim, Aventis Pharma, Filgrastim, Amgen) per via sottocutanea alla dose  $7,5\mu\text{g}/\text{Kg}$ /due volte al giorno a partire dal primo giorno (T0) fino ad ottenere un'adeguata mobilitazione di cellule CD133<sup>+</sup> nel sangue periferico (almeno 8 cellule CD133<sup>+</sup>/ $\mu\text{l}$ ) tale da consentirne la raccolta mediante leucoferesi. La conta del numero di cellule CD133<sup>+</sup> circolanti veniva eseguita con cadenza giornaliera a partire dal quarto giorno di terapia mobilizzante fino al momento della leucoferesi.

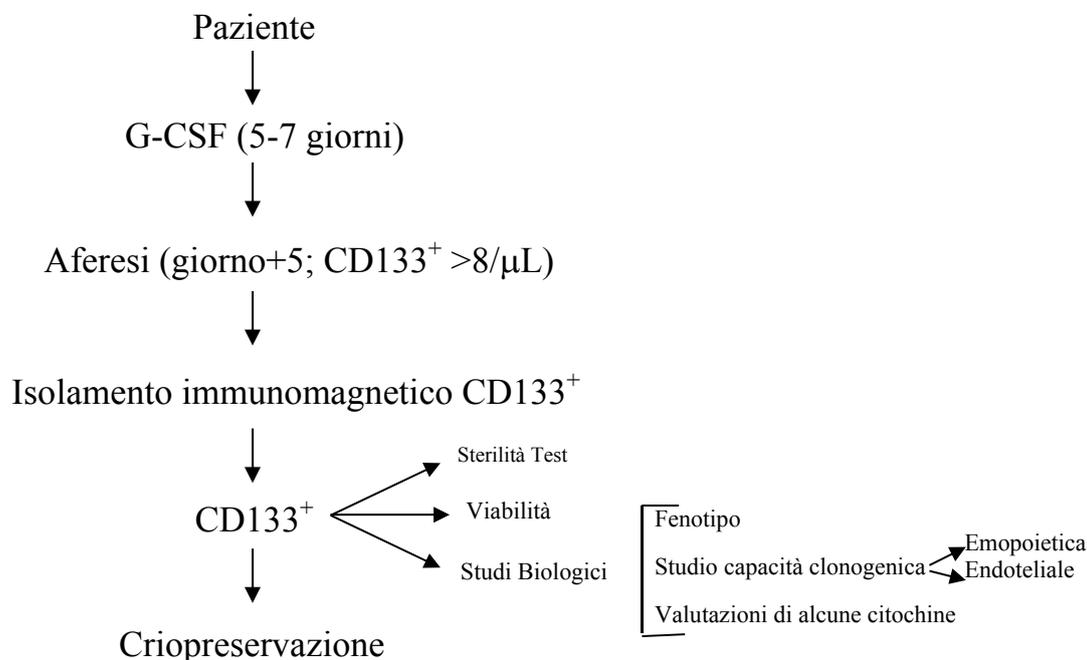
Quattro settimane dopo la leucoferesi (tempo necessario per le procedure di separazione), ciascun paziente veniva trattato con 30 mL di sospensione di cellule CD133<sup>+</sup> altamente purificate reinfuse attraverso l'arteria epatica mediante arteriografia. Per dimostrare la sicurezza della reinfusione il protocollo prevedeva di suddividere i pazienti in 4 coorti di almeno tre pazienti ciascuna da sottoporre a reinfusione di dosi crescenti di cellule pro Kg (50, 150, 400 e  $1000 \times 10^3$ , rispettivamente) cell/Kg. Per consentire l'espansione e l'attecchimento delle cellule staminali reinfuse, a partire dal giorno della reinfusione i pazienti ricevevano nuovamente G-CSF per tre giorni consecutivi alla dose di  $5\mu\text{g}/\text{Kg}$ .

I pazienti venivano quindi seguiti con controlli regolari per almeno 12 mesi dopo la reinfusione delle cellule CD133<sup>+</sup>.

Le diverse fasi dello studio sono riassunte nella Tabella 1.

Tabella 1: Fasi dello Studio

## FASE I



## FASE II

(almeno 4 settimane dopo l'afèresi)

≤ 40 ml CD133<sup>+</sup>  
(5x10<sup>4</sup>/kg – 1x10<sup>6</sup>/kg)

Infusione in arteria epatica

— 1°sett: giornalmente  
— 1, 2, 3, 6, 9, 12 mesi

STUDI  
BIOLOGICI

FOLLOW-UP  
(12 mesi)

Fase di mobilizzazione : T0, T+5, T+14

Fase di reinfusione CD133+: R-2, R+1, R+3, R+7, R+14

- Emocromo
- PT, AT, aPTT, F
- Bilirubina frazionata
- Albumina
- AST, ALT, AFP, G-GT, ALP
- Creatinina
- Colesterolo e Pseudocolinesterasi

### *3.3.2 Studio biologico*

Per ciascun paziente tutte le valutazioni necessarie per lo studio biologico sono state eseguite ai seguenti tempi:

- prima della terapia con G-CSF (T0)
- durante la fase di mobilizzazione con G-CSF (giorni T+5, T+14),
- durante la fase di reinfusione delle cellule staminali autologhe CD133<sup>+</sup> (giorni R-2, R+1, R+3, R+7, R+15).

### *3.3.3 Caratterizzazione delle cellule CD133<sup>+</sup> circolanti*

Il numero di cellule staminali CD133<sup>+</sup> mobilizzate dal midollo osseo è stato valutato mediante citofluorimetria a flusso. Il saggio è stato eseguito su campioni di sangue intero. Brevemente, 100 µL di sangue intero sono stati incubati con 20 µL di anticorpo monoclonale anti-CD133 PE (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) per 20 minuti a temperatura ambiente al buio. Per ottenere la lisi dei globuli rossi si è proceduto a successiva incubazione per 15 minuti con 3 µl di soluzione di lisi (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). Le cellule sono state quindi centrifugate a 1500 rpm per 5 minuti, lavate in tampone fosfato salino (PBS, Sigma Aldrich, Italia), e risospese in PBS per l'acquisizione eseguita con FACSCanto II (Becton Dickinson) dotato di software di analisi FACSDiva. E' stato acquisito ed analizzato un minimo di 60.000 eventi per ciascun campione. Il numero di cellule CD133<sup>+</sup> per µl è stato ottenuto moltiplicando la percentuale di cellule CD133<sup>+</sup> per il numero di globuli bianchi (WBC) in 1µL di sangue.

### *3.3.4 Caratterizzazione fenotipica delle cellule staminali circolanti*

Per la caratterizzazione fenotipica sono stati usati anticorpi monoclonali e sono state eseguite marcature di tipo diretto con anticorpi monoclonali coniugati con la Ficoeritrina (PE), Istiocianato di Fluorescina (FITC), Alloficocianina (APC) e Clorofilla Peridinina (PerCP). E' stato inoltre utilizzato il Syto 16, un fluorocromo "cell-permeant": esso si lega agli acidi nucleici ed in assenza di questi non è fluorescente, ci consente quindi di identificare le cellule vive.

In particolare, sono state caratterizzate fenotipicamente le cellule staminali del sangue periferico per l'espressione dei seguenti antigeni:

- CD45 (identifica le cellule emopoietiche)
- CD31 (glicoproteina espressa dalle cellule endoteliali)
- CD146 (espresso sulle cellule endoteliali)
- CD133 (marcatore di cellula staminale emopoietica ed endoteliale)
- CD34 (marcatore di cellula staminale emopoietica)
- KDR o CD309 (identifica il recettore del VEGF)
- CD184 o CXCR4 (identifica il recettore di SDF-1)
- CD105 o endoglina (marcatore delle cellule endoteliali)
- CD117 (identifica il recettore del fattore di crescita emopoietico Stem Cell Factor)
- C-Met (identifica il recettore dell'Hepatocyte Growth Factor)

Il pannello anticorpale utilizzato è stato il seguente:

- 1) Syto 16 FITC / CD45 PerCp / CD31 PE /  $\gamma$ 1 APC
- 2) Syto 16 FITC / CD45 PerCp / CD31 PE / CD146 APC
- 3) Syto 16 FITC / CD45 PerCp / CD31 PE / CD133 APC
- 4) CD34 FITC / CD133 PE / KDR APC
- 5) CD34 PerCp / CD133 PE / C-Met APC
- 6) CD34 APC / CD184 PE / CD105 FITC / CD117 PerCp
- 7) IgG1 APC / IgG 1 FITC / IgG 1 PE / IgG 1 PerCp

Per la caratterizzazione fenotipica delle cellule staminali emopoietiche è stata eseguita la marcatura diretta a partire da un campione di sangue venoso periferico. In base al numero totale di globuli bianchi, è stata calcolata la quantità di sangue necessaria per incubare  $2 \times 10^6$  globuli bianchi nelle prime tre provette e  $1 \times 10^6$  per le altre quattro. In ciascuna provetta, assieme a 200  $\mu$ l di Syto 16 FITC si aggiungevano 10  $\mu$ l di ciascun anticorpo, ad eccezione del KDR per il quale si aggiungevano 20  $\mu$ l. Gli anticorpi IgG1 sono stati utilizzati come controllo (3  $\mu$ l). Dopo 20 minuti di incubazione a +4°C al buio si procedeva a lisi dei globuli rossi e, dopo lavaggio con soluzione fisiologica, si aggiungevano 200  $\mu$ l di tampone PBS e 200  $\mu$ l di paraformaldeide al 4%. La sospensione cellulare veniva quindi

sottoposta ad analisi immunofenotipica mediante citometria a flusso. Per ogni campione si acquisiva un minimo di 300.000 eventi e si calcolava il numero assoluto delle cellule positive secondo la seguente formula: (% Cellule Positive x Numero di globuli bianchi)/100.

### *3.3.5 Semina delle cellule mononucleate su piastra per la valutazione della capacità clonogenica delle cellule staminali emopoietiche*

Le colonie sono state seminate in doppio e in condizioni di sterilità. 200.000 cellule mononucleate ottenute tramite centrifugazione del sangue in toto sul gradiente Ficol Sigma-Aldrich, Milano Italia lavato tre volte con PBS, sono state risospese in 2 ml di terreno IMDM (Iscove's Modified Dulbecco Medium) con FBS (Fetal Bovine Serum) 2%. Il campione è stato centrifugato a 1900 rpm per 8 minuti e il bottone risospeso in 2,2 ml di metilcellulosa addizionata con fattori di crescita Methylcellulose media HSC-CFU (Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Germany). Le capsule sono state poi incubate a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>.

Le colonie BFU-E, CFU-GM e CFU-GEMM sono state esaminate dopo 14 giorni al microscopio ottico con filtri PH204 e obiettivo 10X e sono state contate le colonie di entrambe le capsule facendo poi la media dei valori ottenuti.

La concentrazione di colonie/ml è stata determinata con la seguente formula:  
(N° colonie x N° cellule mononucleate ottenute x 5) / ml del campione.

### *3.3.6 Semina delle cellule mononucleate su piastra per la valutazione della capacità clonogenica delle cellule staminali endoteliali*

Le colonie endoteliali sono state identificate secondo la metodica proposta da Hill (33). Le colonie devono presentarsi formate da un nucleo centrale di cellule rotonde e da cellule allungate e filamentose che si irradiano in periferia.

Le cellule mononucleate ( $10 \times 10^6$ ) sono state diluite in 1 ml di terreno ricostituito miscelando 2 ml di Endocult Supplement con 8 ml di Endocult Basal Medium (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada). Il campione è stato poi centrifugato per 8 minuti a 1900 rpm e, dopo aver aspirato il surnatante, le cellule sono state risospese in 500 µl di terreno. Dopo aver aggiunto ulteriori 3500 µl sono stati seminati 2 ml in ciascun pozzetto di una piastra da sei pozzetti con

fibronectina. Previa incubazione a +37°C per 2 giorni, la sospensione è stata prelevata e dopo la conta in camera di Thoma, sono state seminate 10<sup>6</sup> cellule/ml in ciascun pozzetto. Le colonie opportunamente colorate sono state lette al microscopio ottico dopo tre giorni.

Per la colorazione si è proceduto nel seguente modo: è stato aspirato dal pozzetto tutto il terreno, è stato aggiunto 1 ml di PBS appoggiando il puntale contro parete, è stato aspirato il PBS, sono stati aggiunti 300 µl di metanolo in ciascun pozzetto e lasciati incubare per 4 minuti, è stato quindi aspirato il metanolo e sono stati aggiunti 300 µl di Giemsa (diluito 1:20 con acqua distillata) per 5 minuti.

Le colonie sono state quindi contate al microscopio ottico con obiettivo 20X e, come per le colonie emopoietiche, la concentrazione/ml è stata calcolata con la seguente formula seguente: (N° colonie x N° cellule mononucleate ottenute) / ml del campione.

### *3.3.7 Scongellamento delle sacche contenenti le cellule staminali CD133<sup>+</sup> altamente purificate*

La sacca è stata scongelata in bagnetto termostato a 37°C e il contenuto prelevato con una siringa da 50 ml e diluito in uguale quantità di tampone PBS/EDTA con albumina allo 0,5% in condizioni di sterilità. In seguito a centrifugazione per 8 minuti a 1900 rpm è stato eliminato il sovrantante e diluito nel medesimo tampone in rapporto di 1:10. La vitalità cellulare è stata valutata con colorazione Trypan Blue al microscopio ottico secondo la formula: (N° cellule vitali / N° cellule totali) x 100.

Poiché il numero di cellule staminali CD133<sup>+</sup> selezionate di ogni paziente è stato superiore alla dose da reinfondere, le cellule non reinfuse sono state usate per caratterizzare fenotipicamente e funzionalmente le cellule staminali CD133<sup>+</sup> altamente purificate come già descritto in precedenza.

### *3.3.8 Dosaggio delle citochine sieriche*

Il dosaggio di: Hepatocyte Growth Factor (HGF), Stromal Derived Factor-1α (SDF-1α), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), è stato effettuato

mediante kit ELISA disponibili in commercio (R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, Stati Uniti) sul siero dei pazienti arruolati.

Brevemente, alle piastre da 96 pozzetti già trattati con anticorpo primario, veniva aggiunto il siero dei soggetti in studio oppure gli standard a concentrazione nota. Si procedeva quindi ad incubazione per 2 ore a temperatura ambiente, al termine della quale, le piastre venivano lavate con apposita soluzione di lavaggio e trattate con il secondo anticorpo coniugato, cui seguiva un'altra incubazione di circa due ore. Veniva infine aggiunto il substrato colorimetrico (cromogeno) e dopo incubazione di 20 minuti al buio, la reazione veniva stoppata attraverso l'aggiunta di acido solforico concentrato. A questo punto veniva eseguita la lettura ottica delle piastre alla lunghezza d'onda di 450 nanometri.

### **3.4 ANALISI STATISTICA**

Tutti i dati relativi a soggetti sani sono stati desunti da valori forniti dai laboratori dell'Unità Operativa di Ematologia "L.&A. Seràgnoli":

- valori basali: CD34<sup>+</sup>: 2070 cellule/ $\mu$ l [range 545-7344]; CD133<sup>+</sup>: 1308 cellule/ $\mu$ l [range 397-3944]; CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>: 993 cellule/ $\mu$ l [range 425-3010]; CD133<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>: 103.5 cellule/ $\mu$ l [range 0-1088].

I risultati dello studio sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard o come mediana (range). Per l'analisi dei dati relativi ai differenti tempi (dal basale fino al termine del follow-up) è stato usato il test di Friedman. Tutte le elaborazioni sono state fatte con SPSS per Windows versione 3.0. E' stato considerato statisticamente significativo un valore di  $p < 0.05$ .

### **3.5 RISULTATI**

Lo studio è tuttora in corso di svolgimento, vengono pertanto presentati i risultati preliminari.

Ad oggi sono stati arruolati nello studio clinico 17 pazienti le cui caratteristiche sono riportate nella tabella 2 e nella tabella 3. Si tratta di 14 maschi (82%) e 3 femmine con un'età media di 53 anni (range 30-70) affetti per la maggior parte

da cirrosi epatica HCV relata (53%) con o senza abuso alcolico. MELD mediano 18.

Dei 17 pazienti arruolati, uno (paziente n. 16) ha ritirato il consenso prima di iniziare il G-CSF a causa di un peggioramento delle condizioni cliniche. Pertanto ad oggi 16 (94%) sono stati sottoposti a terapia mobilizzante con G-CSF, di questi però 14 (82%) sono stati sottoposti a leucoaferesi, mentre 2 (pazienti n.4 e n.14) non hanno avuto una sufficiente mobilizzazione delle cellule staminali e sono stati considerati drop-out.

Dei 14 pazienti sottoposti a leucoaferesi, 12 (86%) sono stati sottoposti a reinfusione intraepatica, mentre un paziente (n.5) è deceduto e uno (n.8) è stato sottoposto a trapianto di fegato prima di poter essere sottoposti a terapia cellulare.

**Tabella 2:** Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati. ASH: Alcoholic steatohepatitis;  
NASH: Non-alcoholic steatohepatitis

Pz	Età	Eziologia	MELD	Bilirubina mg/dl	Creatinina mg/dl	INR
01	54	HCV	18	4.08	0.72	1.78
02	53	ASH	17	2.9	1.05	1.65
03	54	HCV	19	4.7	1.2	1.9
04	47	HCV	18	5	0.93	1.68
05	57	NASH	19	5	1.17	1.52
06	46	NASH+ASH	21	5.74	0.58	2.05
07	56	ASH	22	7.91	1.1	1.84
08	48	HCV	22	7.97	0.6	2.06
09	70	HCV+NASH	19	2.21	0.87	2.27
10	40	HCV+ASH	17	4.41	0.94	1.5
11	70	HCV	17	5.47	1.07	1.32
12	30	HCV	18	5.08	0.77	1.62
13	58	ASH	18	5.17	1.00	1.61
14	48	HCV+ASH	17	4.86	1.3	1.45
15	53	NASH+ASH	17	4.3	1.2	1.3
16	59	ASH	20	3.68	1.13	1.62
17	59	ASH	17	5.2	0.82	1.55

**Tabella 3:** Andamento e risultati nei singoli pazienti ASH: Alcoholic steatohepatitis:  
NASH: Non-alcoholic steatohepatitis

Pz	Età	Eziologia	Aferesi	Reinfusione	Cellule reinfuse (x10 <sup>3</sup> )/Kg	Follow-up post-reinfusione
01	54	HCV	Si	Si	50	OLT a 3 mesi
02	53	ASH	Si	Si	50	Vivo
03	54	HCV	Si	Si	50	Vivo
04	47	HCV	No	-	-	-
05	57	NASH	Si	No (deceduto)	-	-
06	46	NASH+ASH	Si	Si	150	OLT a 2 mesi
07	56	ASH	Si	Si	150	Deceduto a 3 mesi
08	48	HCV	Si	No (OLT)	-	-
09	70	HCV+NASH	Si	Si	400	Vivo
10	40	HCV+ASH	Si	Si	150	Deceduto a 2 mesi
11	70	HCV	Si	Si	400	Vivo
12	30	HCV	Si	Si	400	OLT a 1 mese
13	58	ASH	Si	Si	1000	OLT a 9 mesi
14	48	HCV+ASH	No	-	-	-
15	53	NASH+ASH	Si	Si	1000	Vivo a un mese
16	59	ASH	No	-	-	-
17	59	ASH	Si	Si	1000	Vivo a un mese

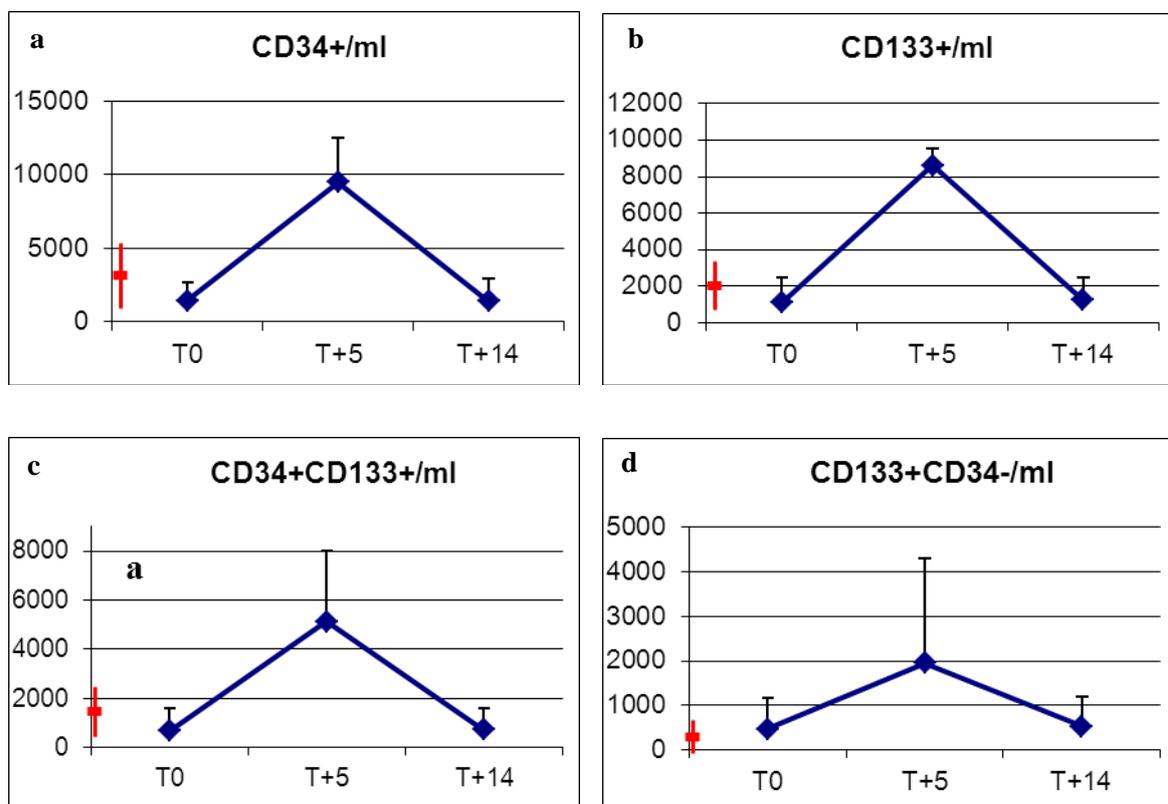
### 3.5.1 Caratterizzazione fenotipica – Fase di mobilizzazione

Al T0 i valori basali di cellule staminali emopoietiche ed endoteliali dei pazienti arruolati sono risultati inferiori rispetto a quanto descritto nei pazienti sani (CD34<sup>+</sup>: 2070 cellule/ $\mu$ l [545-7344]; CD133<sup>+</sup>: 1308 cellule/ $\mu$ l [397-3944]; CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>: 993 cellule/ $\mu$ l [425-3010]; CD133<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>: 103.5 cellule/ $\mu$ l [0-1088]; valori ottenuti da esperimenti eseguiti dal laboratorio dell'Unità Operativa di Ematologia "L.&A. Seràgnoli"). E' probabile che agenti tossici quali il virus e l'alcool inducano anche un danno a livello del sistema emopoietico.

In seguito alla somministrazione del G-CSF, è stata documentata la mobilizzazione di cellule staminali esprimenti sia markers emopoietici sia endoteliali. In tutti i 14 pazienti che hanno presentato una sufficiente

mobilizzazione delle cellule staminali è stato possibile osservare un importante aumento delle cellule staminali  $CD34^+$ ,  $CD133^+$ ,  $CD34^+CD133^+$ ,  $CD133^+CD34^-$ . In particolare, il picco di mobilizzazione è stato si osserva al giorno T+5 con valore medio rispettivamente di : 9500 cellule/ $\mu$ l $\pm$ 2996; 8601 cellule/ $\mu$ l $\pm$ 928; 5131 cellule/ $\mu$ l $\pm$ 2859; 1945 cellule/ $\mu$ l $\pm$ 2351. I valori poi tornano ad allinearsi con i livelli basali man mano che ci si allontana dal periodo di somministrazione del G-CSF (giorno T+14) (Figura 5 a, b, c, d).

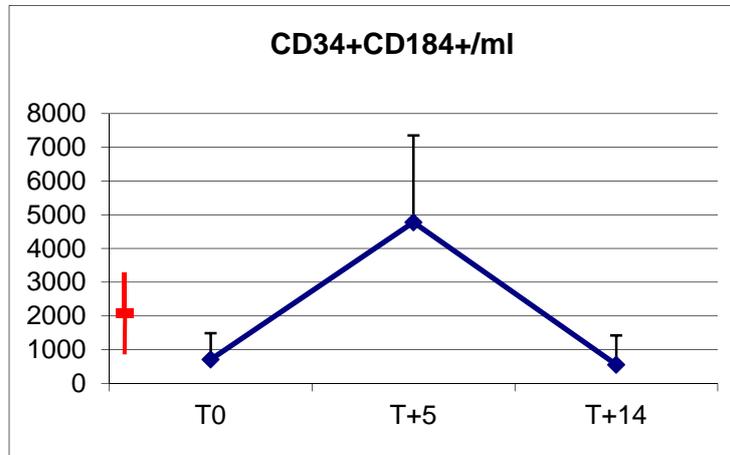
**Figura 5:** Valutazioni fenotipiche delle cellule staminali circolanti durante la fase di mobilizzazione



E' stata poi eseguita la valutazione della mobilizzazione anche di sottopopolazioni cellulari, andando ad osservare l'espressione di antigeni più specifici per la linea endoteliale ed emopoietica. In primo luogo, i risultati mostrati dalla figura 6 evidenziano una mobilizzazione di cellule staminali  $CD34^+CXCR4^+$  al giorno T+5 con valori medi di 1718 cellule/ $\mu$ l $\pm$ 2476. Ciò è molto importante in quanto CXCR4 è il recettore per lo Stromal Derived Factor 1 (SDF-1) che è una chemochina ad azione chemotattica la cui interazione con lo specifico ligando stimola la mobilizzazione di cellule staminali emopoietiche dal

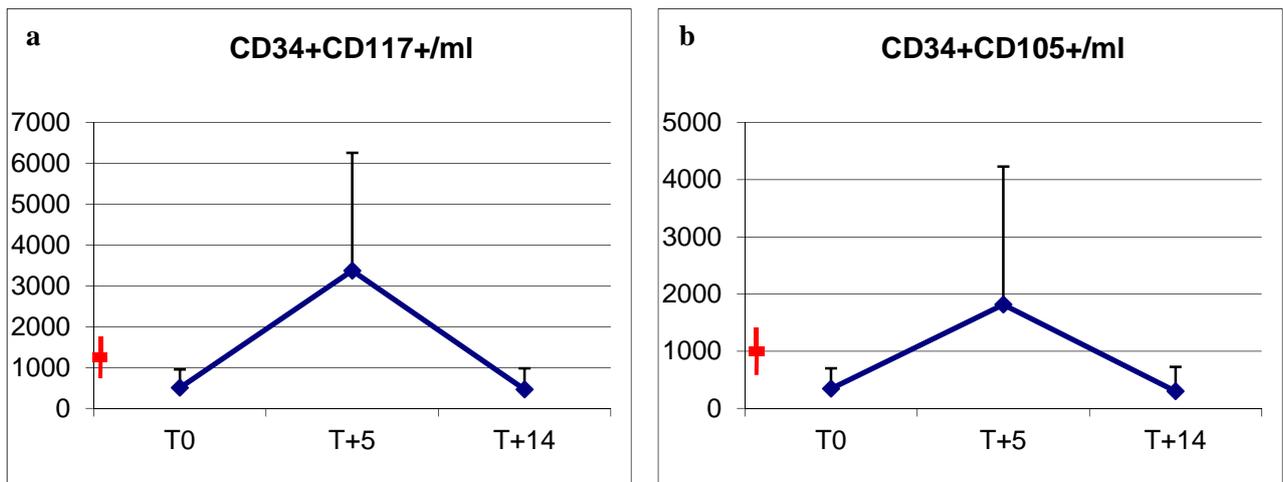
midollo osseo e ne favorisce la migrazione a livello del tessuto epatico danneggiato.

**Figura 6:** Mobilizzazione delle cellule CD34<sup>+</sup>CD184<sup>+</sup>



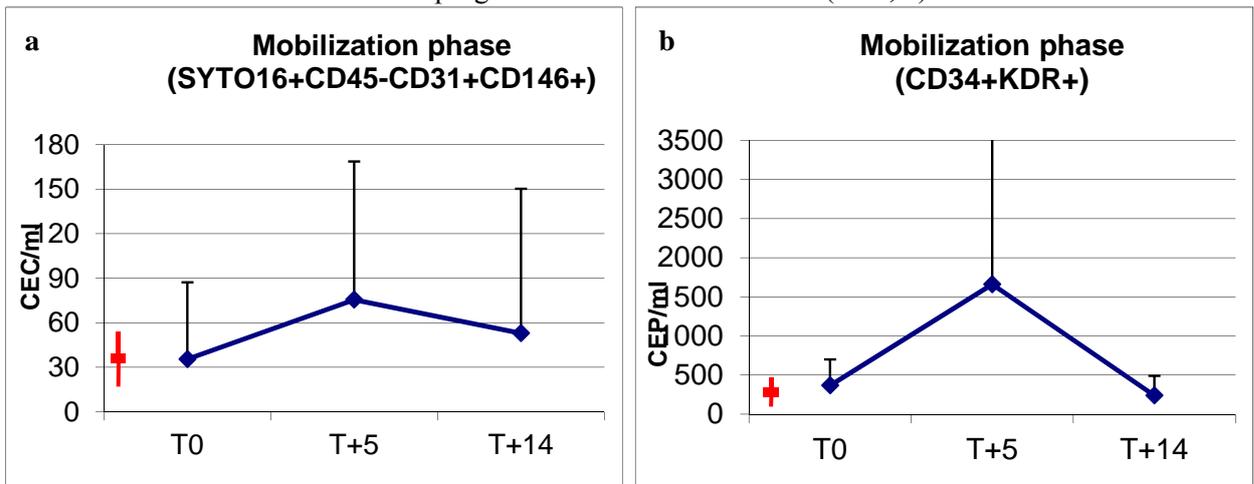
Per quanto riguarda la mobilizzazione di progenitori endoteliali, abbiamo valutato l'espressione degli antigeni CD117 e CD105 sulle cellule staminali CD34<sup>+</sup>. (Figura 7 a, b). Dalle valutazioni effettuate è stato possibile osservare che si ha un aumento del numero di cellule staminali circolanti esprimenti i markers di interesse al giorno T+5 (CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>: 3373 cellule/ $\mu$ l $\pm$ 2884; CD34<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>: 1816 cellule/ $\mu$ l $\pm$ 2414) ed una successiva riduzione al giorno T+14 (CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>: 406 cellule/ $\mu$ l  $\pm$ 518; CD34<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>: 301 cellule/ $\mu$ l  $\pm$ 426).

**Figura 7:** Mobilizzazione di progenitori endoteliali



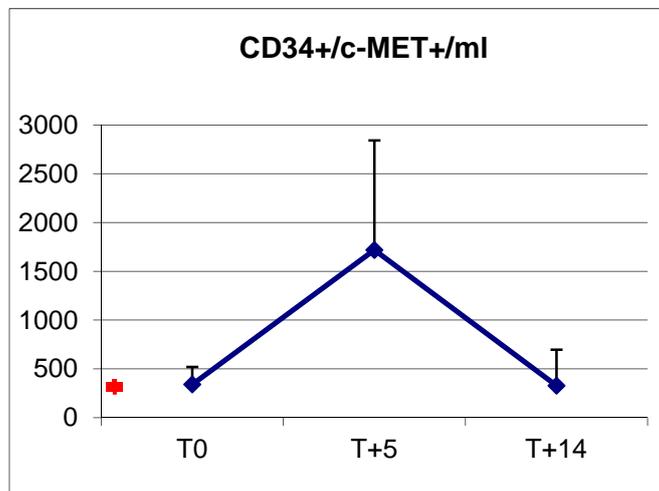
Inoltre, la Figura 8 (a, b) mostra una valutazione delle cellule endoteliali circolanti (CEC) e dei progenitori endoteliali (CEP). In questo caso è risultato un picco di cellule CEC e CEP al giorno T+5 (con valori medi rispettivamente di 76 cellule/ $\mu\text{l}$  $\pm$ 93.1; 1661 cellule/ $\mu\text{l}$  $\pm$ 1979) che poi ritornano ai valori iniziali al giorno T+14 (con valori medi rispettivamente di 53 cellule/ $\mu\text{l}$  $\pm$ 97.3; 240 cellule/ $\mu\text{l}$  $\pm$ 97.3).

**Figura 8:** Valutazione del numero di cellule endoteliali circolanti (CEC, a) e del numero dei progenitori endoteliali circolanti (CEP, b)



Infine siamo andati a valutare l'espressione del recettore C-Met sulle cellule staminali CD34<sup>+</sup>. I risultati ottenuti ci permettono di osservare che nel momento di massima mobilizzazione, abbiamo riscontrato la presenza di cellule circolanti esprimenti questo antigene in livelli molto superiori (2109 cellule/ $\mu\text{l}$  [109- 3025]) a quelli dei controlli normali (134.4 cellule/ $\mu\text{l}$  [0-365]) (Figura 9).

**Figura 9:** valutazione delle cellule esprimenti i markers CD34<sup>+</sup>c-MET

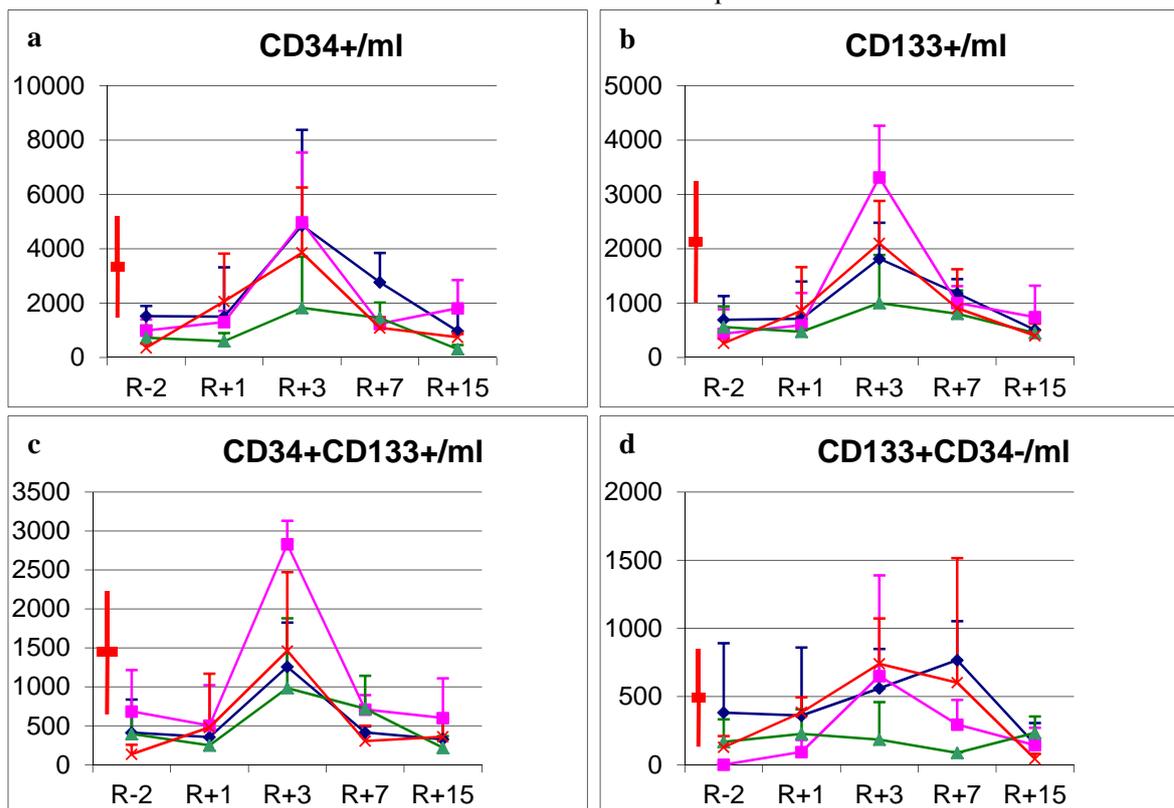


### 3.5.2 Caratterizzazione fenotipica – Fase della reinfusione

I risultati ottenuti nella fase di reinfusione non sono univoci e, a differenza di quanto emerso dai dati della mobilitazione, è presente una notevole variabilità tra le diverse coorti. Per quanto riguarda l'espressione degli antigeni CD133 e CD34, tutti i risultati ottenuti sono al di sotto o al limite dei controlli normali. La coorte II risulta essere quella in cui è più elevato il numero delle cellule staminali CD133<sup>+</sup>, cellule CD34<sup>+</sup> e CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>, mostrando in tutti i casi un picco al giorno R+3 con conseguente riduzione a partire dal giorno R+7. (Figura 10)

È importante anche sottolineare come la quantità di cellule esprimenti entrambi gli antigeni sia nettamente inferiore alla media dei controlli, con l'eccezione della coorte II e della coorte IV al giorno R+3.

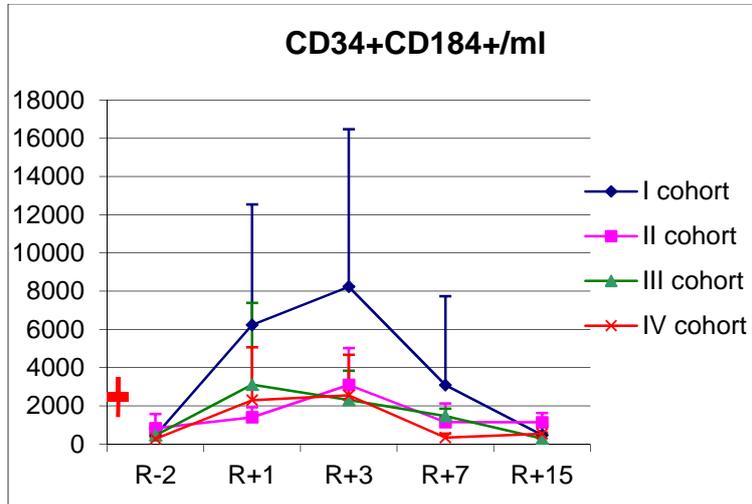
**Figura 10:** Valutazioni fenotipiche delle cellule staminali circolanti durante la fase di reinfusione. I dati sono divisi nelle quattro coorti



La Figura 11 mostra le cellule staminali CD34<sup>+</sup>CD184<sup>+</sup>; i pazienti arruolati nelle coorti II, III, IV hanno un numero di cellule circolanti nei range normali (1300 cellule/ $\mu$ l [560-3869]) con bassi livelli di cellule esprimenti l'antigene, mentre i

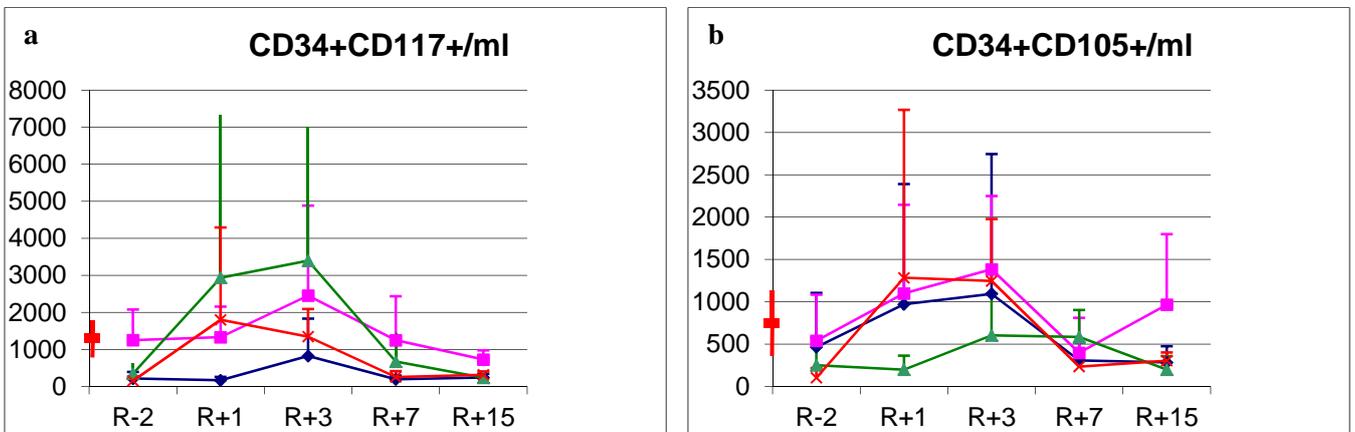
pazienti arruolati nella coorte I presentano una più elevata espressione di cellule CD34<sup>+</sup>CD184<sup>+</sup>.

**Figura 11:** Numero di cellule CD34<sup>+</sup>CD184<sup>+</sup> circolanti nella fase successiva alla reinfusione



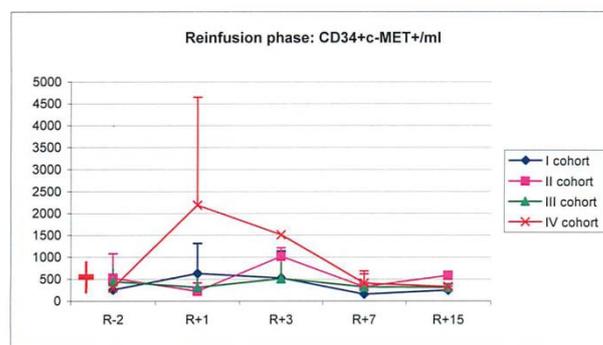
Le cellule staminali CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> sono nel range normale (952 cellule/ $\mu$ l [540-1256]) nelle coorti I, II, IV, mentre la loro concentrazione è più elevata nella coorte III (figura 12 a). Per ciò che concerne le cellule staminali CD34<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>, possiamo osservare che in tutte le quattro coorti il numero di cellule al momento della reinfusione è nel range di normalità (315.9 cellule/ $\mu$ l [108-1328]), il numero aumenta nei primi giorni dopo la reinfusione, per poi ritornare ai livelli iniziali con il passare dei giorni (Figura 12 b).

**Figura 12:** Presenza in circolo di progenitori endoteliali nella fase successiva alla reinfusione



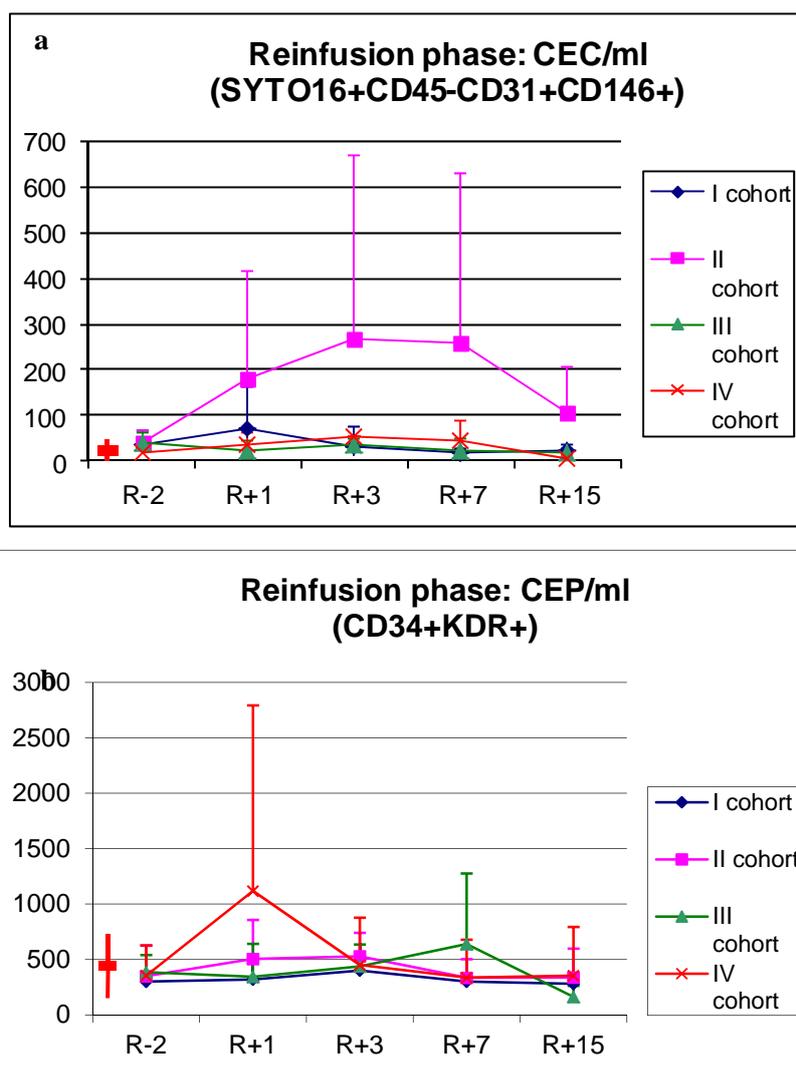
I dati relativi all'espressione del C-Met sono mostrati nella Figura 13 ci permettono di osservare che per i pazienti arruolati nelle coorti I, II, III non ci sono variazioni del numero di cellule presentanti l'antigene durante il periodo di osservazione rispetto al momento della reinfusione, mentre per i pazienti arruolati nella coorte IV si osservano alti livelli di espressione di questo antigene, molto superiori a quelli riscontrati durante la mobilizzazione, che rientrano nei valori iniziali quindici giorni dopo la reinfusione.

**Figura13:** Numero di cellule CD34<sup>+</sup>c-MET<sup>+</sup> circolanti nella fase successiva alla reinfusione



In relazione alle CEC e alle CEP, i risultati osservati durante la reinfusione sono diversi da quelli documentati in fase di in mobilizzazione: per quanto riguarda le CEC per le coorti I, III, e IV non ci sono variazioni, mentre nella coorte II si osserva un progressivo aumento che poi si riduce al R+15, rimanendo però più elevato dei valori precedenti alla reinfusione. Per quanto riguarda invece CEP possiamo osservare che i valori sono nel range di normalità per tutte e quattro le coorti, è presente solo un aumento del numero di cellule CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> al giorno R+1 (1118 cellule/ $\mu$ l $\pm$ 1674) che poi si riduce rapidamente nei giorni successivi (Figura 14 a, b).

**Figura 14:** Valutazione delle CEC (a) e delle CEP (b) nella fase successiva alla reinfusione



### 3.5.3 Valutazione della capacità clonogenica delle cellule staminali emopoietiche

La valutazione delle colonie emopoietiche è stata eseguita su tutti i prelievi effettuati ai pazienti sia durante la fase della mobilizzazione che nella fase successiva alla reinfusione.

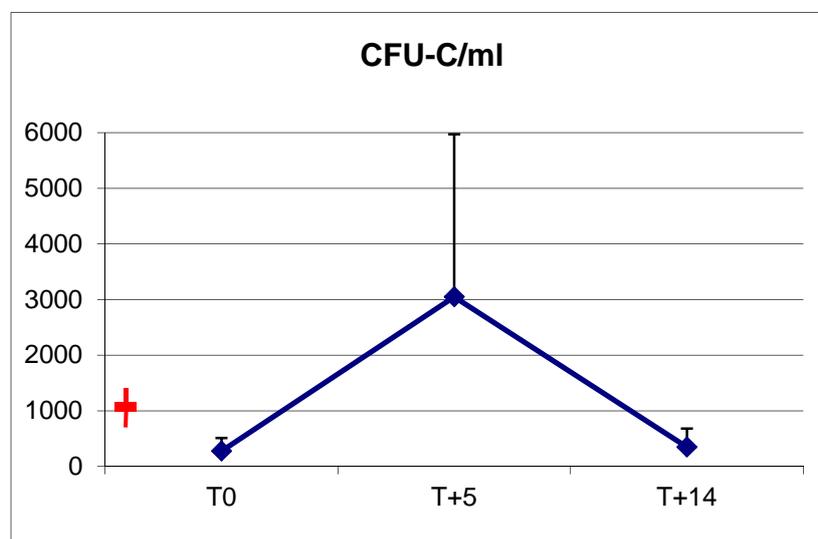
E' stata presa in considerazione la crescita dei progenitori emopoietici totali (CFU-C), comprendendo le colonie BFU-E, CFU-GM e CFU-GEMM. Le BFU-E sono progenitori eritroidi con una grande capacità proliferativa; le CFU-GM sono progenitori clonogenici mieloidi capaci di dare origine a colonie contenenti almeno 20 granulociti e/o macrofagi maturi; le CFU-GEMM sono progenitori

mieloidi più immaturi capaci di dare origine a colonie formate da cellule di diverse linee (granulopoietiche, eritropoietiche e megacariocitarie).

- Fase di mobilizzazione

I valori basali di CFU-C osservati nei pazienti arruolati sono inferiori rispetto a quelli osservati nei soggetti sani (969 colonie/ml [680.5-1257.4]). Durante questa fase l'andamento osservato nei pazienti arruolati rispecchia quello osservato nella valutazione delle cellule staminali circolanti. Come atteso, al giorno T+5 (2924 colonie/ml±2924) si ha un incremento della crescita delle CFU-C, che poi ritorna ai valori basali al giorno T+15.

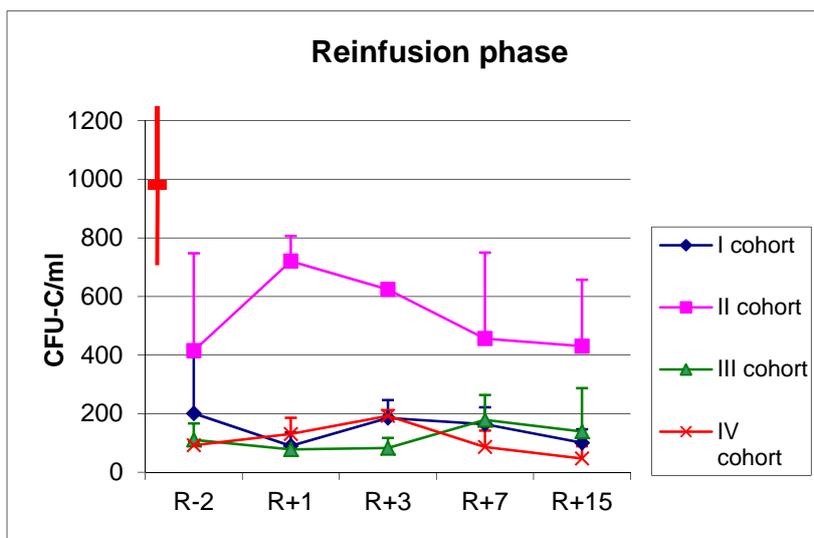
*Figura 15:* Valutazione delle CFU-C durante la fase della mobilizzazione



- Fase di reinfusione

Nella fase di reinfusione delle cellule staminali CD133<sup>+</sup>, i dati dei pazienti delle coorti I, III, IV sono piuttosto sovrapponibili anche se i valori sono di molto inferiori ai controlli. Nei pazienti nella coorte II si può osservare un aumento delle CFU, seppure con valori inferiori ai controlli sani (969 colonie/ml [680.5-1257.4]), con valori che si riducono nel tempo (R+15).

**Figura 16:** Valutazione delle CFU-C durante la fase successiva alla reinfusione



#### 3.5.4 Valutazione della capacità clonogenica delle cellule staminali endoteliali

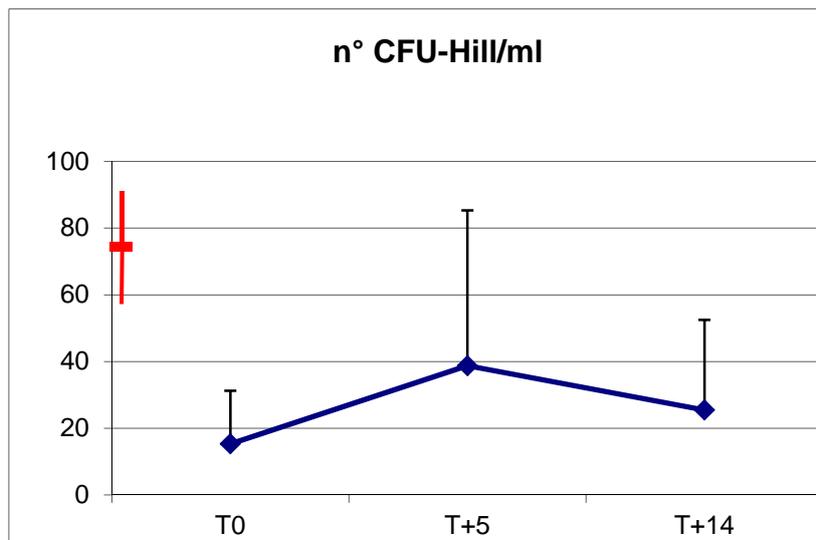
La valutazione delle colonie endoteliali è stata fatta dopo 5 giorni dalla semina. .

- Fase di mobilizzazione

I progenitori endoteliali non hanno mostrato una significativa mobilizzazione: la crescita delle colonie è stata molto scarsa e comunque inferiore alla capacità clonogenica dei controlli normali (59 [49-91]) sia a livello basale sia durante la fase di mobilizzazione. (T0: 15 n° di colonie/ml  $\pm$ 15.9; T+5: 39 n° di colonie/ml  $\pm$ 49.5; T+14: 25 n° di colonie/ml  $\pm$ 27). Inoltre le colonie dei pazienti con cirrosi sono più piccole rispetto a quelle descritte da Hill (89).

La concentrazione delle colonie endoteliali/ml è piuttosto basso a livello basale (inferiore al numero espresso nei soggetti sani) e si mantiene invariato durante tale fase.

**Figura 17:** Valutazione delle CFU-Hill durante la fase della mobilizzazione

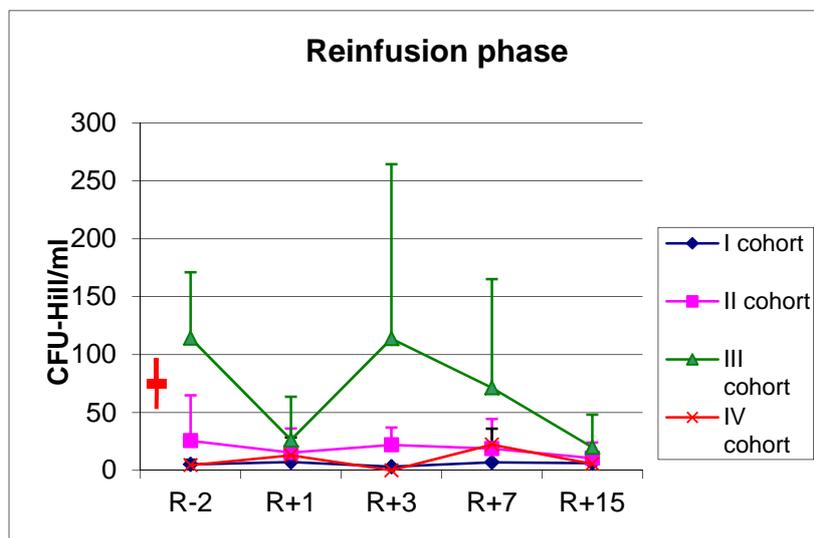


- Fase di reinfusione

Anche nella fase di reinfusione, come in mobilizzazione, i valori ottenuti nei pazienti sono di molto inferiori ai controlli.

La Figura 18 mostra come l'andamento sia simile tra i pazienti delle coorti diverse e alla mobilizzazione, come se non vi sia stata una significativa influenza della terapia su queste cellule.

**Figura 18:** Valutazione delle CFU-Hill durante la fase successiva alla reinfusione



### 3.5.5 Caratterizzazione delle cellule staminali CD133<sup>+</sup> purificate

La caratterizzazione delle cellule staminali CD133<sup>+</sup> purificate è stata fatta al fine di valutare e identificare la natura delle cellule reinfuse al paziente.

Le cellule staminali CD133<sup>+</sup> isolate dalle aferesi dei pazienti arruolati coesprimono nella quasi totalità anche l'antigene CD34. Inoltre, le cellule isolate presentano una variabile coespressione degli antigeni emopoietici ed endoteliali CD90, CD184, CD117 e CD105. Anche la coespressione del C-Met non risulta univoca.

**Tabella 4:** Caratteristiche fenotipiche delle cellule CD133+ altamente purificate

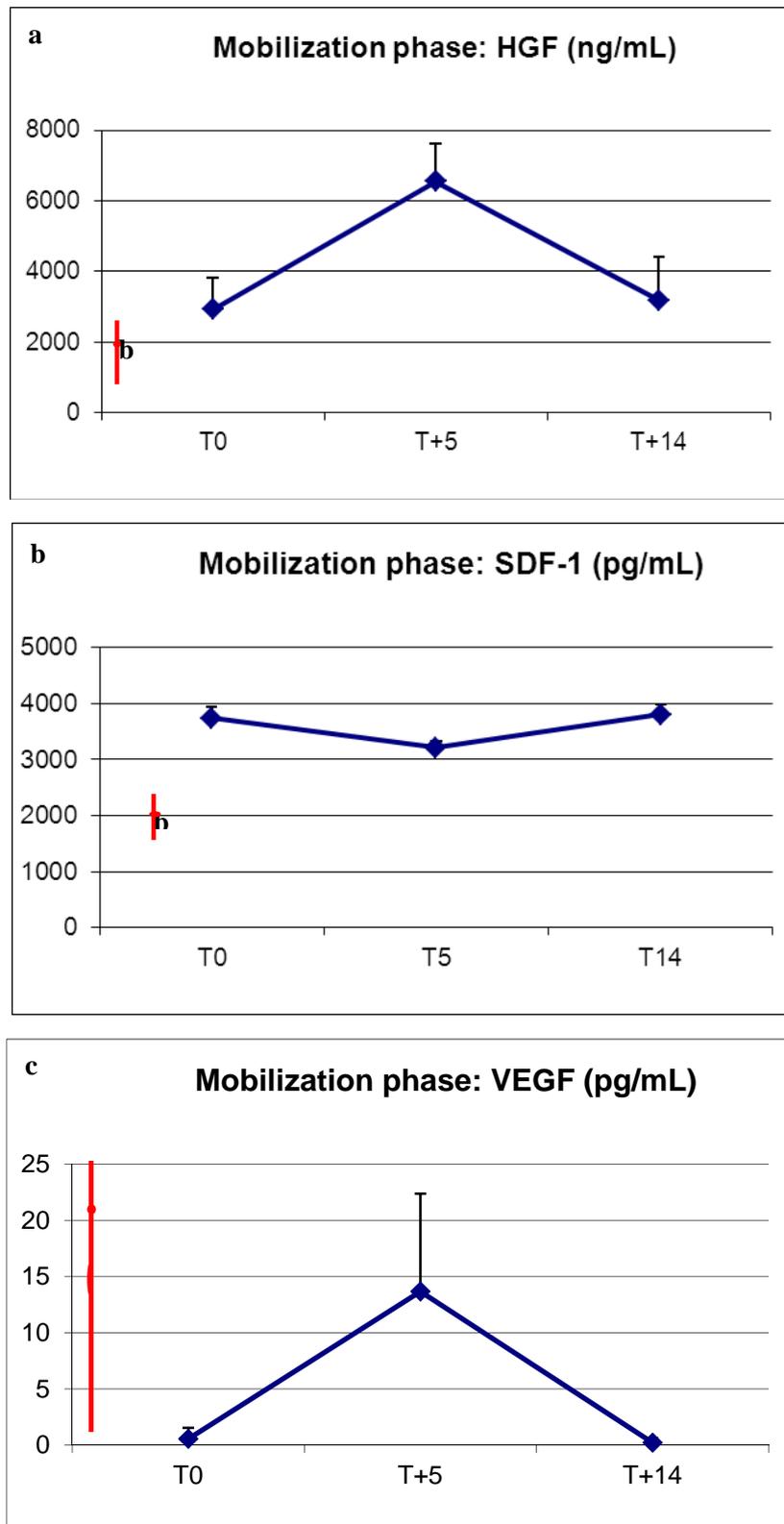
<b>%CD133<sup>+</sup></b>	<b>%CD34<sup>+</sup></b>	<b>%CD90<sup>+</sup></b>	<b>%CD117<sup>+</sup></b>	<b>%CD184<sup>+</sup></b>
90±5	96±4	35±25	13±16	4±5

<b>%CD105<sup>+</sup></b>	<b>%c-MET<sup>+</sup></b>	<b>%CD38<sup>+</sup></b>	<b>%KDR<sup>+</sup></b>
6±8	0.11±0.06	98.2±3.2	55.7±27

### 3.5.6 Valutazione citochine sieriche

Per quanto concerne la valutazione delle citochine plasmatiche possiamo osservare che durante la fase di mobilizzazione la concentrazione (espressa come valore medio) di HGF aumenta al giorno T+5 (6540.6 ng/ml±1075.8) per poi ritornare ai valori iniziali al giorno T+14 (3180.3 ng/ml±1240.7) (Figura 19 a). Per quanto riguarda invece la concentrazione di SDF-1 (espressa come valore medio) possiamo vedere che i suoi valori iniziali sono decisamente più elevati (3738.9 pg/ml±191) dei valori riscontrati nei soggetti sani (2070.4 pg/ml±339.1) al inizio della mobilizzazione, questi valori diminuiscono al giorno T+5 (3212.3 pg/ml±109) per poi ritornare ai valori iniziali al giorno T+14 (3804.2 pg/ml±102) (Figura 19 b). Anche la concentrazione media del VEGF si comporta come quella del HGF, aumenta cioè al giorno T+5 (6540.6 pg/ml±1075.8) per poi ritornare ai valori iniziali al giorno T+14 (3180.3 pg/ml±1240) (Figura 19 c).

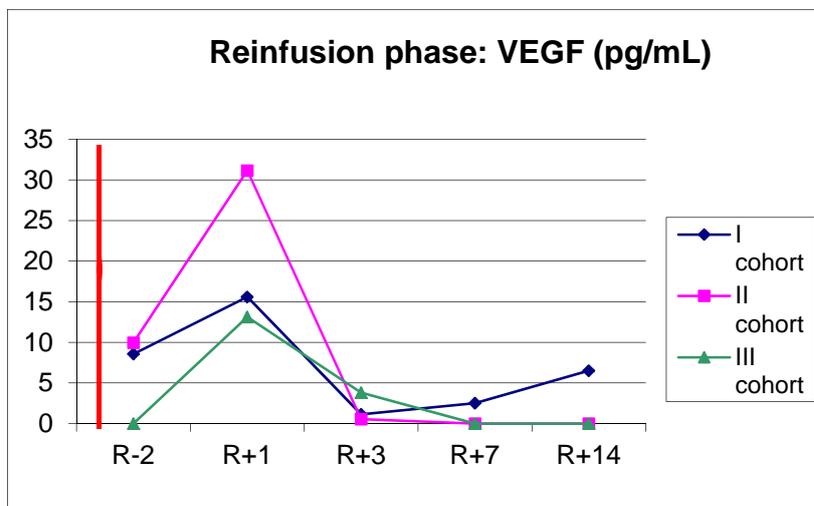
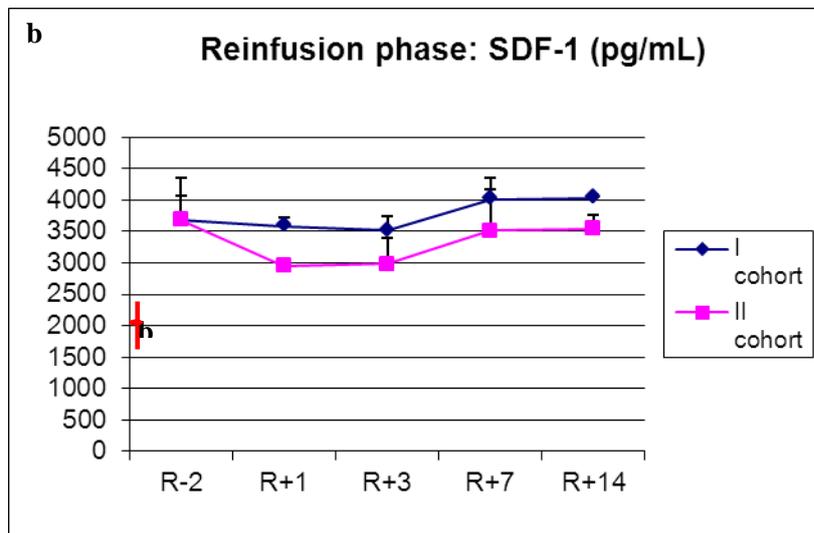
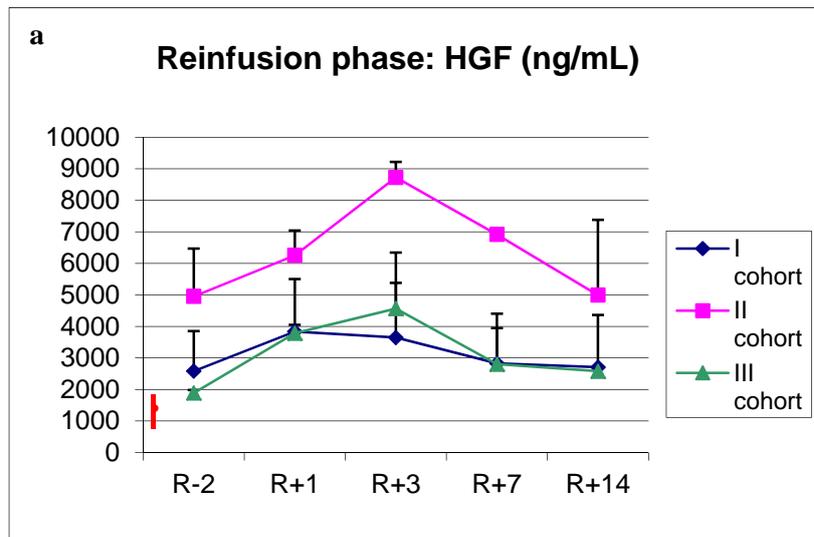
**Figura 19:** Valutazione delle citochine sieriche HGF (a), SDF-1 (b), VEGF (c) durante la fase della mobilizzazione



La valutazione di queste stesse citochine nella fase della reinfusione è stata condotta solo sulle prime tre coorti ed ha prodotto i seguenti risultati:

- 1) in tutte le coorti la concentrazione di HGF è superiore ai valori normali; l'andamento della coorte I è sovrapponibile a quello della coorte III ad eccezione di un piccolo aumento che poi rientra ai valori precedenti la reinfusione. La concentrazione plasmatica di HGF dei pazienti arruolati nella coorte II invece è più alta già dal inizio della fase della reinfusione ( $4950.2 \pm 1517$  ng/ml) ed aumenta progressivamente fino ad avere un picco al giorno R+3 ( $8725.2 \pm 491.9$  ng/ml) per poi rientrare nei valori iniziali al giorno R+14 ( $4991.8 \pm 2387.8$  ng/ml) (figura 20a);
- 2) la concentrazione plasmatica di SDF-1, valutata al momento solo sulla coorte I e sulla coorte II, è superiore (coorte I:  $3675.8 \pm 670$  pg/ml; coorte II:  $3689.4 \pm 372$  pg/ml) ai valori riscontrati nei soggetti sani e si mantiene nell'ambito di valori più o meno stazionari durante tutto il periodo di osservazione (figura 20b).
- 3) Circa il VEGF, in tutte e tre le coorti si osserva un picco al giorno R+1 (coorte I:  $15.6 \pm 19.6$  pg/ml; coorte II:  $31.1 \pm 42.1$  pg/ml, coorte III:  $13.1 \pm 13.7$  pg/ml) che poi si abbassa bruscamente al giorno R+3 (coorte I:  $1.1 \pm 1.3$  pg/ml; coorte II:  $0.5 \pm 0.7$  pg/ml; coorte III:  $3.8 \pm 6.6$  pg/ml) (figura 20c).

**Figura 20:** Valutazione delle citochine sieriche HGF (a), SDF-1 (b), VEGF (c) durante la fase successiva alla reinfusione



### 3.6 DISCUSSIONE

Nei pazienti affetti da cirrosi epatica, la somministrazione di G-CSF induce la mobilitazione di cellule staminali esprimenti sia markers emopoietici sia endoteliali. In particolare, in tutti i pazienti si osserva una mobilitazione di cellule  $CD34^+$ ,  $CD133^+$ ,  $CD34^+CD133^+$ ,  $CD34^-CD133^+$ . Il picco di mobilitazione si osserva al giorno T+5. Man mano che ci si allontana dal periodo di somministrazione del G-CSF (giorno T+14), i valori tornano poi ad allinearsi con i livelli basali. Ciò è in accordo con quanto atteso, poiché in linea con l'attività del G-CSF (75).

Durante la fase della mobilitazione sono stati raccolti anche campioni cellulari per l'analisi citofluorimetrica al fine di studiare le sottopopolazioni più specifiche per la linea endoteliale ed emopoietica. In primo luogo si osserva una mobilitazione di cellule  $CD34^+CXCR4^+$ . Questo dato indica quindi che vengono mobilizzate cellule staminali che coesprimono l'SDF-1. Ciò è molto importante in quanto l'SDF-1 è una citochina con azione chemotattica ed è fondamentale nel processo di "homing". Poiché è stato dimostrato che il fegato danneggiato produce SDF-1, cellule staminali dal midollo potrebbero essere attratte nel sito di danno.

Per quanto riguarda la mobilitazione di progenitori endoteliali è stata valutata l'espressione di antigeni CD117 e CD105 sulle cellule staminali  $CD34^+$ . I risultati mostrano un iniziale aumento di tali cellule con successiva riduzione al giorno T+14. Vengono mobilizzate soprattutto cellule  $CD34^+CD117^+$  ed un minor numero di cellule  $CD34^+CD105^+$ . Questi dati, insieme all'aumento del numero delle cellule endoteliali circolanti (CEC) e dei pronipoti endoteliali circolanti (CEP) ci consentono di concludere che durante la somministrazione del G-CSF vengono mobilizzate cellule staminali endoteliali ed è aumentata l'espressione del recettore del fattore di crescita emopoietico (SCF) sulle cellule staminali evidenza che non è presente poi nella fase successiva alla reinfusione. L'espressione del recettore C-Met (il C-Met identifica il recettore per l'Hepatocyte Growth Factor) sulle cellule staminali  $CD34^+$  aumenta a T+5

(momento della massima mobilitazione) ed è costantemente superiore rispetto a quanto descritto nei soggetti normali.

Dopo la reinfusione di cellule altamente purificate i pazienti hanno ricevuto dosi di G-CSF (in particolare la sera stessa della reinfusione ed il mattino e la sera del giorno successivo) per dare un vantaggio selettivo alle cellule reinfuse. I risultati in questa fase non sono univoci e, a differenza di quanto emerso nei dati di mobilitazione, è presente una notevole variabilità fra le varie coorti. Mentre cellule CD34<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> mostrano un picco al giorno R+3 con successiva riduzione al giorno R+7, le cellule staminali CD133<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> mostrano un comportamento diverso nelle diverse coorti: la coorte II e la coorte IV presentano un picco al giorno R+3 che torna poi a livelli normali al giorno R+7; la coorte I presenta un aumento esponenziale di queste cellule fino al giorno R+7 per poi tornare a livelli inferiori rispetto ai valori ottenuti dai test eseguiti su campioni raccolti due giorni prima della reinfusione, al giorno R+15.

La concentrazione delle cellule staminali CD34<sup>+</sup>CD184<sup>+</sup> è superiore a quanto riportato nei soggetti sani. Il numero di cellule CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> è maggiore nelle coorti I, II, IV, rispetto alla III, mentre per ciò che concerne le cellule CD34<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>, la coorte I presenta valori inferiori al normale, mentre le altre tre mostrano livelli aumentati (questo evidenzia la presenza di cellule endoteliali in circolo). L'andamento del C-Met nella coorte IV - quella che ha reinfuso il maggior numero di cellule staminali - potrebbe essere espressione di fondamentale importanza vista la capacità di questo antigene di riconoscere il fattore di crescita epatocita rio.

La crescita di colonie di cellule staminali emopoietiche ed endoteliali durante la fase di mobilitazione è scarsa e inferiore alla capacità clonogenica studiata nei controlli sani. Analogamente le colonie Hill ottenute dai pazienti affetti da cirrosi sono più piccole di quelle descritte da Hill stesso sia in fase di mobilitazione che di reinfusione (89). L'andamento delle CFU/Hill nella fase successiva alla reinfusione si mantiene costante durante tutto il periodo di osservazione, nonostante la diversità osservata tra le diverse coorti verosimile espressione di una significativa influenza della terapia cellulare su queste cellule. Dal momento

che i pazienti sono stati trattati con G-CSF anche durante la fase di reinfusione, la spiegazione potrebbe essere analoga a quanto visto nella mobilizzazione anche se i dati della letteratura sono contrastanti. I nostri dati tuttavia sembrerebbero in accordo con quanto recentemente pubblicato da alcuni ricercatori dell'Università di Edimburgo i quali hanno dimostrato una capacità inibitoria del G-CSF nei confronti dei progenitori endoteliali (34). In realtà però esistono altri studi che invece affermano che il G-CSF avrebbe effetti stimolanti sui progenitori endoteliali. La questione è quindi attualmente ancora oggetto di discussione, poiché i dati pubblicati fino ad ora supportano entrambe le ipotesi.

Dalla valutazione quantitativa delle citochine, quali HGF, SDF-1, VEGF, presenti nel siero dei pazienti, si può concludere che la somministrazione del G-CSF aumenta la quantità di HGF sia durante la fase della mobilizzazione sia nelle fasi successive alla reinfusione. L'Hepatocytes Growth Factor, come emerso da uno studio condotto da Weimar nel 1998, è un fattore di crescita prodotto dalle cellule stromali del midollo osseo e promuove la proliferazione, l'adesione e la sopravvivenza dei progenitori emopoietici (91).

SDF-1 è una chemochina che, con il suo recettore CXCR4, è coinvolta nel reclutamento di cellule infiammatorie a livello del danno epatico ed induce la proliferazione di progenitori duttulari endogeni. Inoltre l'interazione fra ligando e recettore partecipa alla mobilizzazione di cellule staminali emopoietiche dal midollo osseo e favorisce la migrazione di queste cellule staminali a livello del danno epatico (92). I risultati di questo studio portano ad ipotizzare una correlazione fra l'aumento di questa chemochina e le sue funzioni quali "homing", proliferazione e differenziamento delle cellule staminali emopoietiche reinfuse.

L'aumento del Vascular Endothelial Growth Factor, sia nella fase di mobilizzazione (al giorno T+5) che durante la fase successiva alla reinfusione (R+1) suggerisce un inizio di neoangiogenesi e di vasculogenesi all'interno del fegato cirrotico (93).

### **3.7 CONCLUSIONE**

Concludendo quindi non sembra che la terapia cellulare possa aver contribuito ad un aggravamento dell'epatopatia. D'altro canto però anche i dati sull'efficacia, ed i dati biologici non sembrano dimostrare alcuna variazione significativa della funzione epatica né in miglioramento ma neanche in peggioramento. Probabilmente tutte le variazioni biologiche osservate (espressione di marker staminali ed endoteliali ed espressione delle citochine sieriche) sono causate dalla somministrazione del G-CSF, infatti osservando i dati alle diverse tempistiche (sia durante la mobilitazione che nella fase successiva alla reinfusione) si vede che le variazioni fenotipiche sono strettamente legate alla somministrazione del fattore di crescita G-CSF

## BIBLIOGRAFIA

---

1. Wulf GG, Jackson KA, et al. Somatic stem cell plasticity: current evidence and emerging concepts. *Exp Hematol* 2001; 29:1361-70.
2. <http://staminali.wordpress.com/la-ricerca/>
3. Till JE, McCulloch, et al. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963; 197:452-4.
4. Till JE, McCulloch, et al. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *PNAS* 1968; 59(4):1209-15.
5. Verfaillie C. Pluripotent stem cell. *Transfusion Clinique et Biologique* 2009;16:65–69
6. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ, Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997;88: 287-296
7. Wagers AJ, Weissman IL, Plasticity of Adult Stem Cell. *Cell* 2004;116:639-648
8. <http://stemcells.nih.gov.asp>
9. Boyer LA, Lee TI, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2006;122:947–56.
10. Ivanova N, Dobrin R, et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 2006;442:533–8
11. Toma JG, Akhavan M, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol.* 2001;3:778–784
12. Jiang Y, Jahagirdar BN, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41–49
13. Cao B, Zheng B, et al., Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat. Cell Biol.* 2003;5:640–646
14. Jiang Y, Vaessen B, et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp. Hemadletol* 2002;30:896–904

15. Blau HM, Brazelton TR, et al. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 2001;105:829–841
16. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta et al., Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279:1528–1530
17. Anderson JM. Multinucleated giant cells. *Curr. Opin. Hematol.* 2000;7:40–47
18. Vignery A. Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int. J. Exp. Pathol.* 2000;81:291–304.
19. Alvarez-Dolado M, Pardal R, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003;425:968–973.
20. Vassilopoulos G, Wang PR, et al. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003;422:901–904.
21. Wang X, Willenbring H, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003;422:897–901.
22. Weimann JM, Johansson CB, et al. Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat. Cell Biol.* 2003;5:959–966
23. Yeh WT, Zhang S, et al. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34<sup>+</sup>-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells and smooth muscle cells in vivo. *Circulation.* 2003; 108(17):2070-3
24. Gangenahalli GU, Singh VK, et al. Hematopoietic stem cell antigen CD34: role in adhesion or homing. *Stem Cell Dev.* 2006; 15(3):035-13
24. Pelosi E, Valteri M, et al. Identification of the Hemangioblast in post natal life. *Blood* 2002; 100:3203-8
25. am Esch JS 2<sup>nd</sup>, Knoefel WT et al. Portal application of autologous CD133<sup>+</sup> bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells*, 2005; 23(4):463-70
26. Reyes M, Lund T, et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 98:2615-25
27. Jiang Y, Henderson D, al. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *PNAS* 2003; 100:11854-60.

28. Schwartz RE, Reyes M, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte like cell. *J Clin Invest* 2002; 109:1291-1302
29. De Coppi P, Bartsch G Jr et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotech* 2007; 25(1):100-6
30. Tura S. (2003) *Lezioni di Ematologia*. Esculapio 2003
31. Ronald A. Sacher, Richard A. *Interpretazione clinica degli esami di laboratorio*. McGraw-Hill 2001
32. Stella CC, Cazzola M, et al., CD34-Positive cells: biology and clinical relevance. *Haematologica* 1995;80:367-387
33. Haylock DN, Nilsson SK, Stem cell regulation by the hematopoietic stem cell niche. *Cell Cycle* 2005;10:1353-1355
34. Wang LD, Wagers AJ. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2011;12: 643–655
35. Seita J, Weissman IL, Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010;2:640–653
36. Herzog EL, Chai L, et al. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003;102:3483–3493
37. Kawano Y, Kobunea M, et al. Ex vivo expansion of G-CSF-mobilized peripheral blood CD133+ progenitor cells on coculture with human stromal cells. *Exp. Hemat.* 2006;34:150–158
38. Elkhafif N, El Baz H, et al., CD133<sup>+</sup> human umbilical cord blood stem cells enhance angiogenesis in experimental chronic hepatic fibrosis. *APMIS* 2011;119:66-75
39. Mizrak D, Brittan M, et al. CD133: molecule of the moment. *J Pathol.* 2008;214:3-9
40. Gehling UM, Ergun S, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000;95:3106-3112
41. Yin AH, Miraglia S, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;90:5002-12

42. de Wynter EA, Buck D, et al. CD34<sup>+</sup>AC133<sup>+</sup> cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 1998; 16:387–396
43. Gallacher L, Murdoch B, et al. Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 2000; 95:2813–2820
44. Lang P, Bader P, et al., Transplantation of a combination of CD133<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup> selected progenitor cells from alternative donors. *Br J Haematol* 2004; 124:72–79
45. Bitan M, Shapira MY, et al. Successful transplantation of haploidentically mismatched peripheral blood stem cells using CD133<sup>+</sup>-purified stem cells. *Exp Hematol* 2005;33:713–718
46. Bussolati B, Bruno S, et al., Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol* 2005;166:545–555
47. Ribatti D, The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2004;8:294–300
48. Uchida N, Buck DW, et al., Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:14720–14725
49. Galun E, Axelrod JH. The role of cytokines in liver failure and regene: potential new molecular therapies *Biochimica et Biophysica acta* 2002; 1592: 345-358
50. Kucia M, Ratajczak J, et al. Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol Dis.* 2004 Jan-Feb;32(1):52-7
51. Bird TG, Lorenzini S, et al. Activation of Stem Cell in Hepatic Diseases. *Cell Tissue Res* 2008; 331:283-300
52. Wilson JW, Leduc EH. Roles of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *J Pathol Bacteriol* 1958; 76:441-9
53. Wilson JW, Groat CS, et al. Histogenesis of the liver. *Ann NY Acad Sci* 1963;111:8-22

54. Lanconi S, Correli F, et al. Liver regeneration in response to partial hepatectomy in rats treated with retrorsine: a kinetic study. *J Hepatol* 1999; 31:1069-74
55. Petersen B.E., Bowen W.C., et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284:1168-70
56. Falkowski O, An HJ, et al. Regeneration of hepatocyte 'buds' in cirrhosis from intrabiliary stem cells. *J Hepatol* 2003;39:357-64
57. Roskams TA, Libbrecht L, et al. Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis* 2003; 23:385-96
58. Fallowfield JA, Mizuno M, et al. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J Immunol* 2007;178:5288-95
59. Yasoshima M, Tsuneyama K, et al. Immunohistochemical analysis of cell-matrix adhesion molecules and their ligands in the portal tracts of primary biliary cirrhosis. *J Pathol* 2000;190: 93–9
60. Paku S, Dezso K, et al. Immunohistochemical analysis of cytokeratin 7 expression in resting and proliferating biliary structures of rat liver. *Hepatology* 2005;42:863-70
61. Sherlock S., *Malattie del fegato*, Piccin- Nuova Libreria
62. Blachier M, Leleu H, et al. The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *J Hepatol* 2013;58:593-608
63. [www.trapianti.salute.gov.it/cnt](http://www.trapianti.salute.gov.it/cnt)
64. Allen JW, Hassanein T, et al. Advances in bioartificial liver devices. *Hepatology* 2001; 34: 447-455
65. Gagandeep S, Sokhi R, et al. Hepatocytes transplantation improves survival in mice with liver toxicity induced by hepatic overexpression of Mad1 transcription factor. *Mol Ther* 2000; 4: 358-365
66. Grossman M, Rader DJ, et al. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nature* 1995; 1: 1148-1154

67. Gaia S, Olivero A et al. Feasibility and safety of G-CSF administration to induce bone marrow-derived cells mobilization in patients with end stage liver disease. *J. Hepatol* 2006;45:13-19
68. Camargo FD, Finegold M, et al. Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners. *J Clin Invest.* 2004, 9:1266-70.
69. Theise ND, Badve S, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31:235-40
70. Okumoto K, Saio T, et al. Characteristics of rat bone marrow cells differentiated into a liver cell lineage and dynamics of the transplanted cells in the injured liver. *J Gastroenterol.* 2006;41:62-9
71. Alison MR, Poulsom R, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406:257
72. Ghelting UM, Willelms M, et al. Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of hematopoietic progenitors cells in human healthy liver donors. *J Hepatol.* 2005;43(5):845-53
73. Lemoli RM, Catani L, et al. Mobilization of bone marrow-derived hematopoietic and endothelial stem cells after orthotopic liver transplantation and liver resection. *Stem Cells,* 2006;24(12):2817-25
74. Kollet O, Shvitiel S, et al. HGF, SDF-1 and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem recruitment to the liver. *J Clin Invest.* 2003;112(2):160-9
75. Sakaida I, Terai S, et al (2005) Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. *Med Mol Morphol* 2005;38:197-202
76. Roberts AW. G-CSF: Key regulator of neutrophil production, but that's not at all! *Grow Factors* 2005;23:33-41
77. Theokaris SE, Agapitos EB, et al. Effect of two forms of granulocyte-colony stimulating factor on hepatic regeneration after 70% partial hepatectomy in rats. *Clin Sci* 1997;92:315-20
78. Piscaglia AC, Shupe TD et al. Granulocyte-colony stimulating factor promotes liver repair and induces oval cell migration and proliferation in rats. *Gastroenterology* 2007;133:619-31

79. Petersen BE, Bowen WC, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170.
80. Theise ND, Badve S, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31: 235-240.
81. Lagasse E, Connors H, et al. Purified hemopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med* 2000; 6: 1229-1234
82. Krause D, Theise N, et al. Multi-organ, multilineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cells. *Cell* 2001; 105: 369-377.
83. Theise ND, Nimmakayalu M, et al. Liver from bone marrow in the humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16;
85. Nikeghbalian S, Pournasr B, et al. Autologous transplantation of bone marrow-derived mononuclear and CD133(+) cells in patients with decompensated cirrhosis. *Arch Iran Med.* 2011 Jan;14(1):12-7
86. Lorenzini S, Isidori A, et al. Stem cell mobilization and collection in patients with liver cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:932–9
87. Torrente Y, Belicchi M, et al. Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest* 2004;114:182-95.
88. Corallo M, Rutella S, et al. Human cord blood CD133+ cells immunoselected by a clinical-grade apparatus differentiate in vitro into endothelial- and cardiomyocyte-like cells. *Transfusion* 2007;47:280-9.
89. Hill JM et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. *New England Journal of Medicine* 2003;348:593-600.
90. Tura O, Crawford J, et al. G-CSF depresses angiogenesis in vivo and in vitro: implications for sourcing cells for vascular regeneration therapy. *J Thromb Haemost* 2010 Jul;8(7):1614-23
91. Weimar IS, Miranda N, Muller EJ et al., Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34+). *Exp Hematol.* 1998 Aug;26(9):885-94.

92. Dalakas E, Newsome PN, Harrison DJ, et al., Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *FASEB J.* 2005 Aug;19(10):1225-31
93. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal.* 2007 Oct;19(10):2003-12