



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN  
Scienze Biomediche

**CICLO XXX**

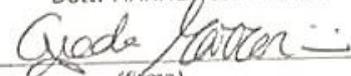
COORDINATORE Prof. **PERSIO DELLO SBARBA**

***Ambiente e Genetica: due attori nello sviluppo  
e progressione del danno epatico***

Settore Scientifico Disciplinare MED /12

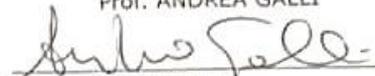
**Dottorando**

Dott. MARRONCINI GIADA

  
(firma)

**Tutore**

Prof. ANDREA GALLI

  
(firma)

**Coordinatore**

Prof. PERSIO DELLO SBARBA

  
(firma)

Anni 2014/2017

A Luna, con cui la  
vita ha un sapore  
speciale

# 1 SOMMARIO

---

<b>2</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>2.1</b>	<b>ANATOMIA MACROSCOPICA DEL FEGATO</b>	<b>1</b>
<b>2.2</b>	<b>ANATOMIA MICROSCOPICA DEL FEGATO</b>	<b>7</b>
<b>2.2.1</b>	LE COMPONENTI CELLULARI A LIVELLO SINUSOIDALE	<b>8</b>
<b>2.2.2</b>	LA COMPONENTE EPITELIALE: GLI EPATOCITI	<b>10</b>
<b>2.2.3</b>	I MONOCITI-MACROFAGI EPATICI: LE CELLULE DI KUPFFER	<b>12</b>
<b>2.2.4</b>	I COLANGIOCITI E LE VIE BILIARI INTRAEPATICHE	<b>13</b>
<b>2.2.5</b>	LE HSC "HEPATIC STELLATE CELL"	<b>15</b>
<b>2.2.6</b>	LE CELLULE DI ITO E IL LORO RUOLO NEL PROCESSO FIBROGENICO	<b>17</b>
<b>2.3</b>	LA FIBROSI EPATICA	<b>19</b>
<b>2.4</b>	NAFL E NASH	<b>22</b>
<b>2.5</b>	L'EPATOCARCINOMA	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>SCOPO DELLO STUDIO</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>PROGETTI</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>PROGETTO 1°: SIRT1 NELLA FIBROGENESI EPATICA</b>	<b>30</b>
<b>4.1.1</b>	LE SIRTUINE	<b>30</b>
<b>4.1.2</b>	SIRT 1	<b>34</b>
<b>4.1.3</b>	RISULTATI (1)	<b>38</b>
<b>4.2</b>	<b>CONCLUSIONI DEL 1° PROGETTO</b>	<b>51</b>
<b>4.3</b>	<b>PROGETTO 2°: IL RUOLO DELL'INQUINAMENTO AMBIENTALE NELLA PROMOZIONE DELL'HCC</b>	<b>53</b>
<b>4.3.1</b>	LA DIETA OCCIDENTALE	<b>53</b>
<b>4.3.2</b>	IL PARTICOLATO ATMOSFERICO: PM10	<b>55</b>
<b>4.3.3</b>	IL PM10 (PARTICULATE MATTER $\leq 10\mu\text{M}$ )	<b>58</b>
<b>4.3.4</b>	RISULTATI (2)	<b>60</b>
<b>4.4</b>	<b>CONCLUSIONI 2° PROGETTO</b>	<b>81</b>
<b>5</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>83</b>
<b>5.1</b>	<b>LE COLTURE CELLULARI</b>	<b>83</b>
<b>5.1.1</b>	STUDIO DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE MEDIANTE INCORPORAZIONE DI TIMIDINA TRIZIATA (TH3)	<b>85</b>
<b>5.2</b>	<b>ESTRATTI NUCLEARI</b>	<b>86</b>
<b>5.3</b>	<b>ESTRATTI CITOPLASMATICI E MITOCONDRIALI</b>	<b>87</b>
<b>5.1</b>	<b>RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTION- POLYMERASE CHAIN REACTION)</b>	<b>87</b>

<b>5.2</b>	<b>PROCESSO DI PREPARAZIONE PER ANALISI ISTOLOGICHE</b>	<b>88</b>
5.2.1	COLORAZIONI ISTOLOGICHE	90
5.2.2	IMMUNISTOCHEMICA	91
5.2.3	IMMUNOFLUORESCENZA SU SEZIONI ISTOLOGICHE	92
5.2.4	IMMUNOFLUORESCENZA SU CELLULE	93
<b>5.3</b>	<b>ESTRAZIONE DI PROTEINE TOTALI DA TESSUTI</b>	<b>94</b>
<b>5.4</b>	<b>WESTERN BLOT</b>	<b>94</b>
<b>5.5</b>	<b>PROTEOMICA: 2D DIGE</b>	<b>95</b>
5.5.1	ESTRAZIONE PROTEICA	96
5.5.2	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI ALLA MARCATURA	96
5.5.3	MARCATURA DEI CAMPIONI	97
5.5.4	PRIMA DIMENSIONE: ISOELETTROFOCALIZZAZIONE	98
5.5.5	EQUILIBRAZIONE DELLE STRIPS	99
5.5.6	SECONDA DIMENSIONE: SDS-PAGE	100
5.5.7	ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI	100
5.5.8	IL MODULO DIA (DIFFERENTIAL IN-GEL ANALYSIS)	101
5.5.9	IL MODULO BVA (BIOLOGICAL VARIATION ANALYSIS)	102
5.5.10	IL MODULO EDA (EXTENDED DATA ANALYSIS)	103
5.5.11	IDENTIFICAZIONE DELLE PROTEINE	104
<b>5.6</b>	<b>MODELLI MURINI</b>	<b>104</b>
5.6.1	ANALISI DELLE MASSE TUMORALI	106
5.6.2	ANALISI STATISTICHE	106
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>109</b>

---

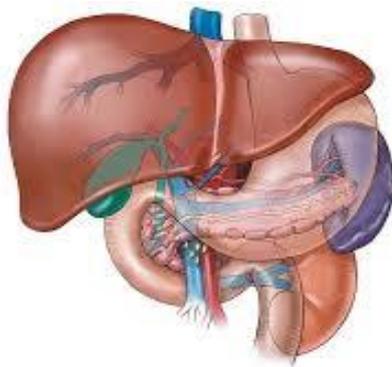
## 2 INTRODUZIONE

---

### 2.1 ANATOMIA MACROSCOPICA DEL FEGATO

Il fegato è una ghiandola extramurale anficrina (a secrezione endocrina ed esocrina) localizzata al di sotto del diaframma tra il colon trasverso e lo stomaco.

È la ghiandola più voluminosa del corpo umano, infatti localizzandosi nella cavità addominale



*Fig. 1. Localizzazione anatomica del fegato*

superiore occupa la quasi totalità dell'ipocondrio destro e dell'epigastrio, spingendosi con il lobo sinistro ad occupare anche una parte dell'ipocondrio sinistro, che può risultare più o meno cospicua a seconda del soggetto (*Fig.1*). Il

fegato gioca un ruolo fondamentale nel

mantenere l'omeostasi metabolica nei processi digestivi ed infatti le sue principali funzioni sono:

- La regolazione e processazione degli aminoacidi, dei carboidrati, dei lipidi e delle vitamine della dieta;
- La filtrazione e fagocitosi di materiale afferente dalla circolazione splacnica;
- La sintesi di proteine sieriche;
- La biotrasformazione dei metaboliti circolanti e la loro detossificazione;
- L'escrezione di bile formata da prodotti endogeni di scarto e da agenti estranei;
- Ed è, infine, il più importante organo emopoietico fino al 6° mese di vita intrauterina (1)

La funzione di sintesi del fegato è riferita principalmente alla produzione di albumine, fibrinogeno, globulina, eparine e fattori di coagulazione, per cui la parte proteica del plasma, che mantiene la pressione sanguigna ed è importante nei fenomeni di coagulazione. Tra le varie

proteine plasmatiche prodotte dal fegato la più importante è senz'altro l'albumina, che costituisce il 70% di tutte le proteine plasmatiche, ed è fondamentale per il mantenimento della pressione oncotica del plasma.

Il fegato è una ghiandola annessa all'apparato digerente modellata dai suoi rapporti con gli organi e i muscoli adiacenti ed è ricoperto da una capsula connettivale, detta Capsula di Glisson, che lo protegge e lo rende, visto dall'esterno, liscio e di colore rosso-brunastro; nei pazienti obesi che presentano un parenchima epatico ricco di infiltrazioni di tessuto adiposo (fegato steatotico) il fegato acquisisce, invece, un colorito giallastro.

Superiormente il fegato si colloca a livello della 6<sup>a</sup> costa e della 10<sup>a</sup> vertebra toracica e qui la sua capsula fibrosa di Glisson si riflette sul diaframma e sulla parete addominale.

La superficie del fegato viene comunemente distinta in cinque facce: superiore, anteriore, destra, posteriore ed inferiore. Le facce superiore, anteriore e destra sono continue tra loro e ci si può riferire all'insieme definendolo superficie diaframmatica del fegato.

La faccia antero-superiore o diaframmatica del fegato è liscia e convessa; guarda in alto e in avanti ed è limitata anteriormente e in basso dal margine anteriore e posteriormente dalla riflessione del peritoneo che forma il foglietto superiore del legamento coronario. Su tale faccia si trova il solco sagittale superiore che si estende dal margine antero-inferiore alla faccia posteriore decorrendo dal basso in alto e leggermente da sinistra a destra; a livello del solco sagittale si ha

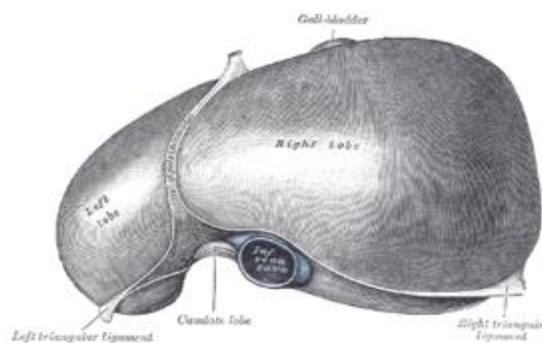


Fig. 2 Faccia superiore del fegato.

la riflessione delle lamine peritoneali che costituiscono il legamento falciforme. Il solco corrisponde quindi all'origine sulla faccia epatica del legamento falciforme e quindi al margine inferiore di questo. La faccia diaframmatica è divisa dal solco sagittale superiore in due lobi,

destro e sinistro (fig.2). La faccia diaframmatica del lobo sinistro è meno estesa e convessa della destra e presenta in prossimità del solco sagittale superiore una depressione detta impressione cardiaca, corrispondente all'apice del cuore; mentre a livello della faccia superiore del lobo destro si distinguono dei solchi di 4-6 cm di lunghezza detti impressioni diaframmatiche.

**La faccia postero-inferiore o viscerale** del fegato è leggermente concava e volge in direzione

posteriore e verso sinistra. La faccia posteriore del fegato è in rapporto con il diaframma e si presenta convessa in senso orizzontale;

leggermente a sinistra della sua parte media

presenta una profonda incisura dovuta al rapporto con la colonna vertebrale, l'incisura vertebrale (Fig.3). Questa corrisponde alla 9<sup>a</sup>-

10<sup>a</sup> e 11<sup>a</sup> vertebra toracica. In questo tratto, la

faccia posteriore del fegato si mette in rapporto con le formazioni che attraversano il diaframma,

ossia con la vena cava inferiore, con l'aorta, con l'esofago e con i nervi vaghi. La faccia posteriore del fegato risulta priva di rivestimento peritoneale e risulta quindi in diretto contatto con il diaframma. La sua superficie irregolare è percorsa da tre solchi, il sagittale destro, il sagittale sinistro e il trasverso. Il solco sagittale destro è costituito da un tratto anteriore e uno posteriore. Quello anteriore è ampio, accoglie la cistifellea, prende il nome di fossa cistica e raggiunge intaccando il margine anteriore del fegato a livello dell'incisura cistica. Il tratto posteriore si estende sino alla faccia posteriore e accoglie la vena cava inferiore, denominato quindi fossa della vena cava separato dalla fossa cistica da un prolungamento del lobo caudato che prende il nome di tubercolo caudato.

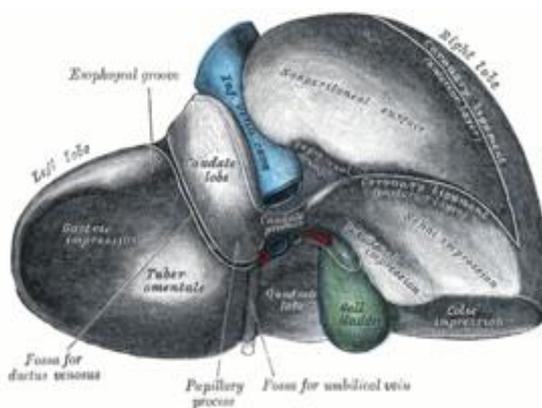
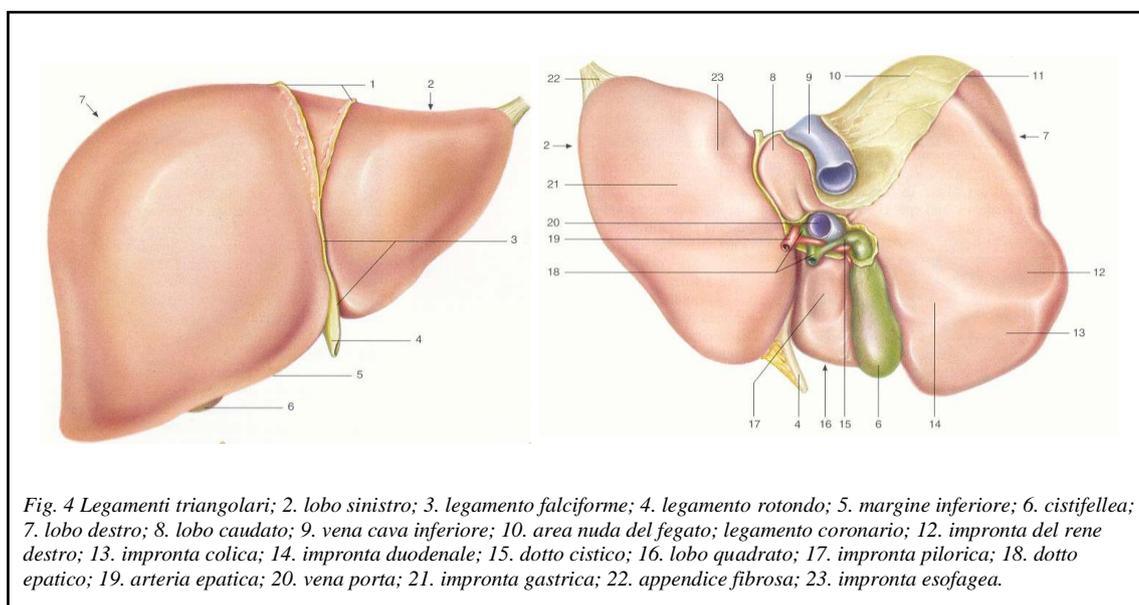


Fig. 3 Faccia posteriore del fegato. Si distinguono un lobo concavo a sinistra e un lobo convesso a destra

Il solco sagittale sinistro è profondo ed è anch'esso diviso in due tratti. Il tratto anteriore contiene il legamento rotondo e raggiunge il margine anteriore determinandovi l'incisura del legamento rotondo. Il solco trasverso rappresenta l'ilo epatico ed è più prossimo alla faccia posteriore che al margine anteriore. Accoglie le formazioni del peduncolo epatico che all'indietro in avanti sono: i rami di divisione della vena porta, dell'arteria epatica, i dotti epatico destro e sinistro e vi si trovano inoltre i linfatici del fegato e i rami nervosi del plesso epatico e del plesso biliare. I due solchi sagittali e quello trasverso consentono di individuare sulla faccia viscerale del fegato (*Fig.4*):

- un lobo destro, a destra del solco sagittale; il lobo destro è il più voluminoso dell'organo, ha forma vagamente cupolare che comprende almeno in parte tutte le cinque facce del fegato ed è riconoscibile dall'impronte del rene destro, del duodeno e del colon trasverso;
- un lobo sinistro, a sinistra del solco sagittale sinistro; il lobo sinistro ha un volume pari a circa la metà del destro ed esso è più sottile, ha forma triangolare, riconoscibile dall'impronta gastrica
- un lobo quadrato, tra i due solchi sagittali e davanti al solco trasverso; il lobo quadrato ha la superficie pressoché piana e si mette in rapporto con la faccia anteriore della parte pilorica dello stomaco e con la prima porzione del duodeno
- un lobo caudato (di Spigelio) tra i due solchi sagittali e dietro al solco trasverso; il lobo caudato (di Spigelio) si prolunga in basso e indietro, entrando in rapporto con il pilastro destro del diaframma e con la parete della vena cava inferiore. L'estremità anteriore presenta due prolungamenti di cui uno, tondeggiante detto "processo papillare" e l'altro che volge a destra dividendo il solco sagittale destro nelle sue due parti ed è il "tubercolo caudato.

**Il margine antero-inferiore del fegato**, sottile e tagliente, decorre dall'alto in basso e da sinistra



a destra. Presenta due incisure che corrispondono all'estremità anteriore del solco sagittale sinistro (incisura ombelicale o del legamento rotondo) e all'estremità anteriore del solco sagittale destro (incisura cistica). Il margine anteriore è in rapporto a destra con l'8<sup>a</sup>-9<sup>a</sup> costa sull'emiclaveare, attraversa quindi l'epigastri, per mettersi in rapporto con la 6<sup>a</sup>-7<sup>a</sup> costa sinistra. In corrispondenza dell'estremo sinistro di questo margine si trova un prolungamento fibroso, la cosiddetta "appendice fibrosa del fegato".

**Il margine postero-superiore** del fegato è arrotondato e delimita la faccia superiore rispetto alla posteriore. A destra della vena cava esso presenta l'impronta della ghiandola surrenale destra; a sinistra della vena cava è formato dalla estremità posteriore del processo caudato

Il fegato, tuttavia, non è più suddiviso, come si usava in base ai procedimenti anatomici superficiali macroscopici, in lobi destro e sinistro dal legamento falciforme, ma viene invece studiato in base a criteri vascolari, come proposto da Claude Couinaud nel 1957, perché più strettamente correlati alla fisiologia dell'organo. Si distinguono perciò quattro settori (laterale destro, mediale destro, mediale sinistro, laterale sinistro), ciascuno determinato da una

ramificazione della vena porta, e sei fessure (portale destra, portale principale, ombelicale, portale sinistra, venosa, di Gans), ovvero spazi intersettoriali. Ciascun settore è ulteriormente diviso in 1-4 segmenti, per un totale di nove segmenti, che vengono convenzionalmente indicati con il corrispondente numero romano. I segmenti sono suddivisi in base alle ramificazioni terziarie della vena porta, dell'arteria epatica e dei condotti biliari che sono contenuti nei peduncoli glissoniani, perché avvolti dalla quaina di Glisson. Il fegato viene irrorato dalla arteria epatica, il principale vaso arterioso che origina dal tronco encefalico, ove viene chiamata arteria epatica comune, poi si porta anteriormente e lateralmente, passa posteriormente al foro

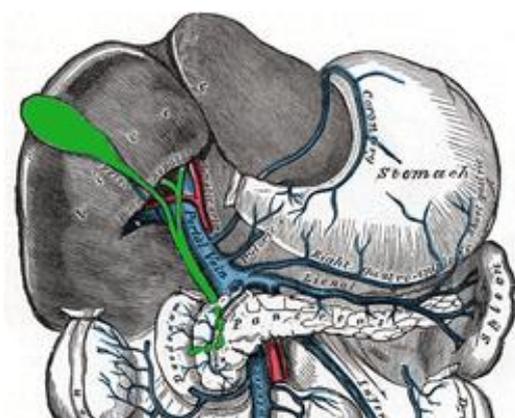


Fig. 5 Ramificazioni della vena porta di sinistra e di destra a livello dell'Ilo epatico

epiiloico, superiormente al duodeno ed entro il piccolo omento. Durante il suo decorso emette quali suoi rami, le arterie gastriche sinistra (spesso) e destra e l'arteria gastroduodenale. A questo punto viene denominata arteria epatica propria. In seguito curva superiormente e posteriormente davanti alla vena porta, ramificandosi in arteria epatica sinistra ed arteria

epatica destra. Posteriormente alle due ramificazioni dell'arteria epatica entra nell'ilo la vena porta con le sue due ramificazioni (vena porta sinistra e vena porta destra), la destra di calibro maggiore della sinistra. La vena porta ha il compito di convogliare al fegato il sangue proveniente dalla digestione intestinale e dalla milza, costituendo un sistema detto appunto sistema della vena porta o portale (Fig. 5). L'ilo, costituito da una depressione posta sulla superficie inferiore del fegato, è il luogo nel quale tutti i vasi e i dotti penetrano nell'organo, dove si origina il sistema biliare che drena la bile prodotta dagli epatociti del fegato verso la cistifellea per l'immagazzinamento e verso il duodeno per la secrezione intestinale. Il sistema biliare è formato

da vasi che si possono definire intra o extra epatici: le vie biliari extraepatiche iniziano con i dotti epatici destro e sinistro che si uniscono nel dotto epatico comune, lungo 2-3 cm e dal diametro di circa 5mm, quest'ultimo poi si connette col dotto cistico, che drena la cistifellea, e forma un unico dotto escretore, il coledoco, che sboccherà poi nel duodeno. Il coledoco che raccoglie tutte le vie biliari (epatica e cistica) è lungo circa 4–5 cm e di 6 mm di diametro, esso corre nel legamento duodeno epatico, passa dietro la testa del pancreas e davanti la vena cava, poi attraversa trasversalmente lo spessore della parete duodenale dove si unisce con il dotto pancreatico e sbocca nella papilla duodenale maggiore, piccola rilevazione con foro centrale della mucosa del duodeno discendente.

## 2.2 ANATOMIA MICROSCOPICA DEL FEGATO

Classicamente il parenchima epatico è stato suddiviso in lobuli, orientati verso i tributari terminali della vena epatica, che hanno un aspetto esagonale e all'interno dei quali troviamo gli epatociti, cellule molto grandi e metabolicamente molto attive, ricche di mitocondri e di

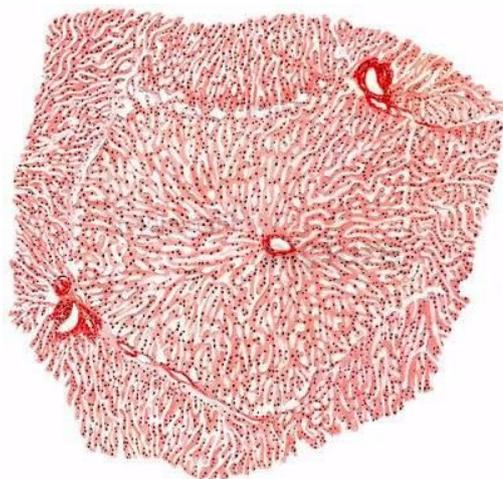


Fig. 6 Visione di insieme del parenchima epatico

endomembrane. Al microscopio gli epatociti si presentano come cordoni di cellule disposte radialmente attorno alla vena centro-lobulare (Fig.6), tra i quali si pongono i sinusoidi vascolari, che sono rivestiti da uno strato discontinuo di cellule endoteliali fenestrate delimitanti lo spazio extrasinusoidale di Disse, nel quale sporgono numerosi microvilli epatocitari. Tra un lobulo

epatico e l'altro si ha del tessuto connettivo che fa da impalcatura all'organo e all'interno del quale decorrono i vasi sanguigni, linfatici, i nervi e i dotti biliari. Il sangue sia venoso che arterioso che arriva negli spazi portalici tra due lobuli adiacenti, decorre lungo tutto il lobulo tra i cordoni

di epatociti, mentre il sangue all'interno dei sinusoidi decorre verso la vena centro-lobulare dove arriva purificato e viene raccolto per essere mandato in circolo. Per espletare la loro funzione al meglio, gli epatociti sono strutturati in lobuli detti Triadi, strutture costituite da un'arteria epatica, una vena porta e un dotto biliare (Fig.7):

- la vena porta defluisce all'interno del lobulo epatico ed entra in contatto con gli epatociti dove è detossificato, ritorna nella vena centro-lobulare per poi essere raccolto nella vena sub-lobulare e uscire tramite la vena cava;

- l'arteria epatica, porta invece sangue ricco di ossigeno e di nutrienti per gli epatociti, grazie alle sue numerose diramazioni nel parenchima epatico;

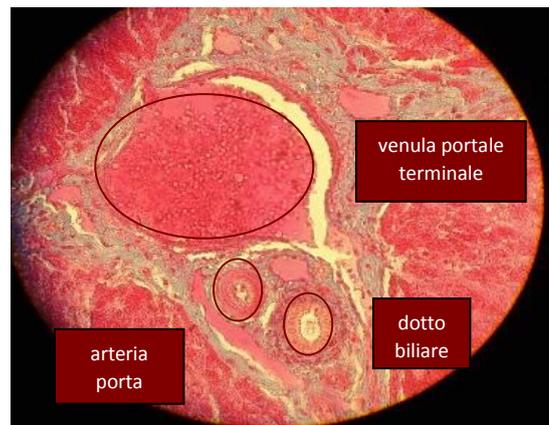


Fig.7 Triade epatocitaria. Si identificano le tre componenti fondamentali del lobulo epatico:venula portale terminale, dotto biliare, arteria porta.

- la terza componente della triade, il dotto biliare, raccoglie il secreto degli epatociti, per cui la bile defluisce, dai canalicoli biliari degli epatociti, in senso contrario alla circolazione sanguigna verso il dotto biliare. Solitamente "la Triade" appare come costituita da tre vasi ben evidenti, ma normalmente se ne possono contare molti di più; il vaso più grande è la vena porta perché trasporta molto più sangue rispetto alle arterie, ha un endotelio sottile e nessuna muscolatura, poi ci sono le arterie portali di medio calibro in cui è ben evidente la fascia muscolare attorno al lume ed infine di fianco alle arterie c'è il dotto biliare, facilmente riconoscibile perché ha un epitelio cubico (nucleo centrale tondeggiante in cellule quadrate).

### 2.2.1 Le componenti cellulari a livello sinusoidale

I sinusoidi sono dei particolari vasi sanguigni che fanno parte del sistema portale epatico, in quanto il sangue che arriva al fegato defluisce dalla parte esterna del lobulo, lungo i sinusoidi

verso la vena centro-lobulare, all'interno del lobulo. I sinusoidi epatici sono capillari sanguiferi, a parete sottile, lume ampio e irregolare ed endotelio fenestrato e tortuoso; essi convogliano il sangue dalle diramazioni dell'arteria epatica e della vena porta, collocate alla periferia del lobulo epatico, verso la vena centro lobulare disposta sull'asse lobulare. Nei Sinusoidi scorre sangue misto, cioè sia arterioso proveniente dall'arteria epatica, sia venoso, proveniente dai rami portal. La loro parete è essenzialmente costituita da cellule endoteliali appiattite che la rendono discontinua per la presenza nell'endotelio, di numerosi pori e fenestrature variabili per grandezza e posizione. I pori, di diametro non superiore a  $0,1-0,2\mu\text{m}$ , possono presentarsi isolati o, più spesso, riuniti in gruppi, mentre le fenestrature potrebbero raggiungere un diametro anche superiore a  $1\mu\text{m}$ . La parete endoteliale appare, inoltre, interrotta da sottili prolungamenti citoplasmatici tipo amebeide che sporgono nel lume sinusoidale. Tali prolungamenti possono essere o in contatto con le cellule endoteliali o localizzati nello spazio sotto-endoteliale. Oltre alle cellule endoteliali, nella parete dei sinusoidi si trovano due tipo di cellule caratteristiche:

- All'interno del lume sinusoidale, vediamo le cellule di Kupffer (Fig.8), popolazione cellulare appartenente al sistema fagocitico-monocitario, che sono indispensabili per l'eliminazione degli

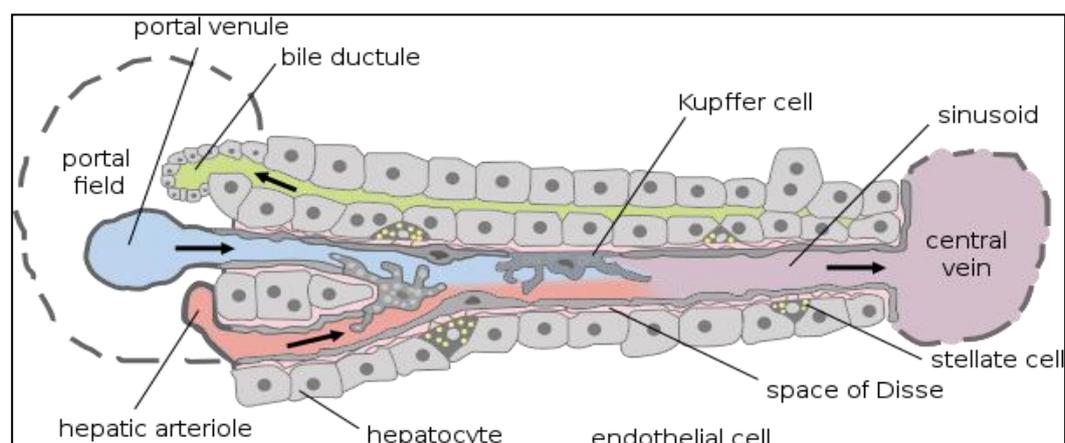


Figura 8. Popolazioni cellulari a livello dei Sinusoidi epatici. Si distinguono Kupffer cell e cellule stellate

elementi di scarto che decorrono lungo i Sinusoidi, come globuli bianchi e rossi non più funzionali e di batteri che possono essere entrati in circolo.

- A livello peri-sinusoidale, nel cosiddetto Spazio di Disse esse assumono una forma stellata, per cui vengono dette *cellule stellate* che in fase di quiescenza si presentano come dei lipociti, e svolgono un ruolo di accumulo della vitamina A e vanno incontro ad attivazione acquisendo un fenotipo miofibroblastico durante la risposta al danno nei processi infiammatori (“Le basi patologiche della malattia” Robbins, Piccin ).

### 2.2.2 La componente epiteliale: gli Epatociti

Gli epatociti sono le cellule più numerose del fegato e ne costituiscono circa l’80% del volume, sono di forma poliedrica, con sei o più facce e misurano in sezione 20-25 µm. Nel citoplasma degli epatociti si trovano tutti gli organuli cellulari oltre ad inclusi caratteristici (Fig. 9):

- i lisosomi, i perossisomi e le vescicole dell'apparato di Golgi che sono generalmente localizzati in prossimità del polo biliare dove sono impegnati in funzioni secretive;
- il reticolo endoplasmatico è abbondante e l’estensione delle sue cisterne subisce continue variazioni che riflettono le diverse funzioni nelle quali l’epatocita è impegnato. Per esempio, sulle membrane del

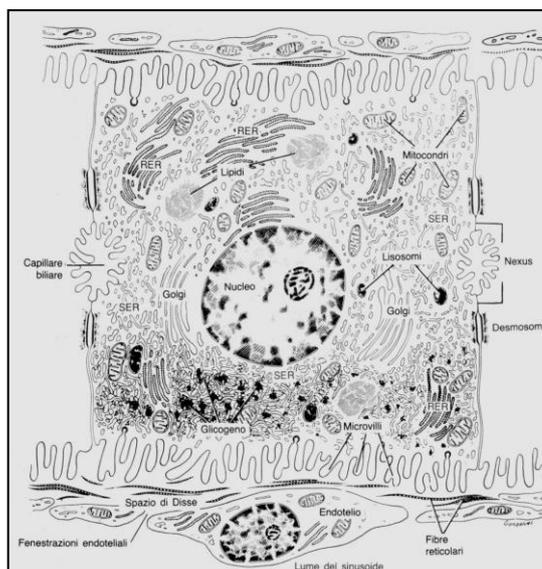


Fig. 9 Organuli cellulari e inclusi caratteristici di un epatocita

reticolo endoplasmatico liscio si trovano gli enzimi implicati nella sintesi del colesterolo a partire dai lipidi assorbiti dal sangue attraverso il polo vascolare dell’epatocita. Sempre a livello quest’organulo si svolge la funzione di detossificazione di alcuni farmaci, mentre a livello del

reticolo endoplasmatico granulare, i ribosomi liberi sono impegnati nella sintesi delle proteine plasmatiche, quali albumina e fibrinogeno, riversate in circolo attraverso il polo vascolare.

- I mitocondri sono numerosi e con creste ben sviluppate, ma possono subire variazioni di numero e di forma in rapporto alle specifiche esigenze funzionali della cellula.

- Il nucleo è voluminoso e tondeggiante e frequentemente si osservano casi di poliploidia. Gli epatociti che entrano in mitosi sono numerosi soltanto durante i processi rigenerativi.

L'organizzazione "a cordoni" degli epatociti permette di avere una superficie di interscambio con i sinusoidi maggiore permettendo una migliore internalizzazione per endocitosi o pinocitosi dei materiali, a livello dello spazio di Disse. Inoltre, gli epatociti nello spazio laterale della membrana hanno una curiosa modificazione, ovvero hanno un'invaginazione della membrana plasmatica che, giustapponendosi allo stesso tipo di invaginazione della cellula adiacente da origine ai canalicoli biliari, che servono a drenare la bile dagli epatociti verso i dotti biliari. Le facce degli epatociti a stretto contatto fra loro delimitano, da un lato, i capillari biliari e sono dette poli biliari, dall'altro prospettano verso le pareti sinusoidali, dette poli vascolari; è a livello dei poli vascolari sono presenti piccole vescicole di pinocitosi e numerosi corti microvilli che aumentano la superficie della membrana plasmatica a contatto con il plasma. Si crea così un intricato sistema di spazi pericapillari e intercellulari dove il filtrato plasmatico si raccoglie e circola e dove avvengono gli scambi tra epatociti e sangue. Le cellule epatiche sono unite da giunzioni strette aventi lo scopo di impedire che la bile si infiltri tra gli spazi intercellulari obbligandola così a circolare solo nel sistema canalicolare, in quanto tossica. Le superfici cellulari volte verso i sinusoidi sono più ampie rispetto a quelle che delimitano i canalicoli biliari, in quanto gli epatociti sono maggiormente impegnati nei processi di assorbimento e secrezione che avvengono a livello del polo vascolare piuttosto che nella secrezione della bile. La struttura e il metabolismo degli epatociti variano in rapporto alla loro distanza dall'afflusso del sangue portale. Nel lobulo

classico le cellule epatiche in posizione più periferica hanno un metabolismo più elevato e un maggior numero di mitocondri poiché più favorite a ricevere sangue arterioso rispetto agli epatociti delle zone intermedie e delle zone circostanti la vena centro lobulare.

### 2.2.3 I monociti-macrofagi epatici: le Cellule di Kupffer

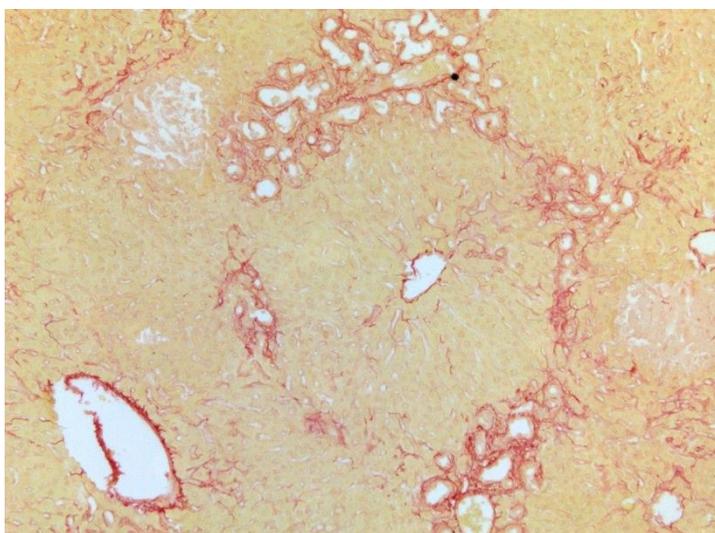
Le cellule di Kupffer costituiscono il 15% circa di tutte le cellule del fegato e si trovano ancorate al lume dei sinusoidi epatici. Sono cellule appartenenti al sistema monocitico - macrofagico ed il loro sviluppo inizia nel midollo osseo, con la genesi di promonociti e monoblasti e con la successiva maturazione in monociti del sangue periferico, completando la loro differenziazione in cellule di Kupffer, cellule macrofagiche presentanti l'antigene, una volta localizzati all'interno del fegato(2) Le cellule di Kupffer sono le prime cellule ad essere esposte al materiale assorbito dal tratto gastrointestinale (3) e sono dotate di potere fagocitario verso elementi estranei come batteri e virus. Sono inoltre in grado di sintetizzare varie sostanze, tra cui citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-6, che attivano le stellate), chemochine (MCP-I, IL-8), ossido di azoto e intermedi reattivi dell'ossigeno. Questi fattori oltre ad autoregolare le stesse cellule di Kupffer, modulano l'azione di altre cellule immunitarie e delle cellule epatiche (4) e sono così coinvolte nella patogenesi del danno epatico, svolgendo un ruolo chiave nella modulazione delle altre cellule. In seguito a danno epatico le cellule di Kupffer sono inoltre responsabili dell'attivazione di una risposta profibrogenica attraverso la produzione di TGF- $\beta$ , metalloproteinasi della matrice, PDGF (piastrine-derived growth factor) e ROS. Le cellule di Kupffer possono essere identificate attraverso l'uso di anticorpi contro l'antigene macrofagico di superficie, CD163, la glicoproteina che lega le lipoproteine a bassa densità CD68 (5) o (6), l'F4/80 facente parte della famiglia dei recettori dell'ormone a sette domini trans-membrana (7) (8). La presenza delle Kupffer non è uniforme, infatti sono più numerose a livello dello spazio peri-portale, e le vediamo invece diminuire mano a mano che ci si avvicina a livello delle zone pericentrali del fegato (9) (10). Questa loro diversa concentrazione a livello periportale e

pericentrale può essere valutata in vitro anche attraverso il dosaggio delle quantità di TNF- $\alpha$ , PGE2 e IL-1 prodotte dalla maggior parte delle Kupffer. (11)

#### 2.2.4 I colangiociti e le vie biliari intraepatiche

Le vie biliari intraepatiche rappresentano quella parte delle vie biliari che, originando a fondo cieco con i canalicoli biliari, terminano a livello delle vie biliari extraepatiche (12, 13). I canalicoli biliari sono formati dalla giustapposizione di due docce presenti sulle pareti cellulari dei poli biliari di due epatociti adiacenti. Ai canalicoli biliari fanno seguito i *canali di Hering* la cui parete

è costituita in parte da epatociti ed in parte da colangiociti. I canali di Hering si continuano nei duttuli biliari che sono completamente delimitati da colangiociti e che, dopo un breve decorso, terminano nei dotti biliari interlobulari situati nello



spazio portale. I colangiociti sono

*Fig. 10 Legatura dei dotti biliari in modello murino e proliferazione duttale.*

cellule cubiche che costituiscono l'epitelio di rivestimento delle vie biliari e che, attraverso processi di secrezione ed assorbimento sotto il controllo di ormoni e neuropeptidi, sono responsabili nella composizione finale della bile (14, 15). Dal punto di vista sperimentale, un utile modello animale per lo studio della proliferazione delle vie biliari intraepatiche è rappresentato dalla legatura delle vie biliari (*Bile Duct Ligation: "BDL"*) nel ratto o nel topo che determina una selettiva proliferazione dei dotti biliari intraepatici (Fig.10). Tale proliferazione è responsabile di un marcato incremento della massa dei dotti biliari intraepatici e dei colangiociti che arrivano a rappresentare fino al 30% delle cellule parenchimali del fegato (normalmente ne rappresentano il 2%) (16). La proliferazione dei colangiociti fa parte della cosiddetta "*ductular reaction*",

termine coniato da *Popper et al., nel 1957* e che designa la proliferazione di una popolazione di cellule epiteliali all'interfaccia tra epatociti e spazio portale costituita da colangiociti, cellule progenitrici epatiche ed epatociti (17, 18). Diversi studi sperimentali hanno definito quattro tipi di proliferazione colangiocitaria (17).

1. Proliferazione di tipo I o tipica: rappresenta una reazione iperplastica che comporta un aumento, confinato nello spazio portale, del numero dei dotti biliari intraepatici. I colangiociti proliferanti formano strutture tubulari ben differenziate che presentano un lume ben definito. Nel ratto una proliferazione "tipica" viene osservata in diverse condizioni sperimentali quali, ad esempio, la legatura delle vie biliari (BDL), l'epatectomia parziale (19) ed il trattamento cronico con L-prolina (20). Nell'uomo, una proliferazione colangiocitaria tipica può essere osservata in corso di una colestasi ostruttiva acuta di grado severo e nelle prime fasi delle patologie colestatiche croniche (21). Questo tipo di proliferazione sembra essere dovuta all'allungamento dei dotti biliari preesistenti localizzati negli spazi portali e ciò è confermato da diverse evidenze sperimentali nel ratto e nell'uomo (14, 22);
2. Proliferazione di tipo II o atipica: è caratterizzata da una proliferazione irregolare dei dotti biliari intraepatici non confinata nello spazio portale ma estesa nella zona periportale e nel parenchima epatico adiacente e capace di costituire occasionalmente cordoni cellulari con gli epatociti. Nel ratto si presenta in seguito a somministrazione di tetracloruro di carbonio (23) nell'uomo è presente dopo epatopatia alcolica, iperplasia nodulare focale e nelle patologie colestatiche croniche quali cirrosi biliare primitiva e colangite sclerosante primitiva. Questo tipo di proliferazione determina la formazione di strutture duttulari irregolari e tortuose che non possiedono un lume ben definito e sono associate ad infiammazione e ad infiltrazione di polimorfonucleati neutrofili (24). Tale tipo di proliferazione può originare dalla proliferazione di

dotti biliari preesistenti oppure dall'attivazione delle cellule progenitrici epatiche ma promuove la formazione di dotti neoformati che non sono funzionalmente efficienti.

3. Proliferazione di tipo III: è una proliferazione massiva che origina dal compartimento delle cellule progenitrici epatiche in seguito a necrosi epatica sub massiva
4. Proliferazione di tipo IV ("oval cell" proliferation): è tipica degli stadi precoci della carcinogenesi nel fegato di ratto ed è causata da numerosi composti chimici. È caratterizzata dalla formazione di strutture tubulari irregolari e disorganizzate con un lume non ben definito che si aggettano all'interno del lobulo epatico con alterazione dell'architettura dell'intero parenchima (25, 26).  
Tale classificazione della proliferazione colangiocitaria è basata soprattutto su studi sperimentali; nella patologia umana la distinzione tra proliferazione "tipica" (con origine da dotti biliari pre-esistenti ed associata ad ostruzione biliare acuta) e "proliferazione atipica" (maggiormente legata all'attivazione delle cellule progenitrici epatiche) è problematica.

#### 2.2.5 Le HSC "Hepatic Stellate Cell"

Le HSC chiamate anche cellule di Ito poiché descritte per la prima volta da Ito nel 1951, sono però meglio conosciute come "cellule stellate epatiche" o cellule immagazzinatrici di grasso (27). Esse sono dei periciti di origine mesenchimale che si trovano nello spazio perisinusoidale del fegato, nel cosiddetto spazio di Disse a stretto contatto con gli epatociti con i quali prendono contatto attraverso le lamine epatocitarie, (28) prolungamenti a livello della superficie interna del sinusoidale, fondamentali nel mantenimento del fenotipo di quiescenza della stellata (29). Le HSC costituiscono circa 1/3 della popolazione cellulare non parenchimale del fegato e rappresentano il 5-8% dell'intera popolazione cellulare epatica (30). Le cellule stellate sono cellule probabilmente di origine mesenchimale a funzione simil pericitaria e ognuna di esse presenta delle lunghe estroflessioni che si estendono dal corpo cellulare e avvolgono i sinusoidi, da qui il loro nome di "cellule stellate". Contengono una citocheratina chiamata desmina (31) caratteristica del muscolo liscio e in comune con altri tipi cellulari, come gli astrociti cerebrali,

contengono i filamenti intermedi neurali (32) e la proteina fibrillare acida gliale (33, 34). Infine come la maggior parte dei periciti immagazzinano gli esteri della vitamina A, contenendo le sole cellule stellate circa il 90% dei retinoidi totali corporei (35) sotto forma di retinolo palmitato di cui è noto il ruolo centrale nel trofismo e nella rigenerazione epatocitaria (36). Nel fegato normale le cellule stellate sono quiescenti, mostrando alla microscopia elettronica scarsità di reticolo endoplasmatico rugoso e un piccolo apparato di Golgi. Esprimono solo moderati livelli di mRNA per le proteine collagene e le glicoproteine della matrice (principalmente laminina, entattina e fibronectina) (37). In presenza di un insulto epatico si hanno dei cambiamenti rapidi e pleiotropici nella loro funzione che interessano aspetti quali la proliferazione, la migrazione e la contrattilità, determinando alterazioni che nel complesso si designano con il termine di attivazione (Fig11).

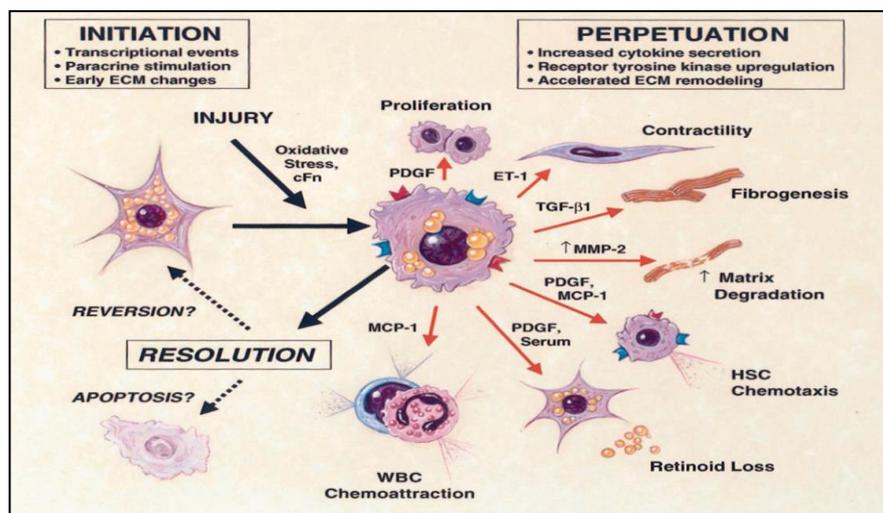


Figura 11 Il processo di attivazione della cellula stellata epatica

La quantità di vitamina A, dopo la loro attivazione, diminuisce progressivamente e inizia la sintesi e la deposizione di matrice extracellulare, responsabile della fibrosi e della cirrosi nel lungo termine, poiché infatti sono queste la principale fonti cellulari nel fegato, di collagene di tipo I, III, IV. Un aspetto saliente dell'attivazione delle cellule stellate è l'espressione *de novo* dell'isoforma muscolare-liscia dell' $\alpha$ -actina ( $\alpha$ -SMA) che è stata utilizzata estesamente come

marker di attivazione (38). Tuttavia il fenotipo  $\alpha$ -SMA-positivo non è esclusivo di questo tipo cellulare a livello epatico, dal momento che è presente nelle cellule muscolari lisce localizzate accanto ai dotti biliari e alle venule, che si comportano come fibroblasti durante il danno (39, 40) Attraverso una fase di passaggio intermedia, la cellula stellata “*transizionale*” assume un fenotipo simile al miofibroblasto e presenta un'aumentata capacità proliferativa, biosintetica (sintesi di collagene fibrillari I e III; laminina, fibronectina e proteoglicani) e secretiva (produzione di chemochine e citochine profibrotiche e proinfiammatorie) (41). Concettualmente, l'attivazione delle cellule stellate consiste:

- di una fase di iniziazione (pre-infiammatoria) in cui si verificano modificazioni precoci nell'espressione genica e fenotipica che rendono la cellula responsiva alla stimolazione con citochine e altri fattori paracrini;
- di una fase di perpetuazione (42) caratterizzata dal mantenimento e dall'amplificazione delle proprietà pro-fibrogeniche delle HSCs attivate, in cui i loop stimolatori autocrini si affiancano a quelli paracrini associati con l'iniziazione delle HSCs stesse.

#### 2.2.6 Le cellule di Ito e il loro ruolo nel processo fibrogenico

Nelle epatopatie acute dell'uomo e nelle fibrosi sperimentali si verifica un aumento del collagene di tipo III, IV, V, VI e XIV e di molte glicoproteine associate e proteoglicani (43, 44). Man mano che il danno diventa cronico, predomina il collagene di tipo fibrillare, organizzato in bande di tessuto connettivo dove è preminente il collagene di tipo I. Di particolare interesse è quello che avviene a livello dello spazio di Disse dal momento che sembra influenzare drasticamente la funzione epatica. Sullo spazio di Disse si affacciano gli epatociti, le cellule endoteliali e le cellule stellate e ciascuno di questi tre tipi cellulari elabora componenti specifiche della matrice extracellulare: gli epatociti producono la glicoproteina laminina (45) e il collagene di tipo XVIII (46); le cellule endoteliali secernono la fibronectina e il collagene di tipo IV; le cellule

stellate producono tutte le componenti della matrice (47) e sembrano svolgere un ruolo centrale nel sostenere i processi che determinano la fibrosi e culminano nella cirrosi (48). La loro capacità di produrre matrice subendoteliale e la loro generale distribuzione nel contesto del lobulo attribuiscono ad esse infatti con ogni probabilità il compito più importante nella risposta al danno. Localizzate nell'interfaccia tra il rivestimento endoteliale e gli epatociti sembrano giocare una parte importante nel reclutare le cellule infiammatorie e indirizzarle verso gli epatociti danneggiati. Le HSC sono il tipo cellulare maggiormente coinvolto nella fibrogenesi epatica e sono ritenute la chiave per capire i meccanismi sia patologici che fisiologici del fegato. Ci sono numerosi fattori in grado di attivare le HSCs con meccanismi spesso sinergici tra loro e tra questi notevole importanza hanno:

- i fattori coinvolti nella degradazione della normale Matrice Extracellulare (ECM) e da TIMP-1 e TGF-1 che, dopo l'eliminazione dello stimolo lesivo degradano il collagene in eccesso (49) (50);
- i fattori solubili prodotti durante il processo infiammatorio (citochine, fattori di crescita e chemochine) (51) quali IL-1, IL-6, IL-10, IL-13, IFN-, SOCS-1 e osteopontina che determinano la risposta fibrogenica al danno stesso (52) (53). I geni che mediano la produzione di ROS "Reactive Oxygen Species", (es. NADPH ossidasi) regolano sia la risposta infiammatoria che la deposizione di matrice extracellulare (54) e tutti i prodotti del processo lipoperossidativo; (55, 56);
- l'etanolo e i suoi metaboliti ossidativi (57)

Oltre a questi anche i fattori di crescita fibrogenici (es. TGF-1, FGF), le sostanze vasoattive (angiotensina II, norepinefrina) e le adipochine (leptina e adiponectina) sono elementi necessari per lo sviluppo della fibrosi (58, 59). Indipendentemente dalla varietà dei fattori che innescano l'attivazione delle HSCs, questi stimoli profibrogenici agiscono inducendo importanti modificazioni trascrizionali già dalle primissime fasi della transdifferenziazione, promuovendo in tal modo l'istaurarsi di un processo infiammatorio patologico chiamato fibrosi epatica.

### 2.3 LA FIBROSI EPATICA

La fibrosi epatica, ovvero la sostituzione del parenchima epatico con matrice extracellulare, rappresenta la caratteristica principale della maggior parte delle patologie croniche epatiche (41). Nei paesi industrializzati le patologie più frequentemente associate allo sviluppo di fibrosi epatica comprendono *l'epatite C cronica*, *l'epatopatia alcolica*, la *steatoepatite non alcolica* (NASH) e *l'epatite B cronica*. L'accumulo di proteine della matrice extracellulare al livello epatico determina una progressiva alterazione dell'architettura del fegato, caratterizzata dalla formazione di setti fibrosi inizialmente e di noduli di rigenerazione successivamente, concludendosi con lo sviluppo della *cirrosi*. La cirrosi è causa a sua volta della disfunzione epatocellulare e determina un incremento di resistenza al livello della circolazione ematica epatica con conseguente sviluppo dell'insufficienza epatica e dell'ipertensione portale, rispettivamente (60). Inizialmente la fibrosi epatica è un processo insidioso e la morbilità e mortalità ad essa correlata si manifestano generalmente in seguito allo sviluppo della cirrosi. Nella maggior parte dei pazienti la progressione verso la cirrosi avviene in un periodo di tempo di 15-20 anni. Le principali complicanze della cirrosi comprendono l'ascite, l'insufficienza renale, l'encefalopatia epatica e il sanguinamento di varici. I pazienti con cirrosi compensata possono non sviluppare complicanze per molti anni, la cirrosi scompensata si associa invece ad una ridotta sopravvivenza e l'unica strategia terapeutica efficace è rappresentata in questo caso dal trapianto di fegato. La cirrosi rappresenta inoltre un fattore di rischio per lo sviluppo del *carcinoma epatocellulare* (61). La cirrosi è frequentemente definita come uno stadio avanzato della fibrosi ed è tipicamente caratterizzata dalla formazione di noduli rigenerativi separati dal parenchima circostante da setti fibrosi, scenario associato a modifiche a carico della struttura vascolare tra cui la capillarizzazione dei sinusoidi dovuta al materiale fibrillare accumulato nello spazio di Disse (41). Negli ultimi anni sono stati fatti progressi sostanziali nella comprensione dei meccanismi che regolano la fibrogenesi. In passato si riteneva che la fibrosi epatica fosse un

processo passivo e irreversibile conseguente alla scomparsa di parenchima epatico e alla sua sostituzione con un tessuto ricco di collagene (62) (63). Attualmente viene considerata espressione dinamica di due processi biologici contrapposti, ossia la sintesi e la rimozione di matrice extracellulare, in risposta ad una noxa patogena cronica. Queste conoscenze ci hanno fornito una spiegazione razionale e plausibile della reversibilità del processo fibrotico. La fibrogenesi epatica è quindi, una risposta al danno cronico indotto dal progressivo accumulo di componenti della matrice extracellulare (ECM), quali il Collagene di tipo I e III (64) nel parenchima epatico, con successiva formazione di setti fibrosi che alterano la normale architettura dell'organo, fino ad arrivare ad un quadro di tipo cirrotico. Si possono individuare quattro differenti pattern di fibrosi, ognuno dei quali caratteristico per un particolare agente eziologico: bridging fibrosis; fibrosi biliare; fibrosi perisinusoidale; fibrosi centro lobulare. Oltre alle cellule stellate epatiche altre linee cellulari possiedono potenzialità fibrogeniche. I miofibroblasti provenienti dai piccoli vasi portalì proliferano attorno alle vie biliari iniziando la deposizione di collagene nella fibrosi epatica causata da patologie colestatiche (65). Inoltre esperimenti di coltura in vitro di cellule staminali emopoietiche CD34+ CD38- con diversi fattori di crescita hanno condotto alla differenziazione di cellule stellate epatiche (HSCs) e di miofibroblasti di derivazione midollare in grado di localizzarsi al livello del tessuto epatico umano determinando un rimodellamento dell'architettura tissutale (66). Questi dati suggeriscono che cellule provenienti dal midollo osseo possono essere in grado di diventare cellule fibrogeniche al livello del fegato danneggiato. L'importanza relativa di ciascuna linea cellulare nella patogenesi della fibrosi epatica dipende dalla tipologia dello stimolo lesivo che la determina. Una complessa interazione tra differenti linee cellulari si verifica durante la fibrogenesi epatica. Gli epatociti sono il bersaglio della maggior parte degli stimoli lesivi, quali i virus epatitici, i metaboliti dell'alcool e gli acidi biliari (67). Gli epatociti danneggiati producono

ROS e mediatori fibrogenici con conseguente richiamo di cellule infiammatorie. L'apoptosi degli epatociti danneggiati stimola la produzione di collagene da parte dei miofibroblasti epatici (68). Le cellule dell'infiammazione, sia i linfociti che i polimorfonucleati, attivano le cellule stellate epatiche con conseguente produzione di collagene (56). Le cellule stellate epatiche attivate secernono chemochine infiammatorie, esprimono molecole di adesione cellulare e modulano l'attivazione dei linfociti (69). Pertanto si instaura un circolo vizioso in cui le cellule stellate epatiche e le cellule infiammatorie si stimolano a vicenda (70). Il processo fibrogenico è inoltre influenzato dai differenti sottotipi di linfociti T helper presenti, essendo la risposta Th2 associata ad una fibrogenesi più attiva (71) e da macrofagi residenti, le cellule di Kupffer le quali svolgono un ruolo importante nella flogosi epatica rilasciando ROS e citochine (72)(73). Infine cambiamenti nella composizione della matrice extracellulare sono in grado di stimolare direttamente la fibrogenesi. Il collagene di tipo IV, il fibrinogeno e l'attivatore del plasminogeno tipo urochinasi stimolano le cellule stellate epatiche mediante l'attivazione di citochine latenti quali il TGF-1 (74). Le fibre di collagene si legano e stimolano le cellule stellate epatiche mediante il recettore DDR2. Inoltre la matrice extracellulare alterata può fungere da reservoir per fattori di crescita e metallo-proteinasi (MMPs) (75). Le citochine che regolano la risposta infiammatoria allo stimolo lesivo modulano la fibrogenesi epatica sia in vivo che in vitro (76). La proteina chemotattica monocitaria di tipo 1 e RANTES stimolano la fibrogenesi, mentre l'IL10 e l'IFN esercitano l'effetto opposto (77). Tra i fattori di crescita, il TGF-sembra essere un mediatore chiave nella fibrogenesi umana. Il TGF-favorisce la trasformazione delle cellule stellate epatiche (HSCs) in cellule simili ai miofibroblasti, stimola la sintesi di proteine della matrice extracellulare e inibisce la loro degradazione (78). Il fattore di crescita derivante dalle piastrine (PDGF) è il più potente mitogeno per le cellule stellate epatiche e la sua produzione è aumentata nel fegato fibrotico (79). Le citochine con proprietà vasoattive regolano la fibrogenesi epatica. Le sostanze

vasodilatatrici (es. ossido nitrico, relaxina) esercitano effetti antifibrotici, invece le sostanze vasocostrittrici (es. norepinefrina, angiotensina II) hanno effetti opposti (80). Tra le citochine vasoattive l'angiotensina II sembra svolgere un ruolo importante nella fibrogenesi epatica. L'angiotensina II è il peptide effettore del sistema renina-angiotensina, che è il principale sistema di controllo della pressione arteriosa nell'uomo. I componenti essenziali di questo sistema sono localmente espressi nel fegato cronicamente danneggiato e le cellule stellate epatiche attivate producono angiotensina II (81). L'angiotensina II causa flogosi epatica e stimola la proliferazione e la migrazione delle cellule stellate epatiche, nonché la produzione di citochine pro-infiammatorie e la sintesi di collagene (Bataller 2003). Le adipochine, citochine prodotte dal tessuto adiposo, regolano la fibrogenesi epatica. La leptina è indispensabile per l'attivazione delle cellule stellate epatiche e lo sviluppo di fibrosi. Al contrario l'adiponectina inibisce la fibrogenesi epatica sia in vivo che in vitro (82).

## **2.4 NAFLE NASH**

La "Non Alcoholic Fatty Liver Disease", NAFLD è un insieme di patologie che comprende la steatosi semplice, la steatoepatite e la sua degenerazione in cirrosi e in alcuni casi può portare allo sviluppo di neoplasie (epatocarcinoma). La NAFLD rappresenta ormai la causa più frequente di epatopatia cronica nella pratica clinica ambulatoriale. La diagnosi si basa sull'utilizzo di tecniche di immagine e/o sull'esame istologico dopo esclusione di cause secondarie di steatosi, ed è rafforzata dalla presenza di fattori di rischio (desunti dal quadro clinico-laboratoristico ed anamnestico). La NAFL è definita da un eccessivo accumulo di trigliceridi nel fegato (>5%), generalmente evidenziato da un quadro di iper-riflettenza all'ecografia, in presenza di un consumo di alcol (accuratamente determinato) < 30/20 g al giorno rispettivamente per M/F. Oltre all'esclusione di altre cause di danno epatico, la diagnosi di NAFL è rafforzata dalla contemporanea presenza di alterazioni tipiche della sindrome metabolica riconducibili ad uno

stato di insulino resistenza: in particolare iperglicemia, dislipidemia pro-aterogena, ipertensione arteriosa e obesità addominale. In base ai dati di studi di popolazione generale, circa 1/4 degli Italiani tra 18 e 65 anni di età sarebbe affetto da NAFL. Complessivamente, la prevalenza stimata della NAFL nella popolazione generale si attesta intorno al 20-40%, ma è maggiore negli obesi e nei diabetici. La NASH rappresenta circa il 20% delle NAFL (prevalenza stimata pari al 2-3% nella popolazione generale) ed è indicata come la causa eziologica di circa l'80% delle cirrosi criptogenetiche. La NAFL non presenta marcatori biochimici specifici né segni clinici peculiari. La diagnosi si avvale generalmente di tecniche di imaging come l'ecografia addominale considerata la metodica di prima scelta poiché ha una sensibilità e specificità elevate per la diagnosi di steatosi di grado almeno moderato (89 e 93% rispettivamente); tuttavia, l'ecografia non è in grado di rilevare la presenza di NASH o la progressione verso la fibrosi epatica, a meno che non siano già presenti segni di cirrosi e di ipertensione portale.

## 2.5 L'EPATOCARCINOMA

L'Epatocarcinoma rappresenta la neoplasia maligna primitiva più frequente del fegato con oltre mezzo milione di nuove diagnosi all'anno, di cui oltre ventimila solo negli Stati Uniti d'America, l'HCC è quinta come causa di morte oncologica nel sesso maschile e settima nel sesso femminile (Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. SEER\*Stat. database: incidence — SEER 9 Regs research data, Nov 2009 Sub (1973-2007). Bethesda, MD: National Cancer Institute, April 2010) (83).

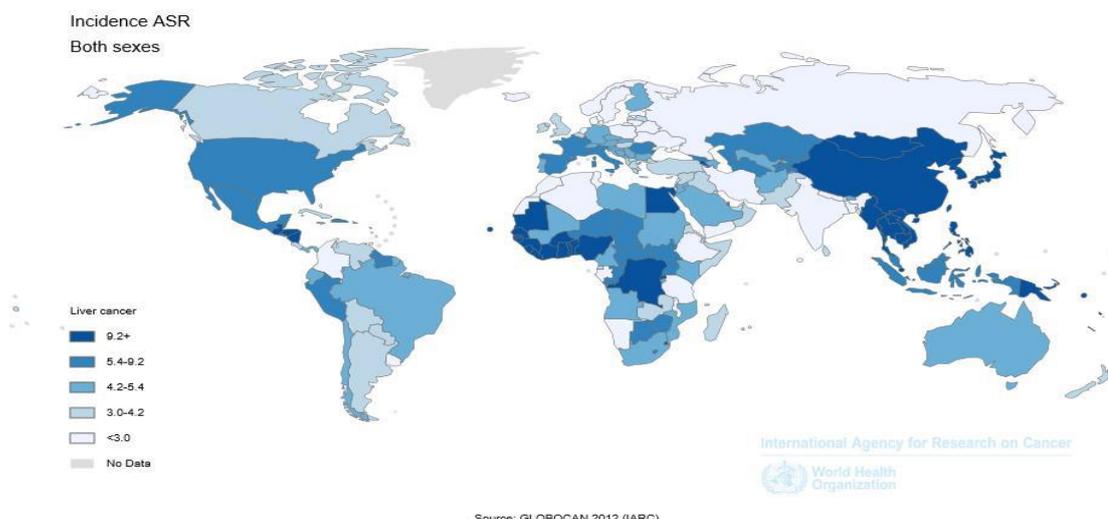


Fig. 12 Incidenza di sviluppo di epatocarcinoma nel mondo.

L'HCC ha un'incidenza che cambia nelle varie parti del globo (Fig. 12), infatti si distinguono Paesi a bassa incidenza (inferiore ai 5 nuovi casi ogni 100000 abitanti all'anno), come Nord Europa, America Settentrionale e Meridionale, Paesi con un'incidenza intermedia (fra i 5 e i 15 nuovi casi ogni 100000 abitanti all'anno), come gli Stati che si affacciano sul bacino del Mediterraneo, in fine Paesi con alta incidenza (oltre i 15 nuovi casi ogni 100000 abitanti all'anno), come il Sud-Est Asiatico. In tali regione l'infezione da HBV è endemica e i soggetti che sviluppano l'HCC sono positivo per i test sierologici HBV circa nel 85% dei casi. L'epatocarcinoma è raro prima dei 40 anni, ma la sua incidenza aumenta con l'invecchiamento fino ad avere un picco intorno ai 70 anni e stabilizzarsi in età successive (83, 84). In Italia l'epatocarcinoma rappresenta il 79% dei tumori maligni primitivi del fegato, è la quinta causa di decesso per neoplasia nei maschi e la tredicesima nelle femmine, con un rapporto M:F di 2:1, e la sopravvivenza è del 15% dopo 5 anni dalla diagnosi. I fattori di rischio identificati per l'epatocarcinoma sono numerosi e tra questi possiamo individuare:

- EPATITE CRONICA DA HBV, è un'infezione dovuta a un virus a DNA appartenente alla famiglia degli Hepadnaviridae, ad oggi se ne conoscono 8 sierotipi (A-H) aventi una distribuzione

geografica differente. Questa infezione è responsabile del 50% dei casi di HCC e fino all'80% nelle aree ad alta incidenza come il Sud-Est asiatico (85);

- EPATITE CRONICA DA HCV, il virus dell'epatite C (HCV) è un virus a RNA appartenente alla famiglia dei Flaviviridae, sono individuati 6 fenotipi maggiori con diversa risposta alle terapie anti virali usate e ben oltre 90 sierotipi differenti. L'infezione acuta diviene cronica fino all'85% dei casi e nel 90% evolve verso la cirrosi epatica tra i 10-30 anni; l'HCV causa infatti, una maggiore insorgenza di HCC nei pazienti cirrotici piuttosto che in quelli affetti solo da fibrosi epatica od epatite.
- AFLOTOSSINA B<sub>1</sub>, è una micotossina prodotta dai funghi *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, che contamina vari generi alimentari, in particolare i depositi di riso, mais e grano, nei paesi tropicali e subtropicali di Asia e Africa, dove rappresenta una causa importante di epatocarcinoma, vi è una correlazione fra l'intossicazione alimentare e l'incidenza di HCC (86) promuove l'inattivazione di p53 tramite una mutazione genetica (87);
- ABUSO CRONICO DI ETANOLO, è definito come il consumo di una quantità superiore a 50 grammi di alcol al giorno. A seguito dell'abuso di alcool etilico si sviluppa cirrosi epatica in soli 5 anni (88);
- NASH/NAFLD, DIABETE ED OBESITÀ, la NASH è una condizione di steatosi, infiammazione e danno epatico in assenza di causa nota. Si sviluppa spesso in soggetti con negatività all'abuso di alcool etilico, ma si associa alla dislipidemia, Diabete Mellito di tipo II e Obesità, a volte anche ipertensione, che sono elementi della Sindrome Metabolica;
- EMOCROMATOSI, è una malattia del metabolismo del ferro, può essere di tipo I o ereditaria che di tipo II o acquisita. Tra le conseguenze dell'emocromatosi troviamo la fibrosi, la cirrosi epatica e l'epatocarcinoma in quanto l'accumolo del ferro induce un incremento della formazione dei radicali ed attiva la spinta proliferativa degli epatociti (89);

- *MORBO DI WILSON*, l'epatocarcinoma insorge solo occasionalmente in pazienti con morbo di Wilson e unicamente alla presenza di cirrosi (90);
- *DEFICIT DELL'ALFA1-ANTITRIPSINA*, è una malattia a trasmissione autosomica recessiva, induce alterazioni del fegato (insufficienza epatica nel lungo periodo di tempo) e del sangue.
- *CIRROSI EPATICA*, condizione frequentemente associata all'insorgenza dell'HCC (circa nel 85-90% dei casi) (91) indipendentemente dalla sua eziologia anche se l'età avanzata e il sesso maschile aumentano il rischio di insorgenza in questa categoria di pazienti (92).

Queste condizioni si sovrappongono in molti dei pazienti che poi andranno a sviluppare l'HCC, in tal modo si può considerare l'eziologia dell'epatocarcinoma multifattoriale, come infatti spesso accade non vi è un unico elemento di eziologico, ma più di uno. L'HCC si presenta di colore bianco-grigiastro o rosso-brunastro e all'interno a volte è verdastro se gli epatociti continuano a produrre bile; è una neoplasia in genere rivestita da una capsula connettivale, a volte incompleta. Dal punto di vista istologico l'Epatocarcinoma si suddivide in tre forme: ben differenziata, poco o moderatamente differenziata ed infine quella indifferenziata (93). L'epatocarcinoma metastatizza nel 40-57% dei casi, con forte interessamento del polmone (50%) e dei linfonodi loco regionali (20%), meno frequente il coinvolgimento dell'apparato scheletrico e surrenale, raramente sono presenti il segno di Virchow-Troisier (linfadenomegalia sopraclavicolare), il linfonodo di Sister Mary Joseph (periombelicale) e linfadenomegalia ascellare. Spesso al momento della diagnosi può essere presente *ascite* o comparire durante la progressione del tumore. Nella maggior parte dei casi l'ascite è l'effetto di una cirrosi di lunga durata e dell'ipertensione portale, ma può anche essere causata dall'invasione del peritoneo da parte del tumore primitivo o delle sue metastasi. Quando il tumore si propaga poi fino alla vena cava inferiore compaiono edemi declivi agli arti inferiori ed improntabili fino all'inguine. Nonostante il dosaggio dell'alfafetoproteina effettuato prima di qualsiasi trattamento, sia in

grado di fornire indicazioni prognostiche nei soggetti con valori elevati, sia utile per la gestione del paziente e in coloro che hanno valori progressivamente crescenti, però non ha un valore decisionale sulla scelta terapeutica. La resezione chirurgica rappresenta il trattamento di scelta nei pazienti senza cirrosi allo stadio BCLC 0 di epatocarcinoma. Nei pazienti con cirrosi, la resezione produce i migliori risultati nei tumori di piccole dimensioni (meno di 3 cm di diametro), senza ipertensione portale e con livelli di bilirubina totali nella norma (94)(95). Mentre in presenza di multinodularità, iperbilirubinemia od ipertensione portale i pazienti devono essere valutati da un team multidisciplinare al fine di applicare approcci meno invasivi e ridurre al minimo il rischio di scompenso epatico post-operatorio. Il rischio di ricorrenza di epatocarcinoma a 5 anni dall'intervento è pari al 70% perché la malattia epatica sottostante evolve e continua ad esporre il paziente al rischio di un nuovo tumore; di rado si può ricorrere a un trapianto epatico di salvataggio (96). Per ciò a seguito del trattamento chirurgico la sorveglianza del paziente con indagini diagnostiche deve essere trimestrali nei primi due anni e poi semestrali, dove i principali predittori di recidiva sono l'invasione microvascolare e la presenza di lesioni satelliti. La prevenzione primaria dell'epatocarcinoma si pone l'obiettivo di ridurre l'esposizione della popolazione generale ai principali fattori di rischio ed agenti eziologici del tumore e agisce prevalentemente attraverso norme comportamentali igienico-sanitarie volte a limitare il contagio dei virus epatitici maggiori e attraverso la vaccinazione anti-HBV. La prevenzione secondaria dell'epatocarcinoma è invece indirizzata ai pazienti che presentano già un'epatopatia che predispone allo sviluppo della neoplasia, con l'obiettivo di rallentare o arrestare l'evoluzione della malattia stessa. Fanno parte di tale strategia le terapie antivirali rivolte ai pazienti con epatite cronicizzata da HBV e da HCV, ma anche i programmi di sorveglianza e follow-up dei pazienti con cirrosi o fibrosi epatica avanzata.

### 3 SCOPO DELLO STUDIO

---

Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare i meccanismi dello sviluppo della malattia epatica analizzandone i vari steps che culminano nella cirrosi e nell'epatocarcinoma. Avendo a disposizione alcuni dati preliminari che individuavano la sirtuina 1 come possibile regolatore della fibrogenesi epatica il mio lavoro ha cercato di approfondire tale argomento. Ho modulato l'attività di questo enzima attraverso l'uso di farmaci inibitori selettivi (EX527) e attivatori (Resveratrolo) per valutare il suo ruolo nella regolazione delle cellule stellate epatiche mediante l'uso di linee cellulari primarie di HSC e su modelli murini di danno indotto da "Bile Duct Ligation" (BDL) e da NASH.

Allo stesso tempo ho cercato di analizzare più da vicino le fasi finali della progressione della steatosi, studiando l'inquinamento ambientale come possibile fattore in grado di portare ad un peggioramento del quadro clinico della NASH a cirrosi e ad HCC. Attraverso analisi effettuate su un modello murino di NASH su cui abbiamo anche eseguito un impianto ortotopico singenico di cellule di epatocarcinoma, abbiamo valutato la tossicità epatica del particolato atmosferico (PM10) e la sua capacità in vivo di favorire la progressione della steatoepatite e creare un ambiente protumorale.

## 4 PROGETTI

In questo periodo di dottorato ho portato avanti due diversi progetti di ricerca focalizzati nell'analisi della risposta epatica al danno sia nelle fasi iniziali, di steatosi e fibrosi, che in quelle finali di cirrosi e di HCC (Fig.13).

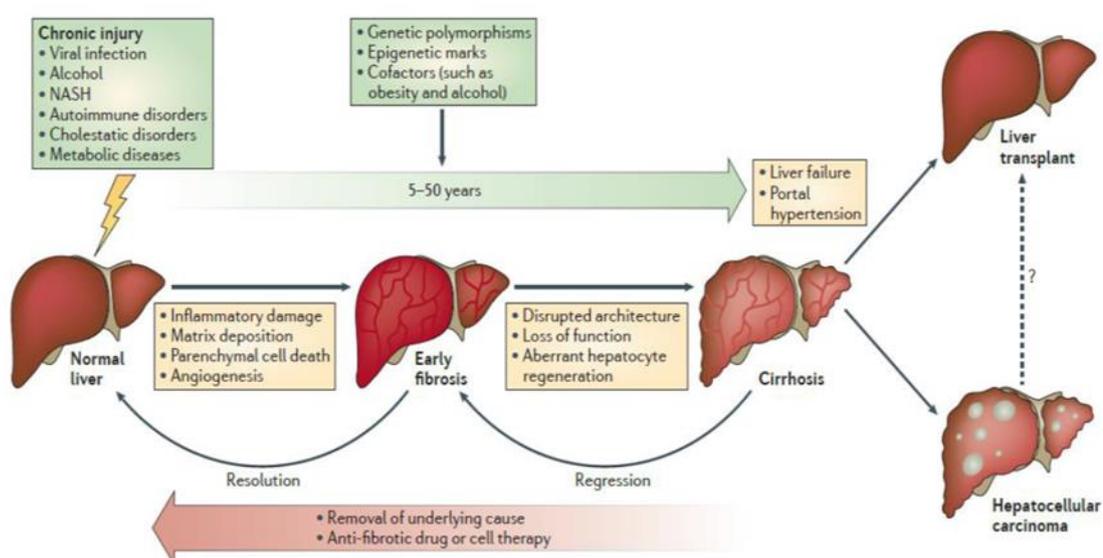


Fig. 13 Dalla fibrosi all'epatocarcinoma.

I risultati preliminari di entrambi i progetti di ricerca, in attesa di pubblicazione, sono stati presentati sotto forma di poster e/o comunicazioni orali a congressi internazionali portando a riconoscimenti e premi. La seguente sezione di risultati sarà quindi divisa in due parti:

- nella prima parte, mostrerò e discuterò i dati ottenuti dall'analisi della modulazione della Sirtuina 1 e come essa sia implicata nel processo fibrogenico epatico;
- nella seconda parte, invece, riporterò i dati ottenuti dall'analisi della tossicità epatocellulare del PM10.

## 4.1 PROGETTO 1°: SIRT1 NELLA FIBROGENESI EPATICA

### 4.1.1 Le Sirtuine

Negli eucarioti sono state identificate tre classi di deacetilasi: classe I, classe II e classe III in accordo alla loro omologia con le deacetilasi istoniche in *Saccaromyces Cerevisiae*: RPD3 (*Reduced Potassium Dependency3*) (HDAC 1-3, 8, 11, classe I); HDA1 (*Hystone Deacetylase*) (HDAC 4-7, 9, 10, classe II); Sir2 (SIRT1-7 Sirtuine di classe III).

- Le HDAC di classe I sono essenzialmente delle proteine nucleari espresse nella maggior parte dei tessuti e delle linee cellulari;
- Le HDAC di classe II sono regolate dalla compartimentalizzazione tra nucleo e citoplasma attraverso fosforilazione reversibile, mostrano una espressione tessuto specifica e sono suddivise in due sottoclassi: IIa (HDAC 4, 5,7, 9) e IIb (HDAC 6, HDAC 10), in base alla loro omologia in sequenza e organizzazione di dominio.

Le Classi I e II mostrano una significativa somiglianza per quanto riguarda il proprio *core catalitico* ed hanno un meccanismo Zn<sup>+</sup> dipendente dalla deacetilazione. Entrambe queste classi sono inibite dalla Tricostatina A (TSA) e da altri inibitori HDAC naturali e sintetici, la maggior parte dei quali sono in grado di distinguere tra HDAC di classe I e quelle di classe II.

- Le HDAC di classe III contengono un dominio catalitico di 275 amminoacidi conservati che non correlato a quello delle altre due classi; inoltre mostrano un meccanismo deacetilasico NAD<sup>+</sup> dipendente e non Zn<sup>+</sup> dipendente ed impiegano una molecola di NAD<sup>+</sup> per ogni gruppo acetile rimosso dal substrato proteico.

Tali deacetilasi non sono inibite dal TSA, ma da altre molecole come: Splitomicina; HR73; sirtinolo; AGK2; cambinoool; salermide; tenovin; suramin. Le Sirtuine fanno parte della famiglia di istoni deacetilasi di III° classe (HDAC III) coinvolte in molti processi biologici (97). La reazione di deacetilazione svolta dalle sirtuine è complessa e porta alla formazione di due prodotti: 2' e

3'-O-acetyl-ADP-ribosio e Nicotinamide. Il NAD<sup>+</sup> è essenziale per la catalisi delle Sirtuine poiché il dinucleotide ossidato è un substrato della reazione (Fig.14).

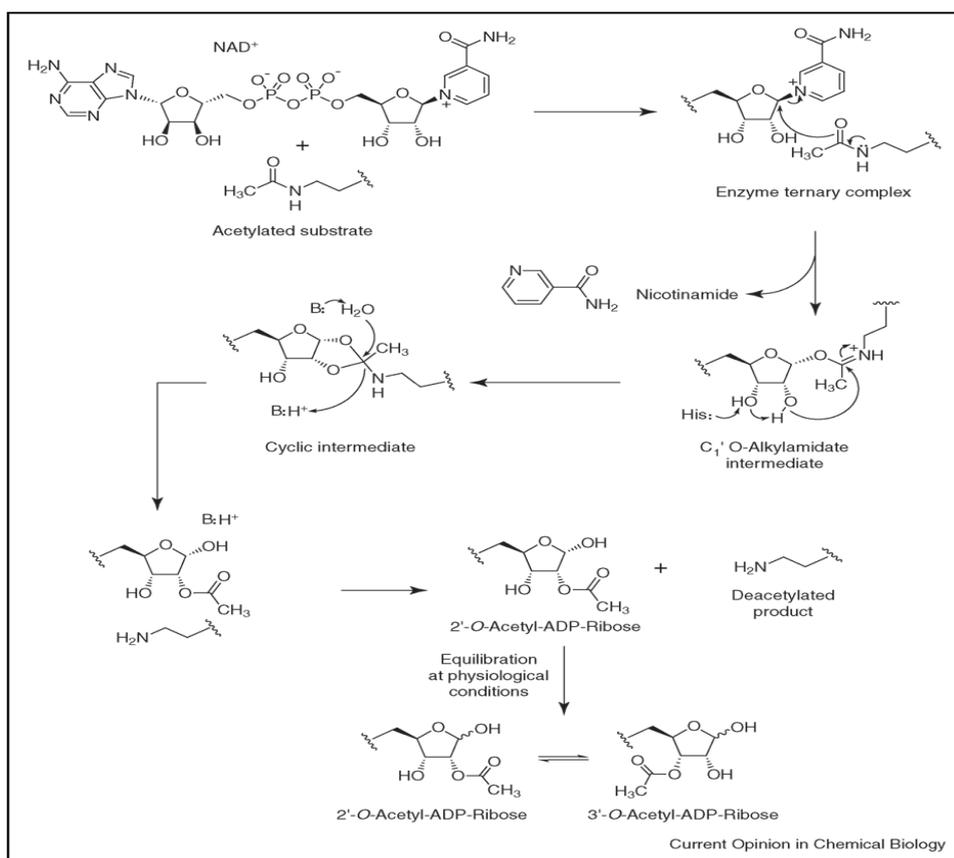


Fig.14 Reazione di de-acetilazione catalizzata dalle HDACIII con formazione di due prodotti 2' e 3'-O-acetyl-ADP-ribose e Nicotinamide.

La Nicotinamide ed il dinucleotide ridotto, NADH, sono inoltre inibitori delle sirtuine, sebbene il significato biologico di tale inibizione sia ancora dibattuto. Il 2' e 3'-O-acetyl-ADP-ribose prodotti, agiscono come secondi messaggeri nell'attivazione del signaling delle Sirtuine. Questi composti, nei lieviti, sembrano contribuire alla formazione e al mantenimento dell'eterocromatina; tuttavia il loro ruolo non è stato ben identificato nei mammiferi (98).

Nel genere umano sono state identificate sette proteine omologhe della Sirtuina (Tabella 1) (99):

<u>Sirtuin</u>	<u>Subcellular localization</u>	<u>High tissue expression</u>	<u>Main substrates</u>	<u>Functions</u>	<u>Enzyme activity</u>
<b><u>SIRT1</u></b>	Nuclear and cytosolic	Brain, skeletal muscle, heart, kidney and uterus	Histones H1, H3 and H4 Transcription factors p53, FOXO family, Ku70, p300, NF-κB, PGC-1, PPAR-γ, UCP2 Acetyl-CoA synthetase 1	Cell survival, lifespan regulation, metabolism regulation, inflammation, oxidative stress response	NAD <sup>+</sup> -dependent deacetylase
<b><u>SIRT2</u></b>	Cytosolic and nuclear	Brain	α-tubulin	Cell cycle regulation, nervous system development	NAD <sup>+</sup> -dependent deacetylase
<b><u>SIRT3</u></b>	Mitochondrial, nuclear and cytosolic	Brain, heart, liver, kidney and brown adipose tissue	Acetyl-CoA synthetase 2 Isocitrate dehydrogenase 2 Ku70, FOXO 3a, MnSOD, Mitochondrial ribosomal protein L10 Long-chain acyl-CoA deshydrogenase 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl CoA synthase 2 Succinate deshydrogenase, NADH:quinone oxidoreductase	Regulation of mitochondrial metabolism	NAD <sup>+</sup> -dependent deacetylase
<b><u>SIRT4</u></b>	Mitochondrial	Pancreatic β-cells, brain, liver, kidney and heart	Glutamate deshydrogenase	Regulation of mitochondrial metabolism,	ADP-ribosyl transferase
<b><u>SIRT5</u></b>	Mitochondrial	Brain, testis, heart muscle and lymphoblast	Cytochrome c Carbamoyl phosphate synthetase 1,	Apoptosis	NAD <sup>+</sup> -dependent deacetylase Desuccinylase Demalonylase
<b><u>SIRT6</u></b>	Nuclear, associated to heterochromatin	Muscle, brain, heart, ovary and bone cells (absent in bone marrow)	Histone H3 TNF-α PAPR1	Genome stability, DNA repair	NAD <sup>+</sup> -dependent deacetylase ADP-ribosyl transferase
<b><u>SIRT7</u></b>	Nucleolar	Peripheral blood cells, CD33 <sup>+</sup> myeloid bone marrow precursor cells	RNA polymerase I	Regulation of rRNA transcription, cell cycle regulation	NAD <sup>+</sup> -dependent deacetylase

Tabella 1 Localizzazione substrati, funzioni e attività enzimatica delle differenti Sirtuine.

- Sirt1, Sirt6 e Sirt7 sono localizzati nel nucleo con differente distribuzione subnucleare, rispettivamente, Sirt6 associato a regioni eterocromatiniche, Sirt7 nei nucleoli;

- Sirt2 è una proteina citoplasmatica che deacetila l'α-tubulina;
- Sirt3, Sirt4 e Sirt5 sono proteine mitocondriali coinvolte nel metabolismo energetico della cellula.

I geni indotti dall'acetilazione da parte delle Sirtuine sono principalmente implicati nell'apoptosi, mentre i geni la cui espressione viene attenuata sono quelli implicati nell'arresto del ciclo cellulare e nella protezione dallo stress ossidativo (100). Recentemente è stato dimostrato come la Progranulina, una glicoproteina di secrezione che media la progressione del ciclo e la motilità cellulare, stimoli la proliferazione dei colangiociti di topo attraverso l'inattivazione di FOXO1, target di Sirt1. In questo modo Sirt1 sembra essere fondamentale regolatore dell'acetilazione di FOXO1, che inattivato si accumula nel citoplasma dei colangiociti di topo trattati con progranulina, dopo legatura dei dotti biliari. Inoltre il requisito fondamentale per l'attivazione delle sirtuine abbiamo detto essere il NAD<sup>+</sup>, col quale si legano in uno specifico sito catalitico, per cui risentono dello stato metabolico della cellula e quindi sono controllate dal rapporto cellulare NAD<sup>+</sup>/NADH; il NADH quindi deve essere visto come un inibitore delle sirtuine (101).

In modelli murini tutte le sirtuine hanno un ruolo di regolazione metabolica, sempre NAD<sup>+</sup> dipendente, strettamente correlata allo stato metabolico della cellula, dove le sirtuine si propongono come un sensore metabolico nel coordinamento della risposta cellulare ad uno stress metabolico, così da controllare l'omeostasi energetica tramite la regolazione su più pathways, quali quello lipidico e quello glicolitico, oltre alla sintesi di corpi chetonici, insulino-secrezione e ciclo dell'urea. Le sirtuine dei mammiferi giocano un ruolo nell'invecchiamento, nel metabolismo, nella carcinogenesi, nei processi infiammatori, nella riparazione del DNA e nella risposta cellulare allo stress (102). In modo particolare SIRT1, SIRT2 e SIRT7 potrebbero avere un potenziale controllo del metabolismo tramite la regolazione di importanti tappe metaboliche, mentre SIRT3, SIRT4 e SIRT6 sono implicate nella riprogrammazione metabolica cellulare.

Le sirtuine appaiono avere un ruolo chiave nei benefici della restrizione calorica sull'incremento della sopravvivenza cellulare, in quanto nella restrizione calorica si attiva NAMPT, che promuove l'aumento della concentrazione di NAD<sup>+</sup> ed in concomitanza un aumento dell'attività delle sirtuine. Una HDAC che gioca un ruolo importante nel mediare la funzione di FoxO è rappresentata da SIRT1, che media il distacco dei gruppi acetile aggiunti alle lisine da CBP/p300; essa è anche una delle Sirtuine maggiormente studiate in quanto ha delle molecole molto importanti tra i suoi substrati tra cui: p53, di cui è un regolatore negativo, in quanto in cellule di mammifero promuove apoptosi p53 mediata (103, 104), p300 (105), NFκB (106) e quindi FOXO.

#### 4.1.2 SIRT 1

Nel 2008, la casa farmaceutica di GlaxoSmithKline spese 720 milioni di dollari, affinché una società sviluppasse farmaci in grado di attivare la SIRT1, meglio conosciuto come il "gene di longevità", in quanto la teoria, supportata da timide evidenze scientifiche dimostrate da alcuni studi preliminari su vermi (*C. elegans*) e moscerini della frutta, (*D. melanogaster*) e mai confermati, lo vede capace di aumentare la durata della vita.

Studi condotti nel 2003 dal gruppo di *McBurney MW, Cheng HL* (107) dimostravano l'importanza di Sirt1 nello sviluppo embrionale di topo e come già detto, fa parte della famiglia delle Sirtuine, una famiglia di 7 enzimi (SIRT1-7) che vengono attivati dalla restrizione calorica e hanno come substrati un gran numero di proteine, coinvolte nei più disparati processi biologici:

- differenziazione e sopravvivenza cellulare;
- resistenza allo stress;
- rimodellamento della cromatina;
- regolazione del metabolismo energetico e cellulare.

I modulatori delle deacetilasi di classe III rappresentano una nuova classe di composti, in grado di chiarire il ruolo biologico di tali enzimi.

Uno delle modificazioni più studiate è sicuramente quella dell'acetilazione proteica, infatti, poiché è il processo intimamente accoppiato a varie funzioni cellulari, quali il riconoscimento del DNA da parte delle proteine, le interazioni tra le stesse e la stabilità proteica.

Per modulare l'espressione di un gene, una cellula deve controllare l'avvolgimento e lo srotolamento del DNA intorno agli istoni. Tale operazione viene eseguita con l'ausilio di acetilasi istoniche (HAT), che controllano lo stato di acetilazione del core istonico usando come substrati i residui  $\epsilon$ -ammino terminali dei residui di lisina delle regioni ammino terminali degli istoni. L'acetilazione neutralizza la carica positiva sugli istoni, destabilizzando le sovrastrutture cromatiniche e favorendo l'accesso dei fattori di trascrizione, dei complessi regolatori e dell'RNA polimerasi alle regioni promotrici del DNA. Viceversa, le azioni dell'istone deacetilasi (HDAC), che rimuovono il gruppo acetile dai residui di lisina, portano alla formazione di cromatina condensata e trascrizionalmente silenziata. Generalmente i geni pronti per la trascrizione sono associati a istoni altamente acetilati mentre la repressione trascrizionale è associata a bassi livelli di acetilazione istonica. Le principali molecole implicate nella regolazione delle sirtuine si possono dividere in due gruppi:

- Gli attivatori delle Sirtuine molecole che, sono state descritte esclusivamente per Sirt1, come il Resveratrolo, attivatore naturale di Sirt1; attualmente sono in studio molte altre proteine con, funzionalità analoga, ma molto più potenti come SRT1720, SRT2104, SRT2379 (108);
- gli "HDACIII inibitori" (HDI), che possono provocare una iperacetilazione degli istoni, interessando così l'espressione genica e stati identificati sia per SIRT1, che per SIRT2, SIRT3 and SIRT5 e sono Splitomicina, Sirtinolo, Cambinolo, AGK2, Suramide, Tenovine, Salermide. Questi inibitori sono stati proposti nel trattamento del cancro, nell'infezioni virali immunodeficienti, nel Sindrome del cromosoma X fragile, etc.

Il Resveratrolo, la prima molecola scoperta da David Sinclair del Massachusetts Institute of Technology come potente attivatore di Sirt1, è una sostanza prodotta da diverse specie vegetali che, grazie alle sue spiccate proprietà antiossidanti, sembra contribuire a proteggere il nostro organismo dalle patologie cardiovascolari e tumorali. La sirtuina 1 sembra inoltre essere implicata nella transizione da un fenotipo epiteliale ad un fenotipo mesenchimale in cellule di epatocarcinoma, facendosi promotore della metastatizzazione tumorale (109). Una volta overespresso Sir2/Sirt1, sembra portare ad un aumento dell'espressione di h-TERT, subunità catalitica della Telomerasi, una polimerasi indispensabile nel mantenimento della estremità telomerica dei cromosomi, importante target di molti oncogeni durante la tumorigenesi. (110) Il Resveratrolo, proprio per le sue capacità attivatorie di SIRT1, è stato proposto, come molecola in grado di prevenire l'obesità, la tumorigenesi, la perdita neuronale e la diminuzione della capacità cardiaca data dall'invecchiamento. Recentemente data la sua ubiquitarietà e i suoi evidenti effetti, il Resveratrolo è stato inoltre utilizzato nell'ambito della ricerca biomedica, nel trattamento della Distrofia Muscolare di Duchenne (111) è stato visto favorire la sensibilità all'insulina, aumentando il numero di mitocondri cellulari e prolungando la sopravvivenza di topi alimentati con una dieta ad alto contenuto calorico (112-114).

Una ulteriore ruolo del Resveratrolo sembra essere quello di combattere l'epatotossicità indotta da Metotrexato nei modelli in vivo, attraverso l'inibizione della perossidazione lipidica, fenomeno per cui i lipidi contenenti acidi grassi insaturi e i loro esteri, vengono direttamente ossidati dall'ossigeno molecolare presente nei radicali liberi, molto abbondanti in caso di sofferenza epatocitaria (115). Gli studi indirizzati all'identificazione delle molecole coinvolte nella regolazione dell'attività di SIRT1 hanno rivelato anche molte molecole inibitrici come:

- La splitomicina (116) che inibisce Sirt1 ad una concentrazione con  $IC_{50}$  pari a 60  $\mu$ M;

- Il Sirtinolo (117) (2-[(2-hydroxy-naphthalen-1-ylmethylene)-amino]-N-(1-phenyl-ethyl)-benzamide) scoperta nel 2001 da *Grozinger et al.*, in studi effettuati in vitro, dove è stata vista inibire Sir2 in lievito e Sirt2 in cellule umane. Uno degli effetti più importanti è la downregolazione, attraverso deacetilazione di p53, giocando così un ruolo importante nel promuovere la crescita cellulare e nel ridurre di conseguenza la apoptosi.
- AGK2 è stato visto implicato nel conferire neuroprotezione, nel trattamento del Parkinson con presenza di corpi di Lewis, i quali contengono l' $\alpha$ -sinucleina, in modelli in vivo di ratto e in *Drosophila*.
- Il Cambinol è in grado di inibire sia Sirt1 che Sirt2 in vitro con valori di  $IC_{50}$  rispettivamente di 56 e 59  $\mu M$ .
- Il Suramin, (118) diversamente al Cambinol, è un potente inibitore dell'attività deacetilasi NAD<sup>+</sup> dipendente di Sirt5 con un valore di  $IC_{50}$  di 22  $\mu M$ . È un potente inibitore di Sirt1 ( $IC_{50} = 0.297 \mu M$ ) e di SIRT2 ( $IC_{50} = 1.15 \mu M$ ).
- Il SEN0014196, (6-Cloro-2,3,4,9-tetraidro-1H-carbazol-1-carbossammide), anche denominato "ex527" scoperto dalla Siena Biotech, è un inibitore selettivo della Sirtuina 1 (Sirt1) ed è attualmente in sviluppo per il trattamento della malattia di Huntington; esso ha ottenuto lo status di "Farmaco Orfano" sia dalla Food and Drug Administration negli Stati Uniti d'America che dall'Agenzia Europea di Valutazione dei Medicinali (EMA).

In una serie di studi preclinici i ricercatori della Siena Biotech hanno dimostrato le proprietà neuro protettive del EX527 in una serie di modelli in vitro. Hanno inoltre testato questo farmaco in un modello in vivo della malattia di Huntington largamente condiviso, dimostrandolo in grado di modificare il decorso della malattia in termini di aspettativa di vita più lunga, miglioramento della psicomotricità e del quadro istopatologico. Infine il composto ha dimostrato un profilo di

sicurezza e tollerabilità a livello biofarmaceutico e preclinico compatibile con un trattamento cronico. La Sirt1 è una deacetilasi in grado di modulare l'acetilazione dell'huntingtina, proteina mutata e che dà il nome alla malattia ed è tramite l'inibizione di Sirt1 da parte del EX527, che si ipotizza una maggiore *clearance* dell'huntingtina mutata che non incide sui livelli della proteina fisiologica (119).

#### 4.1.3 RISULTATI (1)

I miei studi sono partiti dall'analisi di alcuni dati preliminari ottenuti in precedenza nel laboratorio di ricerca dell'Unità di Gastroenterologia in cui, sommariamente, è stato visto che:

- la proteina Sirt1, viene espressa sia nelle cellule primarie sia in linee cellulari immortalizzate del fegato, quali cellule stellate epatiche umane (hHSCs e Lx2), cellule stellate epatiche murine (mHSC), cellule di epatocarcinoma murino (Hepa1-6) e cellule di epatocarcinoma umano (HepG2, HuH7, Hep3B) e linee di fibroblasti embrionali murini (3T3) (Fig.15).

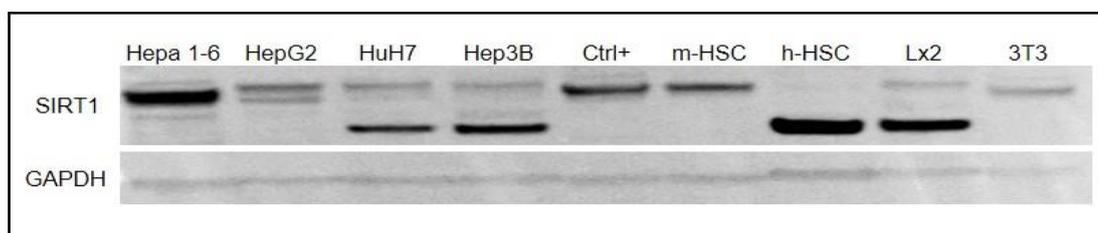


Fig.15 Espressione della Sirtuina 1

- la proteina Sirt1 è espressa sia nel nucleo che nel citoplasma delle cellule stellate ma essa è assente nel mitocondrio di queste cellule. In condizioni fisiologiche l'espressione nucleare è maggiore rispetto a quella citoplasmatica effetto che incrementa con somministrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ovvero simulando tramite un danno cellulare mediato dallo stress ossidativo (Fig.16).

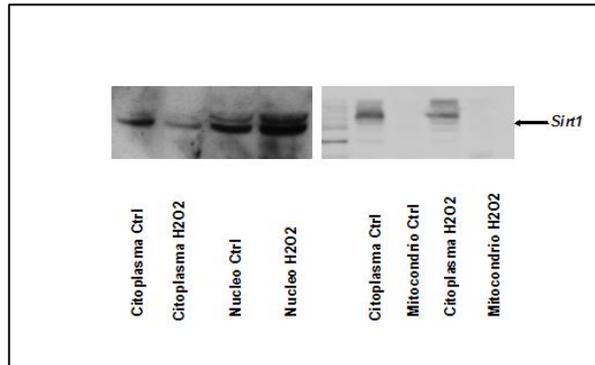


Fig. 16 Localizzazione cellulare dell Sirtuina

- Ho successivamente analizzato il comportamento delle HSCs in seguito a trasfezione con il plasmide contenente Sirt1, sia in assenza che in presenza di stimoli ossidativi quali l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Trascorse 48h dalla trasfezione con Sirt1 e quindi 24h dalla somministrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stata valutata la vitalità cellulare, l'espressione genica e la sintesi proteica. I risultati hanno evidenziato che le cellule che over esprimono Sirt1 presentano una vitalità cellulare leggermente superiore rispetto ai controlli che la esprimono costitutivamente. Inoltre in presenza di stimoli ossidativi come H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> le HSCs che sono state trasfettate con Sirt1 risultano essere in numero maggiore, per cui sono più resistenti allo stimolo tossico (Fig.17A); tuttavia la percentuale di proteine sintetizzate dalle HSCs che iperesprimono Sirt1 risulta essere inferiore rispetto alle cellule che non lo iperesprimono, dato che suggerisce una modulazione dell'attività metabolica e sintetica della cellula (Fig.17B).

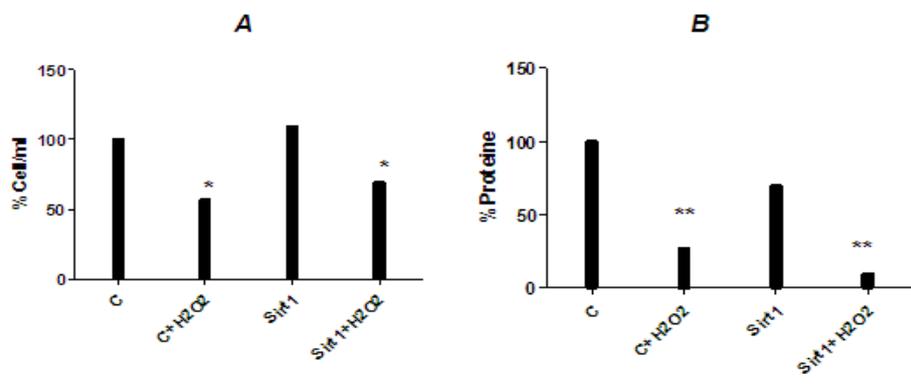
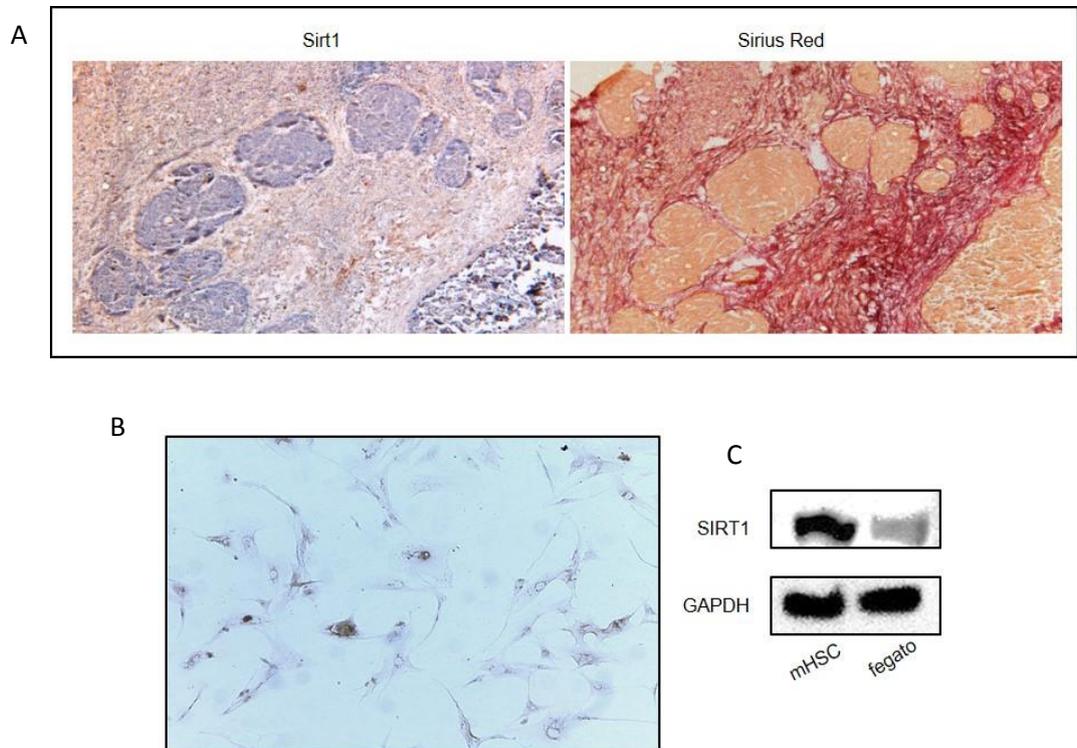


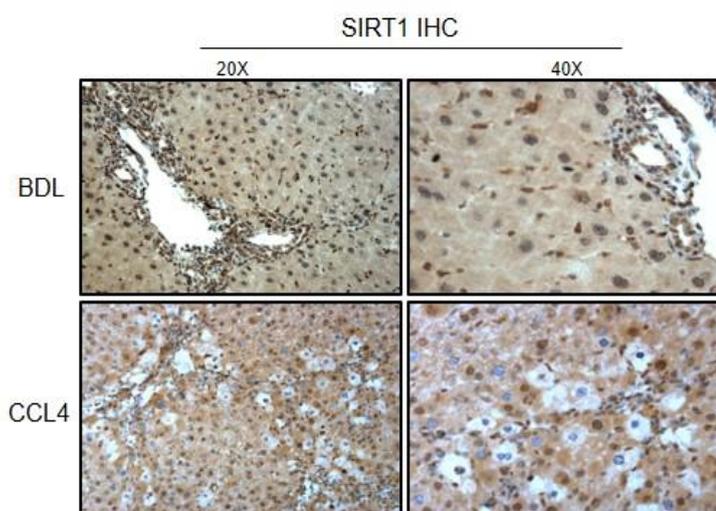
Fig.17 Vitalità cellulare (a) e sintesi proteica (b) in seguito a trattamento delle HSC con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

- Sulla base di questi dati preliminari ho effettuato ulteriori studi sull'espressione della Sirtuina 1 su campioni bioptici di tessuto epatico ottenuti da pazienti cirrotici (*Fig.18A*), visualizzando una netta e consistente co-localizzazione di questa proteina con le fibre di collagene che delineano i lobuli cirrotici che vengono deposte principalmente dalle cellule stellate epatiche. Questo dato mi ha fatto ipotizzare che l'aumento di produzione di questa proteina potesse essere proprio a carico delle HSC attivate dal danno epatotossico che aumentano la propria attività sintetica. Ho riconfermato anche il dato di espressione della Sirtuina 1 da parte delle cellule stellate di topo, visualizzandone attraverso analisi immunocitochimica la localizzazione nucleare e citoplasmatica (*Fig18B*). Infine, ho visualizzato attraverso analisi Western Blot (*Fig18C*), l'espressione della Sirtuina 1 da parte delle HSC e dal fegato totale. Ho così ottenuto un dato molto interessante che sottolinea come le HSCs siano la componente cellulare che più esprime la proteina di interesse.



*Fig. 18 Localizzazione di Sirt1; (A) Sezioni seriali di tessuto cirrotico con analisi immunocitochimica per SIRT1 e colorazione Sirius Red per identificazione delle fibre di Collagene; (B) analisi IHC per Sirt1 su cellule HSC ; (C) analisi Western Blott per Sirt1 su estratti proteici di cellule stellate HSC e di fegato.*

- A questo punto ho voluto valutare l'espressione della Sirtuina 1 durante un insulto epatico indotto da legatura dei dotti biliari e da somministrazione di tetracloruro di carbonio. Come si può vedere nella *Fig. 19* questa proteina sembra essere presente in grandi quantità nel tessuto epatico e soprattutto a livello dei poli biliari proliferanti (BDL) e nelle aree della vena centro lobulare in cui si ha una necrosi massiva epatocitaria indotta dal CCl<sub>4</sub>. Dagli ingrandimenti



*Fig.19 Espressione della Sirtuina1 in modelli di danno epatico*

superiori si rende evidente anche un'espressione della proteina a livello dei sinusoidi, dove ritroviamo anche le HSCs. La fase successiva, visti i primi dati che confermavano un'associazione tra HSC e Sirt1, è stata quella di modulare l'espressione di questa proteina attraverso l'uso di un inibitore selettivo (Ex527) e un attivatore farmacologico (Resveratrolo). Dopo trattamento con i suddetti farmaci, ho effettuato una immunofluorescenza per Sirt1 su vetrini con HSCs sia murine che umane fissate, per valutare come l'attività di questa proteina sia strettamente correlata con la sua localizzazione all'interno della cellula (*Fig.20*). Possiamo quindi evincere che:

- trattando le cellule con il Resveratrolo, la Sirtuina 1 si localizza a livello del nucleo delle cellule, in quanto aumenta la sua attività deacetilasica;
- al contrario, l'inibitore selettivo (ex527) promuove la diffusione del segnale di fluorescenza a livello del citoplasma, ad indicare una diminuzione della sua attività.

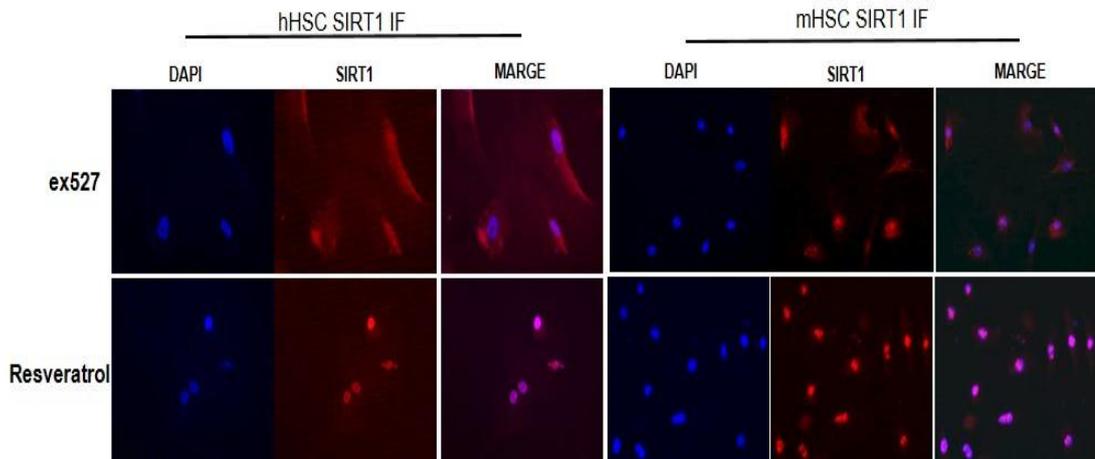


Fig.20 Analisi di IF per SIRT1 su cellule HSC murine e umane

A questo punto della mia ricerca, ho voluto capire se la modulazione data dall'inibitore selettivo della Sirtuina 1, bloccandone l'attività deacetilasica, potesse promuovere la morte o la senescenza delle HSCs.

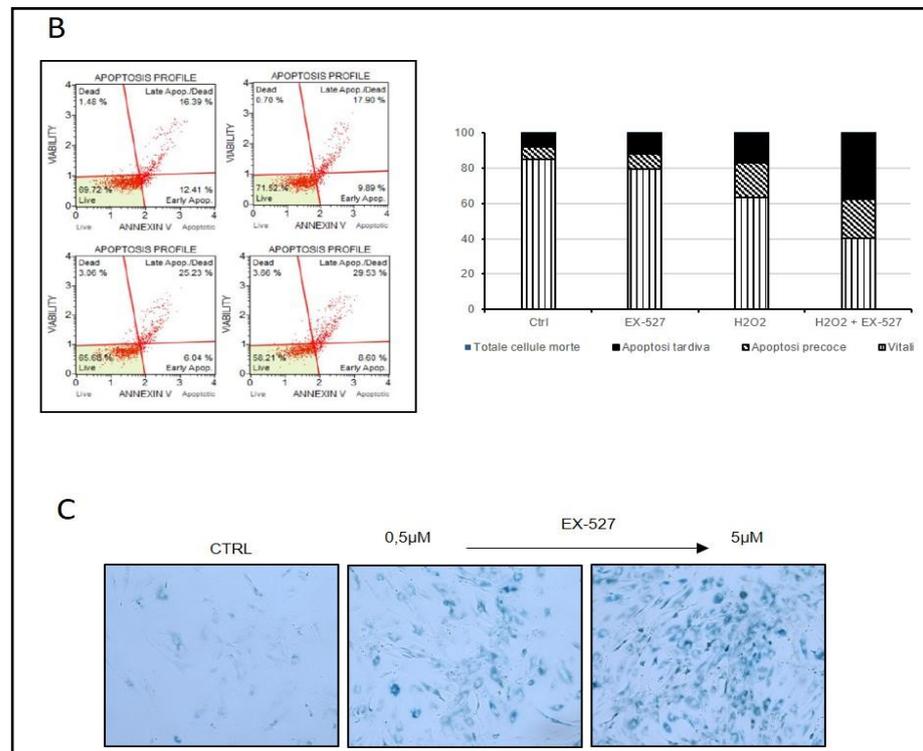


Fig. 21 Valutazione del ruolo della Sirtuina 1 nella mortalità(B) e senescenza cellulare (C)

Ho quindi, effettuato delle analisi citofluorimetriche (*Fig.21B*), per vedere se dopo danno indotto da stress ossidativo e co-somministrazione del farmaco ex527, si modificava l'indice apoptotico. Come si può vedere dai grafici riportati di seguito, si ha un significativo aumento delle cellule in apoptosi sia precoce che tardiva nei campioni trattati rispetto ai controlli. Le cellule senescenti, che incorporano più  $\beta$ -Gal (*Fig.21C*) aumentano esponenzialmente all'aumentare della concentrazione di farmaco inibitore utilizzato.

Visti i promettenti risultati preliminari ottenuti in vitro, ho deciso di testare il dato ottenuto in vitro su due modelli murini di danno epatico:

1. indotto da somministrazione di CCl<sub>4</sub> (tetracloruro di Carbonio). Il CCl<sub>4</sub> è liquido, molto volatile, non miscibile con acqua (altamente polare) e tende a scindersi in due radicali:  $CCl_4 + e^- \Rightarrow CCl_3 + Cl^-$ , pur essendo organico è ignifugo (un tempo usato negli estintori), è tossico, probabilmente cancerogeno nell'uomo, ma senza evidenze certe negli animali. È metabolizzato nel reticolo endoplasmatico liscio dal sistema enzimatico del cyt P450 e viene prodotto un radicale triclorometile (CCl<sub>3</sub>) in grado di provocare lipoperossidazione ed una caratteristica steatosi epatica. Si istaura una steatosi microvescicolare caratterizzata dalla presenza di numerose e piccole vescicole ovvero piccoli vacuoli citoplasmatici, irreversibile e che solitamente progredisce a steatoepatite e a cirrosi.
2. indotto da legatura dei dotti biliari (Bile Duct Ligation, BDL). Nel fegato, l'ostruzione sperimentale del sistema biliare extraepatico innesca una complessa cascata di eventi patologici che porta a colestasi e conseguente forte infiammazione con reazione fibrotica proveniente dai campi periportal. Questo modello sperimentale è ben accettato e utilizzato in tutto il mondo per indurre colestasi epatica e fibrosi. Nello specifico questa chirurgia induce nell'animale una forte proliferazione biliare

intraepatica, differenziazione dei fibroblasti portalì in miofibroblasti con una forte deposizione di ECM (120, 121).

**Modello murino di danno acuto da CCl4.**

Dopo un periodo di acclimatazione di 7 giorni è stato indotto il danno acuto somministrando a livello intraperitoneale un'unica dose di tetracloruro di carbonio (CCl4) al 50% in olio minerale, alla concentrazione di 0.1ml/Kg. 6h prima dell'induzione del danno abbiamo somministrato attraverso gavage l'inibitore di Sirt1, EX527, (6-Cloro-2,3,4,9-tetraidro-1H-carbazol-1-carbossammide) e la somministrazione è continuata ogni 24 h dopo il danno. I topi sono stati sacrificati alle 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h ed è stato estratto l'RNA dei rispettivi campioni di fegato su cui sono stati valutati gli indici di attivazione delle cellule stellate epatiche quali: le

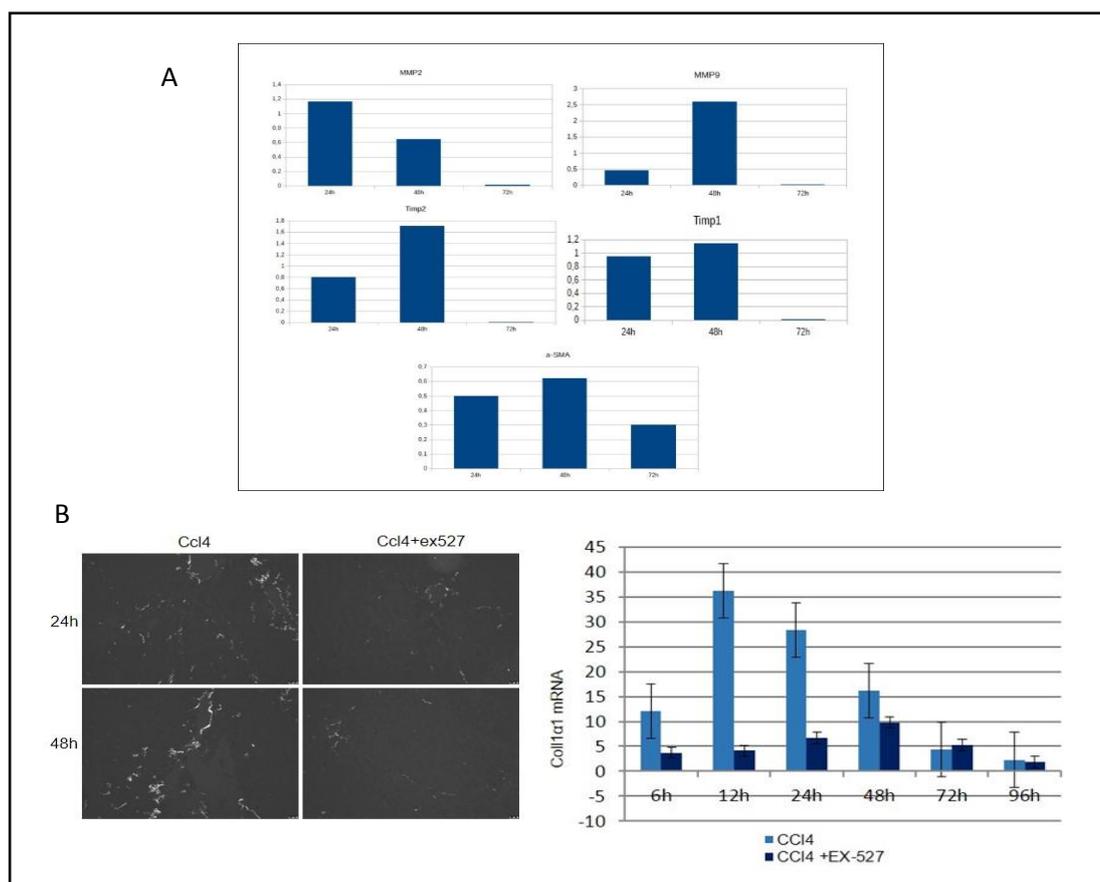


Fig. 22 Analisi su modello murino di danno indotto da somministrazione in acuto di CCl4; Anali Real time di marcatori specifici di danno epatico (Timp1, Timp2, MMP9, MMP2, α-SMA) (A); colorazione istologica con Sirius Red e valutazione della quantità di collagene presente nel tessuto (B)

metalloproteasi (MMP9, MMP2), gli inibitori delle metallo proteasi (TIMP1, TIMP2), l'espressione dei precursori del collagene (Collagene 1 $\alpha$ ), l'espressione del marker di attivazione della cellula stellata ( $\alpha$ SMA). (Figura 22A). Inoltre sono state eseguite istologie per valutare la deposizione di collagene attraverso la colorazione Sirius Red, visualizzata con luce polarizzata (Fig.22B) e analisi della quantità relativa di mRNA di collagene 1 $\alpha$ 1 presente in queste cellule dopo induzione del danno e somministrazione dell'ex527.

**Modello murino di danno cronico da CCl4.**

Il danno indotto dalla somministrazione di CCl4 a livello intraperitoneale in cronico è stato ottenuto effettuando 2 iniezioni alla settimana, per 4 settimane e su base giornaliera gli animali

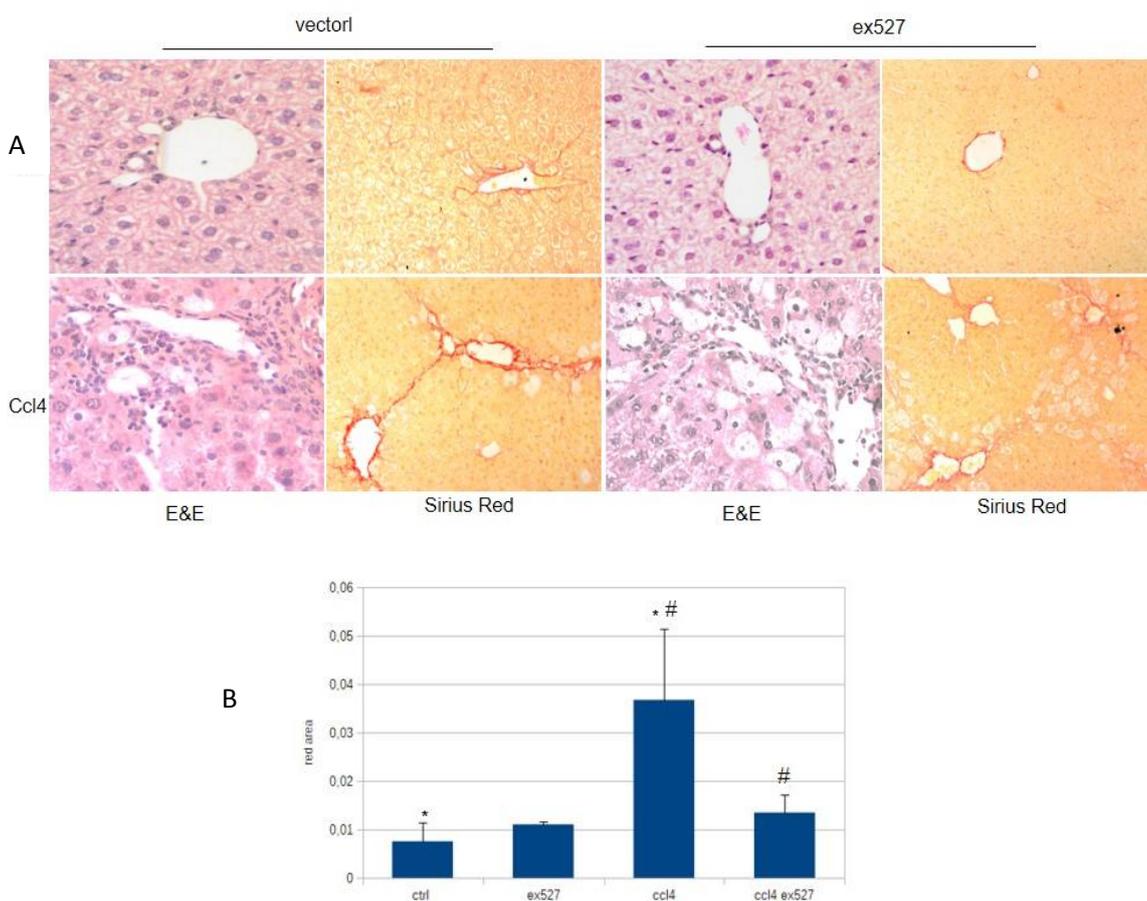
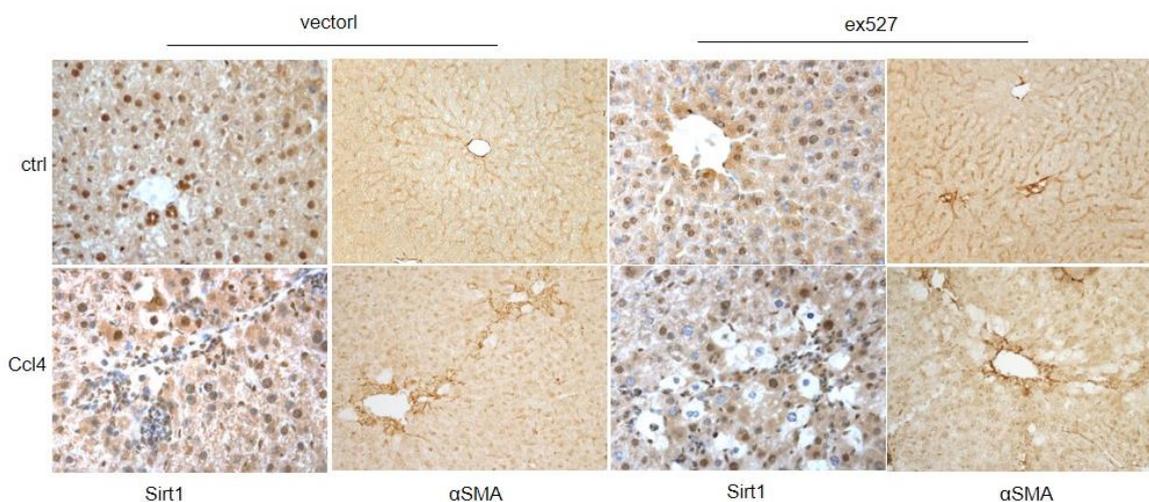


Fig.23 (A) Modello murino di danno indotto da somministrazione in cronico di CC.14. Colorazione ematossilina-eosina e Sirius Red, per la determinazione del grado di fibrosi e la deposizione delle fibre di collagene.(B) Grafico quantitativo delle aree rosse, ovvero sirius red positive rispetto ai controlli

sono stati trattati con 30 mg/Kg del farmaco Ex527, (6-Cloro-2,3,4,9-tetraidro-1H-carbazol-1-carbossammide). Al momento del sacrificio gli organi sono stati raccolti e fissati in formalina per le analisi istologiche per valutare la morfologia e la deposizione di collagene attraverso le colorazioni rispettivamente ematossilina eosina e Sirius Red (*Fig.24A*) e per vedere l'effetto del trattamento farmacologico. Gli animali trattati con l'EX527 sembrano avere una riduzione delle fibre di collagene presenti nel parenchima e una significativa diminuzione dei noduli cirrotici in formazione, come si può vedere dai grafici riportati in seguito, dove sono state quantizzate le aree Sirius Red positive (*Fig.24B*).

Dall'analisi immunohistochimica eseguita sugli stessi tessuti epatici, si può definire l'espressione della Sirtuina 1 a livello delle aree di danno. Le zone positive per l'espressione dell' $\alpha$ -SMA, marker di attivazione delle HSCs, e della Sirtuina1, sono principalmente le aree adiacenti alla



*Fig.25 Analisi immunohistochimica per Sirt1 e  $\alpha$ SMA*

vena centro lobulare epatica, dove, inoltre, si concentra il danno caratterizzato da marcate alterazioni morfologiche cellulari (ballooning), con esito necrotico (*Fig. 25*). Infine ho valutato l'espressione proteica tramite Western Blot delle lisine acetilate presenti nel tessuto epatico ottenuto dagli animali con o senza trattamento farmacologico. I livelli di questa proteina risultano essere aumentati dopo somministrazione del farmaco ex527, ad indicare una

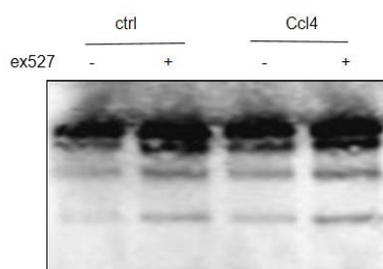


Fig.26 Analisi Western Blott per la acetil-lisina

diminuzione dell'attività deacetilasa della Sirtuina1 (Fig.26), dato che correla direttamente con un miglioramento della necrosi tissutale, una diminuzione delle fibre di collagene depositate e quindi con una possibile reversione del processo patologico innescatosi con il CCL4.

A dimostrazione di un possibile rallentamento di questo processo fibrogenico innescato dal farmaco, ho analizzato il profilo genico dei tessuti epatici analizzati in istologia per valutare l'espressione dei principali marcatori fibrogenici: Timp1, Timp2, MMP2, MMP9, TGF $\beta$  e  $\alpha$ -SMA. I dati riportati in grafico dimostrano una netta diminuzione significativa di questi marcatori, dopo danno indotto da CCL4 trattato con ex527, fatta eccezione della MMP9, che risulta essere contrariamente a quanto aspettato aumentata dopo trattamento farmacologico (Fig.27).

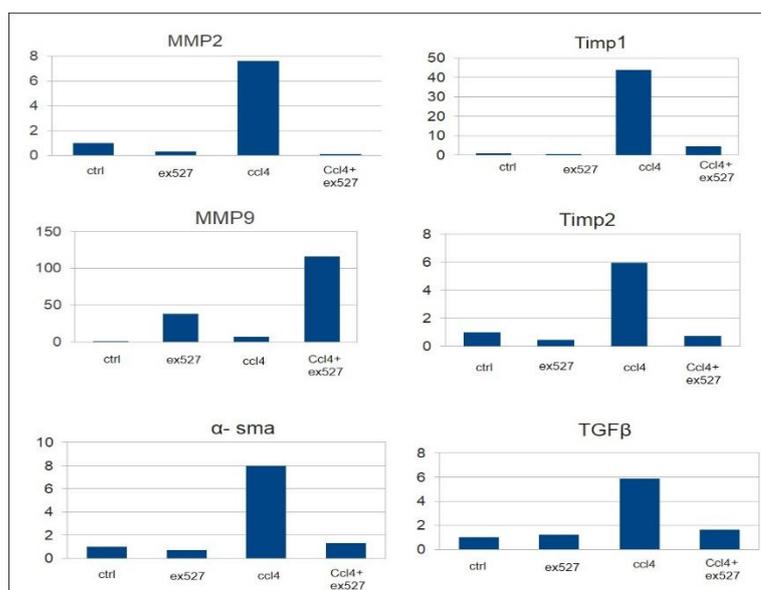


Figura 27 Analisi real time per i principali marcatori di fibrosi epatica

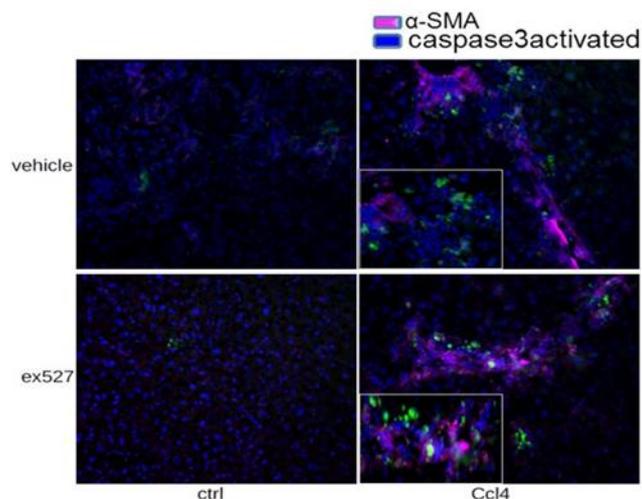


Fig. 28 Analisi immunoistochimica in fluorescenza per la caspasi 3 e l' $\alpha$ SMA.

Infine ho voluto valutare l'induzione della morte cellulare per attivazione della cascata caspasi. Ho effettuato una immunofluorescenza per vedere se le HSCs,  $\alpha$ SMA positive dopo trattamento farmacologico fossero maggiormente predisposte ad andare in apoptosi. Da questa immunofluorescenza si evidenziano le cellule positive sia per l' $\alpha$ SMA che per la caspasi 3 clivata e si vede abbastanza chiaramente come, nelle aree di danno, queste cellule con doppia positività aumentino dopo trattamento farmacologico con l'e527.

### **Modello murino con legatura dei dotti biliari (BDL).**

Le sezioni tissutali di fegato espantato da topi sottoposti a BDL, sono state inizialmente analizzate istologicamente attraverso la colorazione con ematossilina-eosina e Sirius Red. Ho così evidenziato il danno dovuto all'intervento chirurgico che ha portato ad una consistente proliferazione biliare e a formazione di aree cirrotiche disseminate nell'intero parenchima epatico (Fig.28). Le suddette colorazioni hanno evidenziato una flogosi disseminata e una fibrosi avanzata con formazione di setti evidenti. Dalla quantizzazione delle aree rosse Sirius red positive si identifica una netta e significativa diminuzione di quest'ultime dopo trattamento

farmacologico con ex527, ad indicare come per il modello precedente, una diminuzione della formazione di aree cirrotiche, della deposizione di collagene e quindi, del processo fibrogenico.

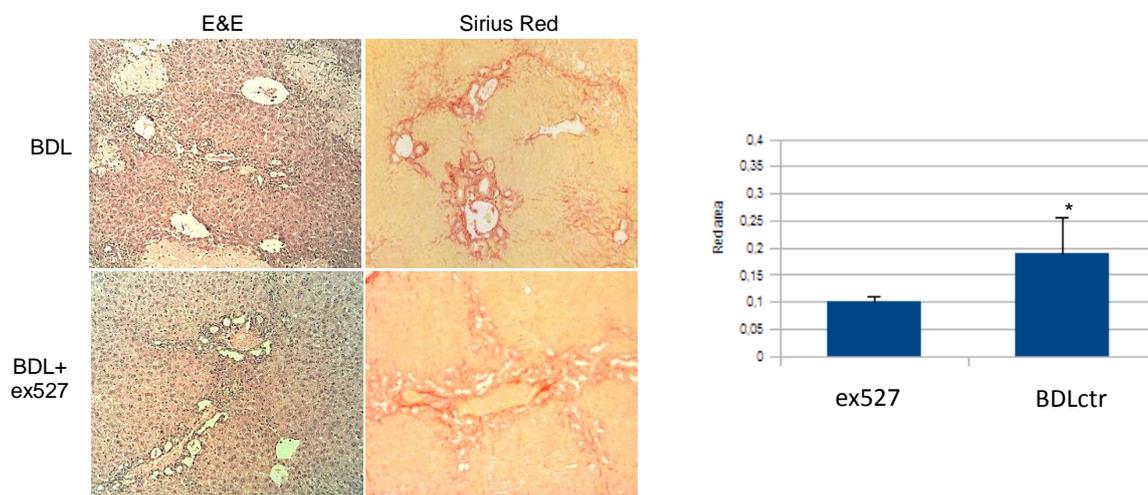


Fig.28 Colorazione ematosilina eosina e sirius red per il modello murino di BDL. A fianco il grafico evidenzia le quantificazioni delle aree rosse Sirius Red positive.

Questo viene, successivamente dimostrato anche attraverso le analisi di immunohistochimica, volte a valutare la localizzazione della Sirtuina1 e dell' $\alpha$ -SMA (Fig.29). Per questo modello murino ho effettuato anche un'analisi immunohistochimica per lo staining della PCNA "Proliferating cell nuclear antigen" (Fig.30), anticorpo utilizzato per visualizzare le cellule in

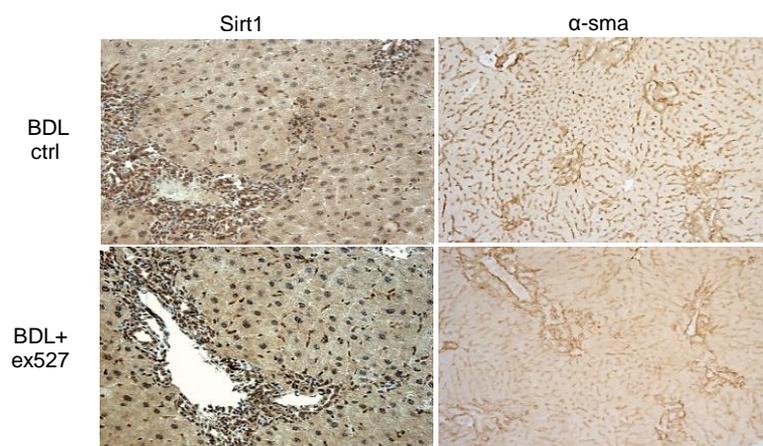
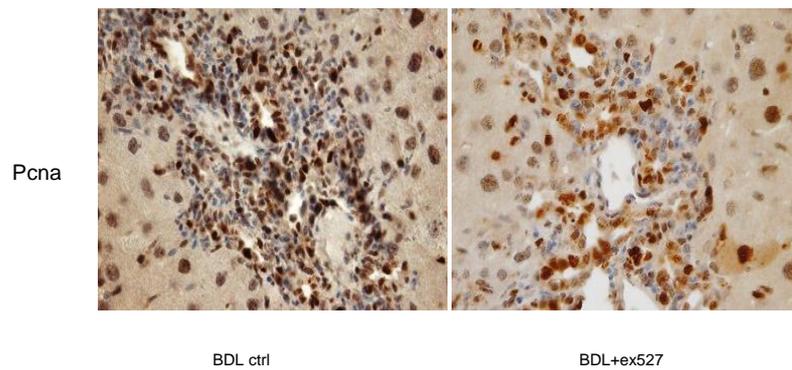


Fig.29 Analisi immunohistochimica per Sirt1 e  $\alpha$ -SMA

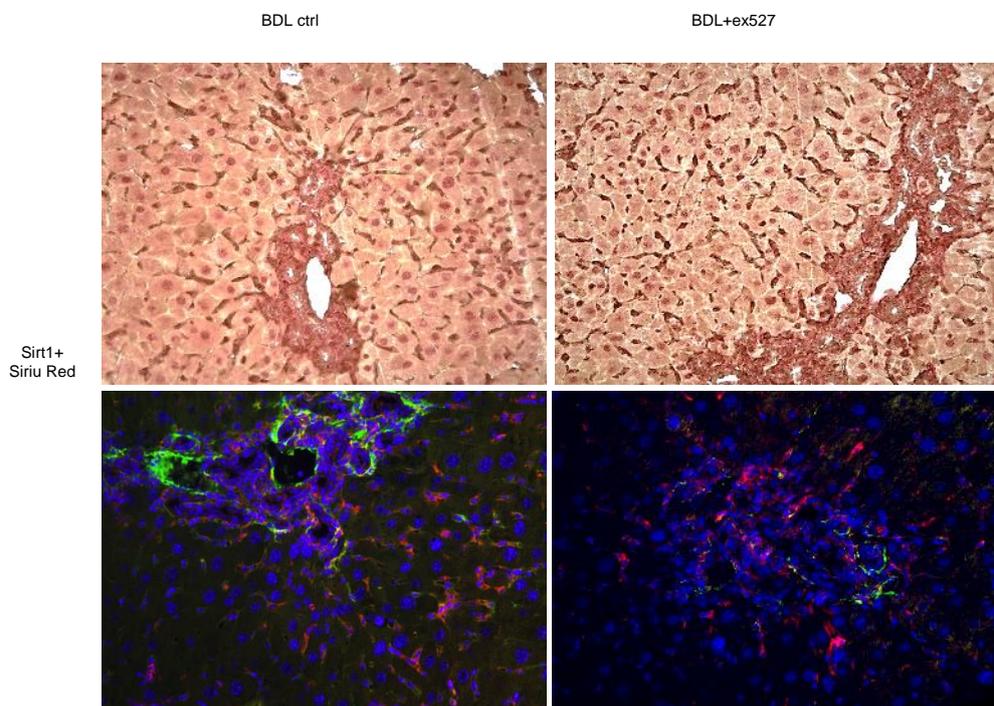
divisione e quindi per vedere l'azione del trattamento con l'ex527 e la spinta proliferativa data



*Fig. 30 Analisi immunohistochemica per la PCNA*

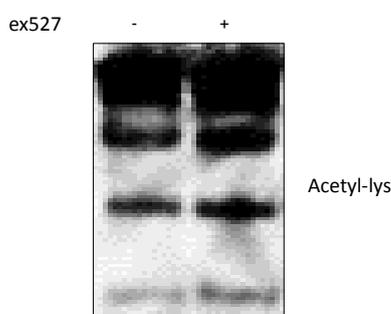
dal danno all'albero biliare. Come si può vedere dalle immagini riportate si ha una diminuzione della proliferazione dei fibroblasti perisinusoidali sia nelle aree di danno, sia disseminate all'interno del parenchima. Per visualizzare più chiaramente la tipologia di cellule esprimenti la sirtuina1 ho effettuato due diverse analisi sulle sezioni istologiche (*Fig.31*):

- una colorazione Sirius red associata ad una immuno localizzazione di sirt1;
- una doppia immunofluorescenza per Sirt1 (rosso) e per l'α-SMA (verde);



*Fig 31 Colorazioni istologiche e analisi immunohistochemiche effettuate in doppio.*

Attraverso queste doppie colorazioni è più facile poter individuare le cellule Sirt1 positive a livello dei sinusoidi e cellule  $\alpha$ SMA positive; dove queste colorazioni si sovrappongono ritroviamo la popolazione cellulare coinvolta nel processo pato-fibrogenico. Dopo trattamento con ex527 queste cellule “doppie positive” diminuiscono per fare posto a cellule  $\alpha$ -SMA positive che non esprimono più Sirt1. Come per i precedenti modelli ho effettuato una analisi western Blot per l’acetil-lisina per vedere se questa è diminuita o meno nel tessuto dei topi trattati rispetto agli animali di controllo (*Fig. 32*). Come mi aspettavo, le lisine acetilate tissutali sono aumentate nei campioni estratti da animali trattati con ex527 a dimostrazione di una



*Figure 32 Western Blot analisi per l'espressione dell'acetil-lisina tissutale nel modello BDL indotto in topo*

diminuzione dell’attività della sirtuina1. È proprio l’insieme dei dati di localizzazione e attività di SIRT1 che mi possono far concludere che l’inibizione farmacologica di questa deacetilasi in modelli sperimentali di danno epatico in vivo, indotto da CCL4 o da legatura dei dotti biliari, diminuisce il numero e l’attività delle cellule stellate epatiche e dei miofibroblasti attivati; ciò comporta una minor deposizione di collagene e una riduzione significativa del processo fibrogenico epatico.

## **4.2 CONCLUSIONI DEL 1° PROGETTO**

SIRT1 é una deacetilasi espressa in maniera ubiquitaria all’interno del nostro organismo ed ha un ruolo centrale nel regolare la funzione trascrizionale di molti fattori nucleari implicati nel controllo degli eventi metabolici, proliferativi ed apoptotici della cellula. In particolare dai

molteplici studi pubblicati risulta giocare un ruolo chiave in quei processi come la differenziazione e sopravvivenza cellulare, la resistenza allo stress, il rimodellamento della cromatina, la regolazione del metabolismo energetico e cellulare. Dati tali presupposti lo scopo del mio studio è stato quello di valutare il ruolo di SIRT1 nel tessuto epatico, ed in particolare come l'inibizione selettiva di tale deacetilasi condizioni il decorso della malattia epatica. Il mio lavoro è volto a valutare l'effetto della modulazione di questa deacetilasi in termini di proliferazione, senescenza e morte cellulare, di risposta al danno con conseguente attivazione dei processi profibrogenici e di una possibile applicazione clinica.

Ho osservato che nelle cellule, SIRT1 si può localizzare sia nel nucleo che nel citoplasma, ma non nel mitocondrio; la traslocazione tra i due compartimenti risulta correlata allo stato di attivazione dell'enzima ed è indotta sia dall'uso di attivatori od inibitori dell'enzima sia sottoponendo la cellula a situazioni di stress: questo mi ha permesso di ipotizzare che l'espressione e l'attività di SIRT1 possano variare in seguito a stimoli esterni come per esempio quando la cellula è sottoposta a stress ossidativo. Ho dimostrato che la Sirtuina1, nel fegato venga espressa principalmente dalla componente stellata che ne aumenta l'espressione durante il danno. In considerazione del fatto che tra le varie cellule epatiche, le cellule stellate durante il danno vanno incontro ad attivazione ed a importanti cambiamenti morfologici-funzionali ho studiato il comportamento delle HSCs, sia in presenza che in assenza di ROS, modulando i livelli di espressione ed attività di SIRT1: i risultati emersi hanno evidenziato che, in presenza o meno di stress ossidativo, in queste cellule SIRT1 è in grado di garantire una maggiore resistenza al danno indotto dall' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La modulazione dell'attività della Sirtuina 1 attraverso somministrazione farmacologica di ex527, inibitore selettivo della nostra deacetilasi, ha messo in evidenza un significativo cambiamento del ciclo e della senescenza cellulare nelle cellule stellate epatiche facendoci ipotizzare un possibile ruolo anti fibrotico di questo farmaco. L'ex527

è attualmente utilizzato nell'uomo e ne conosciamo già la cinetica ed eventuali effetti avversi: ad oggi sembra dare dei buoni risultati nel trattamento della malattia di Huntington. È per questo che un eventuale dato, ottenuto su modello murino, di possibile reversione o rallentamento del processo fibrogenico, potrebbe far sperare in una possibile applicazione clinica di questo farmaco anche su pazienti affetti da patologia epatica. A questo punto, ho deciso di verificare le modificazioni indotte dal trattamento con ex527 in vivo, su modelli murini di danno indotto da BDL e da somministrazione di CCl<sub>4</sub> sia in cronico che in acuto. Nei modelli di fibrosi epatica indotta tramite somministrazione di CCl<sub>4</sub> o BDL è evidente come il trattamento giornaliero con l'inibitore di SIRT1 sia in grado di ridurre il numero delle cellule stellate con una riduzione dei markers di attivazione delle stesse e con conseguente diminuzione della deposizione delle fibre di collagene a livello epatico e modificazione della architettura tissutale. Tutti questi dati sottolineano il ruolo fondamentale di SIRT1 in tutti i processi infiammatori-degenerativi indagati, suggerendo che l'utilizzo di un inibitore selettivo di tale deacetilasi possa avere la capacità di modulare un'eccessiva attivazione e proliferazione delle cellule stellate durante il danno epatico, rallentando il processo fibrogenico e la progressione verso la cirrosi.

### **4.3 PROGETTO 2°: IL RUOLO DELL'INQUINAMENTO AMBIENTALE NELLA PROMOZIONE DELL'HCC**

#### **4.3.1 La Dieta Occidentale**

Il modello alimentare occidentale è significativamente associato al rischio di NAFLD. Essa è caratterizzata da un elevato apporto calorico, ricco di grassi animali e zuccheri raffinati. I principali costituenti alimentari sono rappresentati da carne rossa, uova, salumi, patate fritte, salse, prodotti caseari, bevande gassate, alcolici e prodotti dolciari. Le porzioni di frutta e verdura sono estremamente limitate e i condimenti sono molto abbondanti. Inoltre la cultura del "fast food" e del "take away" contribuisce molto alla promozione di questo modello dietetico

dannoso per la salute, in quanto spesso propone pasti veloci a base di hamburger e bevande gassate. Questi alimenti, tipici della cultura Occidentale, sono ad elevato indice glicemico, determinano un rapido aumento sia dei livelli della glicemia che dell'insulinemia post-prandiale e comportano l'insorgenza di obesità, insulino-resistenza e diabete mellito di tipo 2. Tutto ciò provoca un incremento degli acidi grassi liberi a livello ematico (FFA) e l'attivazione della lipogenesi epatica, ponendo le basi per l'insorgenza della steatosi epatica e della steatoepatite. La dieta occidentale, inoltre è associata ad un incremento del rischio cardiovascolare, del rischio oncologico, influisce negativamente sulla regolazione del sistema immunitario e determina una maggiore produzione di sostanze pro-infiammatorie (IL6, TNFalfa). Inoltre, altro aspetto da non trascurare e che è sempre tipico della vita occidentale è lo stress emotivo dovuto ai ritmi esistenziali sempre più frenetici che rappresentano un aggravante nel "rapporto" costruito col cibo. Come già descritto nell'introduzione, la NAFLD può evolvere in forme più severe come la steatoepatite (NASH), la cirrosi e talvolta andare incontro allo sviluppo di carcinoma epatocellulare (HCC). È ormai largamente definito che una dieta ipercalorica, una predisposizione su base genetica e il microbiota intestinale risultano essere indispensabili nell'innescare un peggioramento del quadro di steatosi semplice a steatoepatite, caratterizzato da un importante processo flogistico diffuso. Studi recenti hanno evidenziato come, oltre a questi fattori, anche la continua esposizione ad inquinamento prodotto da gas di scarico, introducendosi in un quadro infiammatorio importante, possa comportare un aumento di produzione di ROS (Specie reattive dell'Ossigeno) negli epatociti. L'aumento dello stress ossidativo a livello epatocitario è un elemento a sua volta fondamentale nel promuovere delle alterazioni a livello trascrizionale e replicativo comportando l'arresto del ciclo e la morte cellulare. In base a questi presupposti, quindi, una dieta ad alto contenuto di grassi e l'esposizione al PM10 potrebbero aumentare l'attivazione delle cellule stellate, che potrebbero

sostenere il tumore (122, 123) attraverso la produzione di collagene rilascio di citochine e perpetuando il danno a livello parenchimale. L'aumentata attività delle cellule stellate potrebbe inoltre favorire l'EMT (transizione epitelio-mesenchima) delle cellule tumorali e la loro proliferazione, a seguito dell'espressione di fattori infiammatori e pro-proliferativi (124, 125). Lo scopo di questo studio sarà quindi quello di valutare in un contesto di dieta ricca in grassi e zuccheri semplici, tipica dei Paesi industrializzati, come la esposizione cronica alle polveri sottili, presenti nell'aria che costantemente respiriamo, possa influire nella patogenesi della NASH e nel possibile sviluppo di epatocarcinoma (HCC).

#### 4.3.2 Il particolato atmosferico: PM10

L'inquinamento atmosferico consiste in un'alterazione della qualità dell'aria dovuta all'immissione nell'atmosfera di sostanze estranee alla sua normale composizione (Tab.2), il cui effetto può essere dannoso per la salute umana e l'ecosistema. Tali inquinanti derivano sia da fonti naturali (ad esempio l'attività vulcanica) che da sorgenti antropogeniche (attività industriali, traffico automobilistico, inceneritori, riscaldamento domestico, ecc..).

Composizione dell'atmosfera	
Azoto	78,08%
Ossigeno	20,95%
Argon	0,934%
anidride carbonica	0,035%
Neon	$1,818 \times 10^{-3}\%$
Kripton	$1,14 \times 10^{-4}\%$
Elio	$5,24 \times 10^{-4}\%$
Xenon	$8,7 \times 10^{-6}\%$

Tabella 2 Composizione atmosfera (aria secca) in condizioni standard:  $T=0^{\circ}\text{C}$ ,  $P=76\text{0mmHg}$

Per questo motivo le aree urbane, ad elevata densità di popolazione e in cui si concentrano le attività antropiche, sono maggiormente interessate dal problema rispetto alle aree rurali.

I principali inquinanti atmosferici sono rappresentati da:

- Monossido di carbonio (CO): gas inodore e incolore che deriva dalla combustione incompleta del carbonio. Le fonti principali di questo composto sono rappresentate dalle centrali a carbone e dai veicoli a motore. La tossicità del CO dipende dalla sua peculiare caratteristica di legarsi all'emoglobina dei globuli rossi con un'affinità maggiore rispetto all'O<sub>2</sub>.
- Diossido di zolfo (SO<sub>2</sub>): questo gas deriva dalla combustione di composti ricchi di solfuri (petrolio, carosene, carbone, ecc.). Un derivato dell'SO<sub>2</sub> è l'acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sostanza altamente corrosiva e responsabile del fenomeno delle piogge acide;
- Ossido di azoto (NO<sub>x</sub>): la formazione di questi ossidi è dovuta soprattutto al traffico veicolare. In presenza di radiazioni solari, l'NO<sub>2</sub> libera O che, successivamente, reagisce con l'O<sub>2</sub> dando luogo alla formazione dell'ozono (O<sub>3</sub>).
- L'Ozono (O<sub>3</sub>): l'ozono come inquinante origina dalla reazione fotochimica tra NO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, partecipa alla formazione dello smog urbano e possiede proprietà altamente irritanti. A livello della stratosfera l'O<sub>3</sub> rappresenta un importante componente atmosferico, la cui funzione è quella di proteggerci dalle radiazioni cosmiche.
- Piombo (Pb): deriva dai combustibili fossili e tale metallo può essere sia inalato che ingerito.
- Idrocarburi aromatici policiclici: composti derivati dal petrolio, dal carbone, e abbondantemente presenti nella benzina e nei solventi industriali. Tali composti, una volta penetrati nell'organismo, subiscono specifiche reazioni metaboliche catalizzate dal citocromo P450 (enzima microsomiale epatico), dell'eossido idrolasi e dalla prostaglandina H sintetasi.. Il risultato è la formazione di metaboliti in grado di interagire con il DNA, determinando mutazioni a livello di geni oncosoppressori e oncogeni.

- Particolato sospeso (PTS= polveri totali sospese): costituito da particelle sospese. Le sostanze in esso contenute possono essere sia allo stato solido che liquido (droplets). Da un punto di vista chimico rappresenta una miscela di sostanze organiche e inorganiche (carbonio inorganico, composti organici, metalli, nitriti, solfati, frammenti di origine vegetale o animale, ecc.). A livello tossicologico è importante non solo la composizione chimica ma anche e soprattutto il diametro aerodinamico (compreso tra 0,005  $\mu\text{m}$  e 100  $\mu\text{m}$ ). In base alle dimensioni, il PTS viene classificato in diverse categorie: ultrafini, fini, grossolane. Le frazioni di particolato con diametro  $\leq 10 \mu\text{m}$  hanno la capacità di penetrare nelle vie aeree e, per tale motivo, sono molto pericolose per la salute umana (Fig.33).

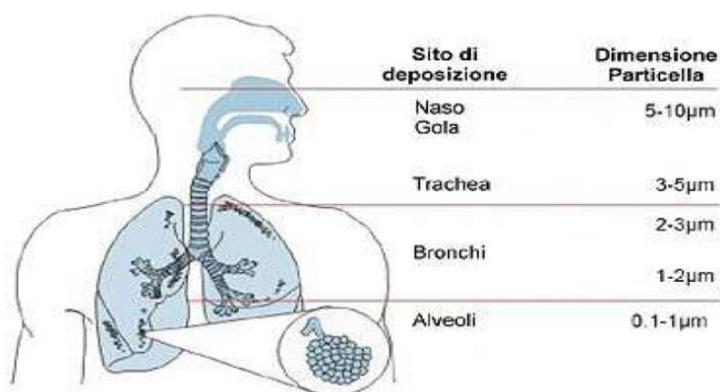


Figura 33 Sito di deposizione nell'organismo umano del particolato, in funzione della dimensione da 0,1 a 10  $\mu\text{m}$

L'inquinamento atmosferico ha delle conseguenze rilevanti sullo stato di salute, sia nel breve che nel lungo termine. Gli effetti acuti, indotti da picchi improvvisi della concentrazione degli inquinanti, sono rappresentati da un incremento della mortalità e delle ospedalizzazioni, soprattutto tra le categorie più vulnerabili della popolazione (anziani, bambini e malati cronici con patologie cardio-polmonari). L'esposizione a tali sostanze può causare irritazione oculare, cefalea, flogosi delle vie aeree e maggiore suscettibilità all'insorgenza di infezioni respiratorie. Nel lungo termine ha una maggiore incidenza di patologie croniche polmonari (BPCO), un incremento del rischio di alcuni tipi di tumori (cancro, polmone, leucemie) e un complessivo

aumento della mortalità per cause cardio-polmonari. Essendo l'inquinamento atmosferico un problema rilevante di sanità pubblica ed essendo la causa principale del surriscaldamento del pianeta, nel corso degli ultimi anni le Organizzazioni Internazionali hanno stipulato una serie di convenzioni nel tentativo di riuscire a contenere l'effetto serra e l'immissione di sostanze inquinanti nell'atmosfera (Protocollo di Kyoto, Convenzione delle Nazioni Unite sui cambiamenti climatici- UNFCCC).

#### 4.3.3 Il PM10 (Particulate Matter $\leq 10\mu\text{m}$ )

Il PM10 rappresenta una tipologia di PTS in cui le dimensioni delle particelle sono  $\leq 10\ \mu\text{m}$ . La composizione chimica del PM10 e in generale del PTS, è estremamente variabile ed è influenzata

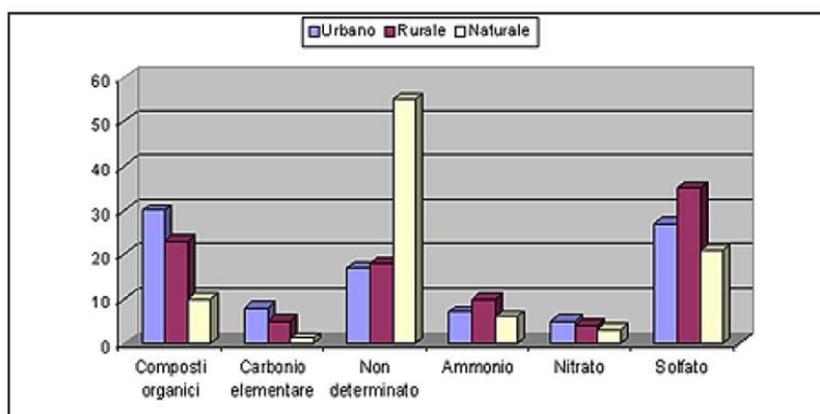


Figura 34 Composizione del Materiale Particolato (fonte: ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare-2016)

da diversi fattori: condizioni climatiche, area di provenienza (urbana o extraurbana) e tipologia delle sorgenti di emissione dominanti (Fig.34). Il particolato ha importanti conseguenze sulla salute, soprattutto nelle aree urbane. Il principale meccanismo fisiopatologico innescato dall'esposizione al PM10 è lo stress ossidativo, dovuto alla produzione di specie reattive dell'O<sub>2</sub> (ROS). La cellula, inizialmente, prova ad adattarsi a questo insulto mettendo in atto strategie di difesa antiossidanti. L'attivazione di diversi fattori di trascrizione (ad esempio il fattore nucleare eritroide 2, Nrf2) porta all'espressione di enzimi scavengers quali la catalasi, la superossido

dismutasi, il glutathione-S-transferasi ecc. Se l'esposizione perdura nel tempo e la produzione di ROS continua ad aumentare, tali meccanismi di difesa non saranno più sufficienti a proteggere la cellula. Pertanto lo stress ossidativo produrrà un danno a livello cellulare. Tutto ciò comporta l'innescamento della risposta infiammatoria attraverso l'attivazione della via della MAP-chinasi e del fattore di trascrizione nucleare NF- $\kappa$ B; in questo modo si avrà la produzione di citochine, chemochine e molecole di adesione. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che l'entità della produzione di ROS, dopo esposizione al PM<sub>10</sub>, è correlata all'incremento delle concentrazioni di composti organici del carbonio (chinoni, idrocarburi policiclici aromatici). Tali composti sono coinvolti anche nel processo di carcinogenesi poiché, a causa delle reazioni metaboliche catalizzate dal citocromo P450, danno luogo alla formazione di metaboliti reattivi che danneggiano direttamente il DNA. Tutto ciò determina un'alterazione dell'espressione di oncogeni e oncosoppressori, promuovendo l'insorgenza di neoplasie maligne. Il particolato atmosferico (PM) potrebbe, quindi, aggravare il quadro flogistico instauratosi durante la progressione della steatosi a NASH, andando a promuovere la formazione di un microambiente favorevole alla trasformazione ed all'espansione neoplastica. Recentemente l'inquinamento ambientale delle aree urbane (PM) è stato classificato come principale fattore di rischio per lo sviluppo di tumore al polmone nell'uomo (IARC, 2016). In ambito epatologico il ruolo del particolato atmosferico nella predisposizione al cancro è ancora molto discusso, e in letteratura troviamo solo pochi dati epidemiologici che lo correlano all'epatocarcinoma (126). Dalla letteratura è noto come l'esposizione al PM<sub>10</sub> si associ ad un aumento dei livelli sierici di molti enzimi tra cui la  $\gamma$ -glutamilttransferasi (GGT) e l'alanina aminotransferasi (ALT), considerati markers di danno epatico, solitamente incrementati durante l'infiammazione (127, 128). In uno studio di meta-analisi (129) è stato visto che il fumo di sigaretta incrementa da 1.1 a 1.5 volte il rischio relativo di sviluppare tumore al fegato (HCC) in fumatori occasionali o assidui

rispettivamente rispetto a non fumatori. In uno studio di coorte dell' European Prospective Investigation into Cancer and nutrition (EPIC), i dati collezionati dal 1999 al 2011 indicano come il fumo contribuisca a circa il 50% di tutti HCC in analisi (130). Il fumo di sigaretta ed il particolato atmosferico dato dall'inquinamento urbano sono costituiti entrambi da una complessa miscela di molecole cancerogene, come ad esempio idrocarburi policiclici aromatici (PAHs), idrocarburi eterociclici, componenti volatili organiche, nickel e altri metalli leggeri (IARC, 2004, 2015).

#### 4.3.4 RISULTATI (2)

Per poter analizzare l'effetto dell'inquinamento ambientale sulla patologia fibrotica infiammatoria epatica, ho attivato una collaborazione con l'ARPAT (Agenzia Regionale per la protezione ambientale della Toscana) che mi ha fornito i filtri di particolato atmosferico ottenuti da stazioni di monitoraggio situate nella zona sub-urbana di Firenze ma ad alto traffico commerciale. I filtri che ho analizzato sono costituiti da PM10 ovvero particolato atmosferico il cui diametro aerodinamico (ovvero corrispondente al diametro di un'ipotetica sferetta di densità uguale a 1 g/cm<sup>3</sup> ugualmente veicolata dall'aria) è uguale o inferiore a 10 µm, ovvero 10 millesimi di millimetro. Dall'analisi di questi filtri abbiamo ottenuto stimolanti dati preliminari.

Compound	Air concentration, ng/m-3
Naphthalene	3.5
Acenaphthylene	0.4
Acenaphthene	0.2
Fluorene	2.3
Phenanthrene	2.8
Anthracene	1.7
Fluoranthene	0.1
Pyrene	1.2
Benz[a]anthracene	0.8
Chrysene	1.1
Benzo[b]fluoranthene	2.3
Benzo[k]fluoranthene	1.6
Benzo[a]pyrene	2.4
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	4.4
Dibenz[a,h]anthracene	3.8
Benzo[ghi]perylene	6.4

Tabella 3 Composizione aria filtrata nell'area urbana di Firenze (ARPAT)

- Mi sono fatta inviare dall'ARPAT le specifiche del particolato che abbiamo utilizzato, che è stato ottenuto dalla Torre di controllo dell'inquinamento ambientale della zona di Firenze, visualizzando l'elevata quantità di idrocarburi presenti (Tab.3);

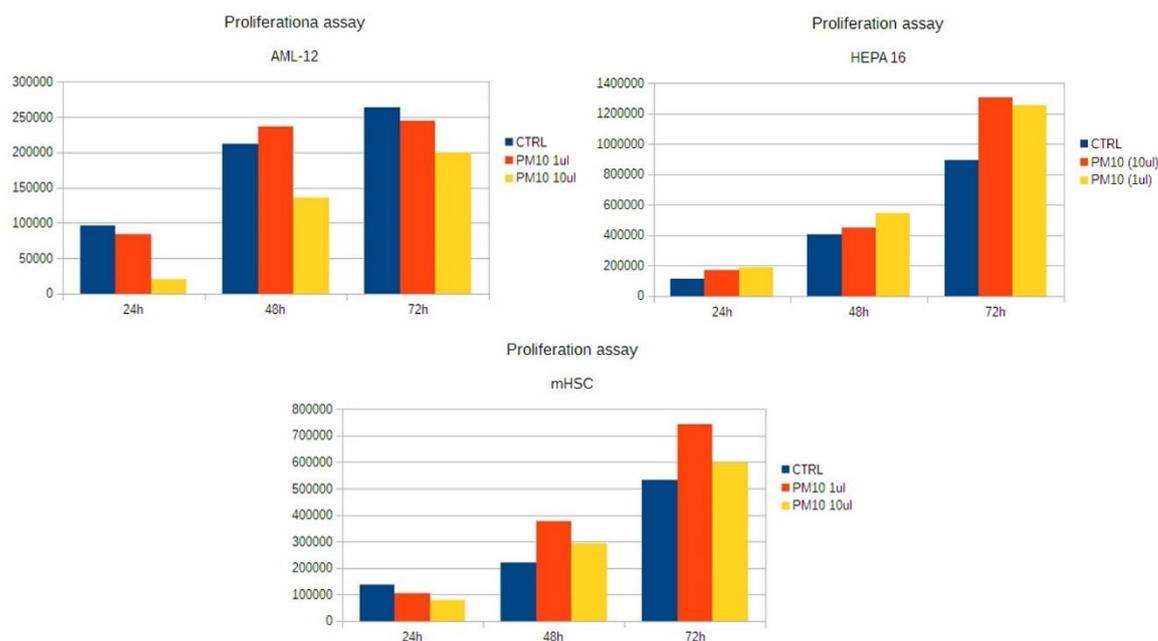


Figura 35 Proliferazione cellulare dopo somministrazione di particolato atmosferico a concentrazioni crescenti su modelli cellulari di epatociti (AML12), cellule stellate murine (mHSC) e cellule di epatoma murino (HEPA 16).

- Ho effettuato delle conte di proliferazione su cellule presenti in laboratorio: cellule stellate murine (mHSC), cellule di epatoma murino (Hepa16) ed epatociti (AML12). Le cellule sono state fatte crescere per 24h e, in seguito sono state trattate con 1-10 ul/ml di PM10 in sospensione; a 24h, 48h e 72h ho effettuato delle conte semplici in triplicato mediante camera di Burke (Fig.35). Il dato ottenuto indica che su cellule tumorali (Hepa 16) e su cellule stellate epatiche murine (mHSC), il PM induce un netto aumento della proliferazione cellulare rispetto alle cellule di controllo trattate con semplice soluzione fisiologica suggerendo un possibile ruolo oncogeno e fibrogenico del PM10. Si nota, invece un comportamento opposto degli epatociti (AML-12), la cui crescita è diminuita del 50% dopo somministrazione del PM10.
- Ho effettuato un esperimento su una piccola coorte di animali in HFD ("High Fat Diet") e in dieta normale, sottoponendoli quotidianamente per 2 settimane a iniezioni intraperitoneali di PM,

sonicato e disciolto in soluzione fisiologica. Ho soppresso gli animali e proceduto con l'espanto degli organi di interesse, che sono stati processati per le successive analisi istologiche (colorazioni ematossilina-eosina e Sirius red) (Fig.36). Dall'istologia si evince come la sola dieta

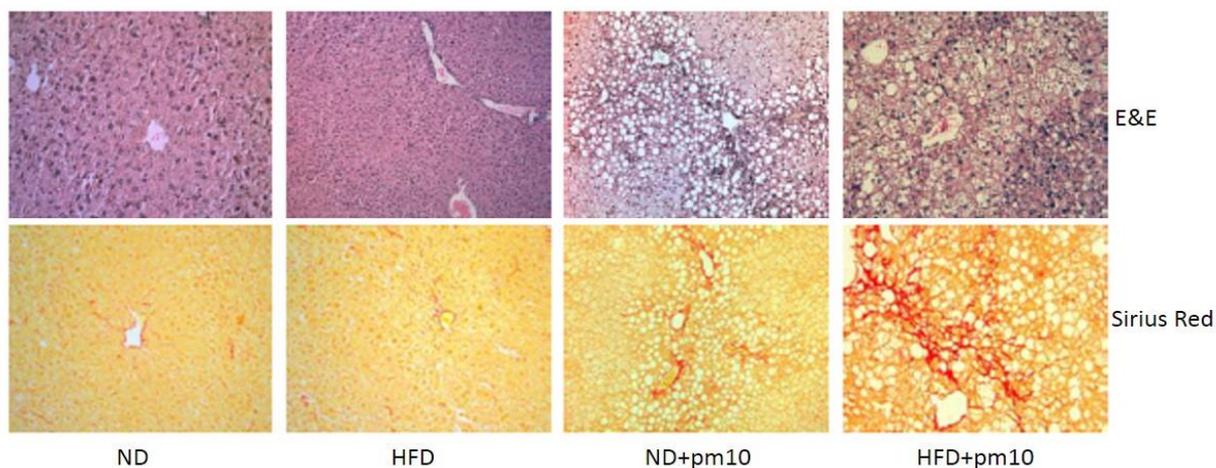


Fig. 36 Colorazioni ematossilina eosina e sirius red su modello C57/BL6 sottoposto a dieta grassa e con iniezioni giornaliere di PM10

riesca ad indurre un buon grado di steatosi epatica, aggravata in parte dopo somministrazione del particolato atmosferico, poiché si ha un aumento del numero di foci infiammatori disseminati nel parenchima.

In seguito, ho visualizzato, attraverso microscopia in campo scuro il particolato atmosferico nel tessuto epatico di questi animali trattati con Pm e i rispettivi controlli (Fig.37A); ho così potuto

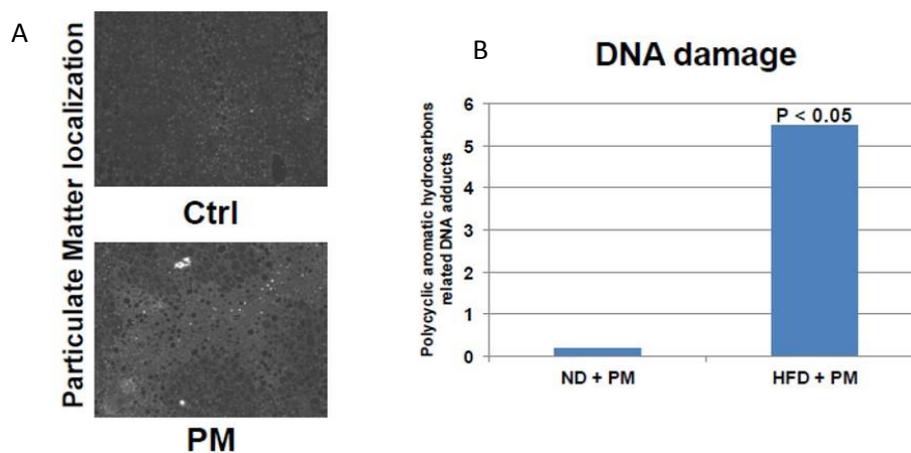
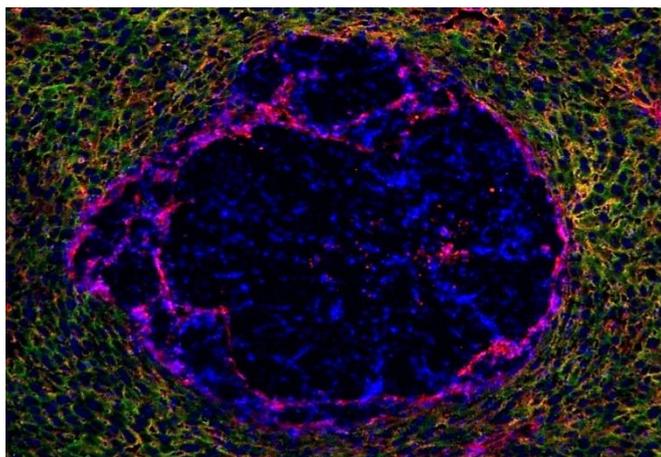


Fig. 37 Localizzazione del particolato atmosferico nel parenchima epatico visualizzata con microscopia su campo scuro (A); Valutazione degli addotti al DNA formati in seguito a somministrazione di particolato atmosferico (B)

vedere chiaramente come questo si vada a localizzare a livello dei sinusoidi epatici solitamente popolati da Kupffer e cellule stellate. Su questi campioni ho, in seguito, valutato anche la presenza di addotti al DNA, (Fig.37B) dimostrando come in animali trattati con dieta grassa e particolato atmosferico, questi significativamente aumentati rispetto agli animali di controllo ( $p < 0.05$ ). Questi dati preliminari ci sono serviti per poter ipotizzare una interazione del PM con la progressione della steatoepatite e un possibile suo coinvolgimento nello sviluppo del carcinoma. L'accumularsi dello stress ossidativo indotto dalla dieta grassa, promuove l'aumento di disordini metabolici che in associazione alle mutazioni e ai danni genici indotti dal PM10 possono innescare la carcinogenesi. Alla luce di questo ho messo a punto un modello di impianto ortotopico su topi C57/Bl6 transgenici ROSA26TOMATORED/EGFPxTg (Alb-Cre).

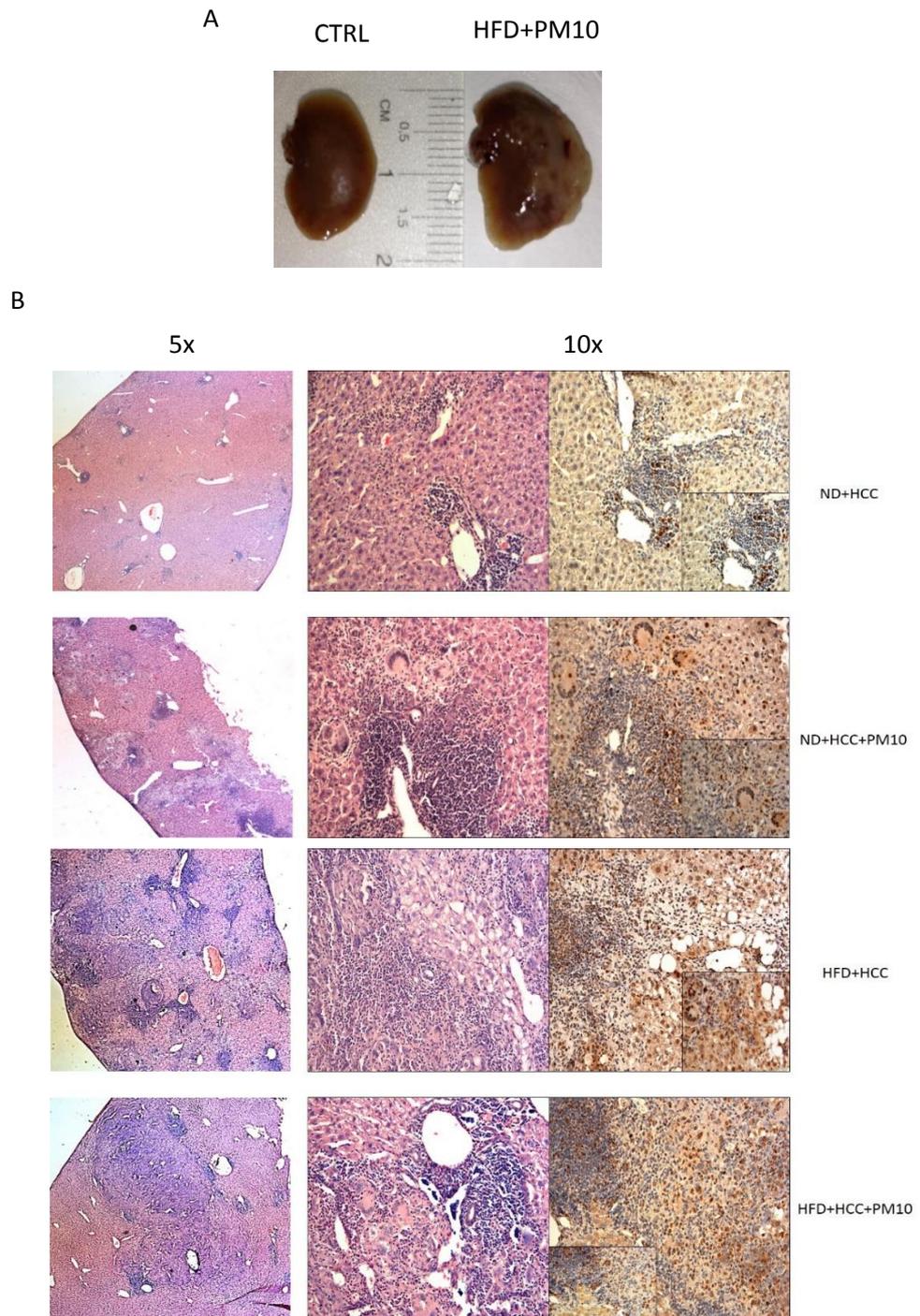


*Figura 37 Modello murino sperimentale ROSA26TOMATORED/EGFPxTg (Alb-CRE)*

In questo modello sperimentale esclusivamente gli epatociti maturi produttori albumina esprimono l'enzima di restrizione CRE che induce la delezione del gene per una proteina fluorescente rossa (TOMATO RED) e l'espressione di una proteina fluorescente verde (EGFP); risulta essere un utile modello sperimentale per poter distinguere gli epatociti verdi dalle altre cellule, che non producendo albumina esprimeranno costitutivamente la Tomato Red-FP. Utilizzando questo modello murino saranno facilmente riconoscibili le cellule tumorali impiantate (Hepa 1-6), in quanto EGFP/Tomato Red negative e nei tumori insorti

spontaneamente si potrà determinare con maggior chiarezza da quale tipo cellulare essi si siano evoluti; la presenza di EGFP o Tomato red, infatti permetterà di identificare da quale cellula avranno origine i tumori siano esse epatocita maturo, epatocita immaturo, biliocita o cellule staminali periportal (Fig.38). Questi animali, alimentati con dieta grassa e con dieta normale e trattati con iniezioni IP di PM10 quotidianamente, sono stati sottoposti ad impianto chirurgico di cellule di epatoma murino (Hepa 16) nel lobo sinistro epatico e dopo due settimane sono stati soppressi. Già al momento dell'espanto, il fegato è apparso molto diverso negli animali trattati rispetto ai controlli. Le masse tumorali nei topi trattati con PM10 sono molto più visibili poiché di dimensioni molto grandi e presentavano tutti una notevole perdita di massa corporea (Fig.38A). Il fegato espantato di questi animali è stato poi processato per le analisi istologiche ed immunoistochimiche (Fig.38B). La colorazione ematossilina eosina ha messo in evidenza delle masse tumorali in tutti i gruppi di animali, in particolar modo negli animali trattati con particolato atmosferico dove si possono osservare delle masse molto più sviluppate e a crescita molto più veloce rispetto agli animali di controllo, dove si ritrovano per lo più piccoli foci infiammatori e pre tumorali diffusi nel parenchima epatico. Su sezioni consecutive, in modo da poter avere un'immagine più chiara delle aree di danno, abbiamo effettuato un'immunoistochimica per la PCNA, antigene che riflette la situazione di attiva replicazione cellulare. Come si può vedere (Fig.38B), le aree tumorali e le zone circostanti i noduli cancerosi, mostrano una notevole positività a questo anticorpo, indicando una notevole capacità espansiva e proliferativa propria di un tumore in stadio avanzato. Il particolato atmosferico, quindi associato ad un fegato steatotico sembra dare un buon substrato per lo sviluppo tumorale.

Infine, ho estratto l'RNA dai tessuti degli animali presi in esame fino a questo punto e dopo retro trascrizione a cDNA lo ho utilizzato per l'analisi Real Time di diversi geni:



*Fig. 38 Fegato espantato da animali di controllo e animali in dieta grassa trattati con PM10 (A. Analisi istologiche e immunohistochimiche sul modello ortotopico, singenico di HCC su topi a dieta grassa e tratti con PM10. (B)*

- TGFβ e α-SMA, markers di attivazione della cellula stellata (HSC); il TGFβ subisce un drastico aumento negli animali tratti sia con dieta che con PM10, mentre l'α-SMA aumenta già negli animali trattati con il solo PM10 e con la sola dieta;
- IL 18 è una chemochina che è stata vista essere associata con l'attivazione delle NK e ha quindi un ruolo importante nella promozione dell'infiammazione epatica tipica della NASH; contrariamente a quanto atteso, però l'IL18 ha un ruolo protettivo verso la sindrome metabolica e i suoi livelli sierici aumentano nei pazienti che ne sono affetti; nel grafico riportato in figura si vede come nel mio modello animale, il PM10 di per sé vada ad aumentare i livelli di questa interleuchina rispetto ai controlli, ma questi decrementano con l'introduzione di HFD e con l'associazione di quest'ultima con il PM10.

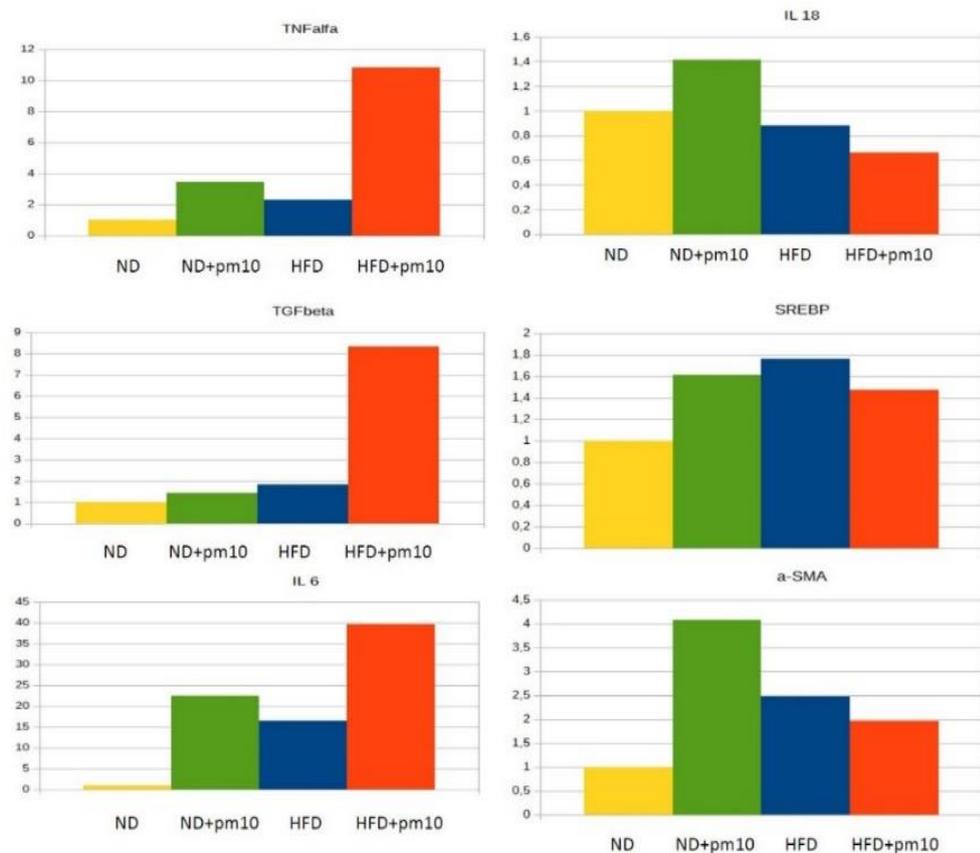
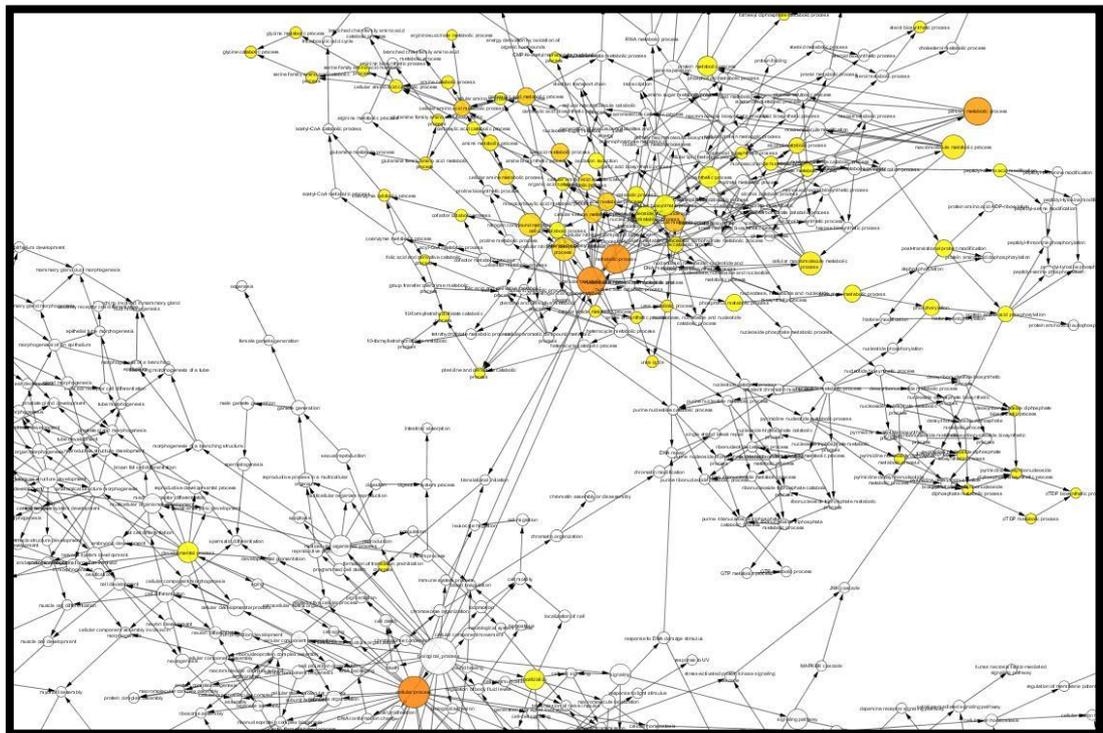


Fig.40 Analisi Real Time per a\_SMA, SREBP, IL9, TGFbeta, TNFalfa, IL18

- TNF $\alpha$  viene prodotto dal tessuto adiposo ed è stato spesso proposto come markers di sindrome metabolica e obesità e come possiamo vedere dalla fig. 40 esso risulta aumentato sia dopo somministrazione della dieta, sia negli animali in HFD e Pm10;
- SREBP, è un marker della quantità di colesterolo presente nel fegato in quanto implicato nella biosintesi del colesterolo e degli acidi grassi; come si può notare SREBP risulta essere aumentato in tutti i gruppi di animali in analisi rispetto ai controlli.

Infine ho deciso di andare a valutare il profilo proteico dei lobi accessori, ovvero non sottoposti ad impianto di cellule tumorali, dei nostri animali analizzati fino a questo momento. Ho creato dei gruppi, raccolto i lobi accessori per gruppo ed estratto con Buffer appropriati le proteine tissutali che sono state poi sottoposte ad Analisi di Proteomica bidimensionale (2D-DIGE). Le proteine sono state infatti separate in base al loro peso molecolare e al punto isoelettrico. Per la prima fase di preparazione del gel analitico, le proteine sono state marcate con citocromi fluorescenti (Cy 2, 3 e 5) e caricate su gel bidimensionale; il gel è stato scannerizzato e le



immagini sono state analizzate mediante software Decyder 7.2. In seguito, ho creato un gel preparativo che non prevede la marcatura fluorescente delle proteine ma una colorazione con Sypro, effettuata in over night dopo la corsa elettroforetica nelle due dimensioni,. Quest'ultimo gel, una volta allineato ai precedenti è stato utilizzato per la selezione degli spots di interesse effettuata attraverso il Picker robot. Ho digerito le proteine dai vari spot e inviato i campioni così ottenuti alla spettrometria di massa per le analisi. I risultati pervenuti sono stati analizzati, infine con software bioinformatici come Cytoscape (Bingo) e String, per valutare i pathway significativamente variati dopo somministrazione del particolato atmosferico nei miei animali (Fig.41). Dall'analisi bioinformatica ho ottenuti diversi dati interessanti. Sono risultati interessanti una serie di dati riguardanti molte vie metaboliche che, dopo somministrazione del trattamento sono significativamente modificate. Nella tabella, riporta di seguito sono riportate tutti questi pathways che abbiamo analizzato per avere un quadro più completo possibile dei cambiamenti innescati nei nostri animali che hanno portato all'istaurarsi di un danno epatico importante descritto con l'istologia (Tab.4).

Biological Process (GO)			
pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
GO:0006525	arginine metabolic process	5	0.000142
GO:0006526	arginine biosynthetic process	4	0.000142
GO:0010038	response to metal ion	13	0.000142
GO:0009084	glutamine family amino acid biosynthetic process	5	0.00038
GO:0000050	urea cycle	4	0.00097
GO:1901605	alpha-amino acid metabolic process	10	0.00112
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	17	0.00238
GO:0044281	small molecule metabolic process	24	0.00404
GO:0010035	response to inorganic substance	12	0.00683
GO:1901606	alpha-amino acid catabolic process	6	0.00835
GO:0042493	response to drug	12	0.0104
GO:0071310	cellular response to organic substance	22	0.0213
GO:0009064	glutamine family amino acid metabolic process	5	0.0252
GO:0042221	response to chemical	34	0.0252
GO:0070887	cellular response to chemical stimulus	25	0.0252
GO:1990267	response to transition metal nanoparticle	6	0.0252
GO:0007494	midgut development	3	0.0381
GO:0046395	carboxylic acid catabolic process	7	0.0381
GO:0046209	nitric oxide metabolic process	3	0.043

Tab.4 Pathways significativamente modificati nel nostro modello murino di danno indotto da somministrazione IP di PM10

GENE NAME	PROTEIN ID	ND+PM10 ♂	HFD +PM10 ♂	ND+PM10 ♀	HFD+PM10 ♀
Zfp60	Zinc finger protein 60	↓	↓		↓
Acad11	Acyl-CoA dehydrogenase family member 11	↓		↓	
Aco1	Cytoplasmic aconitate hydratase OS=Mus	↓		↓	
Acot9	Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial	↓		↓	↓
Aip	AH receptor-interacting protein	↑		↑	
Aldh11l1	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	↓	↑	↑	↑
Aldh4a1	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial	↓	↓	↓	↓
Anxa6	Annexin A6	↓	↓	↓	↑
Arih1	E3 ubiquitin-protein ligase ARIH1		↓	↓	↓
Arpc3	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	↑		↑	
Ass1	Argininosuccinate synthase	↓	↓	↑	↓
Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	↑	↑	↑	
Bad	Bcl2-associated agonist of cell death	↓	↓	↓	
Batf	Basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like	↓		↓	
Blnk	B-cell linker protein			↑	↓
Bloc1s5	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 5	↓	↑	↓	↑
Bpifa3	BPI fold-containing family A member 3	↑	↑	↑	↑
Bpnt1	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1	↓	↑	↓	↑
Brix1	Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog	↓	↓	↓	↓
Ccdc150	Coiled-coil domain-containing protein 150	↑	↑	↓	↓
Ccdc7	Coiled-coil domain-containing protein 7	↑	↑	↑	
Ccnb1	G2/mitotic-specific cyclin-B1	↑	↑		
Cenp	Cyclin-Y	↓		↓	
Cdc37l1	Hsp90 co-chaperone Cdc37-like 1	↓	↑	↓	↑
Cdca3	Cell division cycle-associated protein 3	↑	↑	↑	↑
Cdk1	Cyclin-dependent kinase 1	↓		↓	↑
Cdk5rap1	CDK5 regulatory subunit-associated protein 1	↑		↑	
Cenpq	Centromere protein Q	↓		↓	
Cep152	Centrosomal protein of 152 kDa	↓		↓	

Chd6	<i>Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 6</i>	↓	↑	↓	
Ckap2l	<i>Cytoskeleton-associated protein 2-like</i>	↑	↓	↑	↓
Clec2l	<i>C-type lectin domain family 2 member L</i>	↓			↓
Cmah	<i>Cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase</i>	↓	↑	↓	↑
Col4a2	<i>Collagen alpha-2(IV)</i>	↓	↓	↑	↓
Cps1	<i>Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia],</i>	↓		↓	↑
Cpz		↓	↑	↓	↑
Cst8	<i>Cystatin-8</i>	↑		↑	
Cux1	<i>Homeobox protein cut-like 1 OS=Mus</i>	↓	↑	↑	↑
Cyp2c54	<i>Cytochrome P450 2C54</i>		↑	↓	↑
Ddx27	<i>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX27</i>	↓		↓	↑
Dgkq	<i>Diacylglycerol kinase theta</i>	↓	↑	↓	↑
Dmgdh	<i>Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial</i>	↓		↓	
Dmtn	<i>Dematin</i>			↓	
Dnajc25	<i>DnaJ homolog subfamily C member 25</i>	↓		↓	
Dpysl2	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2</i>			↑	↑
Dtymk	<i>Thymidylate kinase</i>	↓	↓	↑	↑
Dusp22	<i>Dual specificity protein phosphatase 22</i>	↓		↓	
Dync1li1	<i>Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1</i>	↓	↑	↓	↑
Dzip1	<i>Zinc finger protein DZIP1</i>	↓	↓	↓	↓
Enkur	<i>Enkurin</i>	↓	↑	↓	↑
Epha8	<i>Ephrin type-A receptor 8</i>	↓		↑	
Erbin	<i>Erbin</i>	↓		↓	
Etfb	<i>Electron transfer flavoprotein subunit beta</i>			↓	
Fabp4	<i>Fatty acid-binding protein, adipocyte</i>	↑		↑	
Fdft1	<i>Squalene synthase</i>	↓		↓	
Fes	<i>Tyrosine-protein kinase Fes/Fps</i>	↑		↓	↓
Fgf20	<i>Fibroblast growth factor 20</i>			↓	
Fhad1	<i>Forkhead-associated domain-containing protein 1</i>		↑	↓	↑
Gdap2	<i>Ganglioside-induced differentiation-associated protein 2</i>	↓		↓	↓
Gkap1	<i>G kinase-anchoring protein 1</i>	↓		↓	
Gna11	<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11</i>	↑	↑	↑	↑

Gng5	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-5</i>	↑	↑	↑	↑
Gpkow	<i>G patch domain and KOW motifs-containing protein</i>	↑	↑	↑	↓
Gzmk	<i>Granzyme K</i>	↓		↓	↓
Hdgfl2	<i>Hepatoma-derived growth factor-related protein 2</i>	↓		↓	
Heatr9	<i>Protein HEATR9</i>	↑	↑	↑	↑
Hkdc1	<i>Putative hexokinase HKDC1</i>	↓			↑
Hmgcs2	<i>Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial</i>	↓	↓	↓	↓
Hnrnpc	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS</i>	↓		↓	
Hspa9	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	↓	↑	↓	↑
Hspe1	<i>10 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	↓		↓	
Htatsf1	<i>HIV Tat-specific factor 1 homolog</i>	↓	↓	↓	↓
Ifnk	<i>Interferon kappa</i>	↓		↓	↓
Il11	<i>Interleukin-11 OS=Mus musculus</i>	↑	↑	↑	↑
Il9	<i>Interleukin-9</i>	↓		↓	↑
Kctd15	<i>BTB/POZ domain-containing protein KCTD15</i>	↓		↓	
Krt18	<i>Keratin, type I cytoskeletal 18</i>	↓		↓	
Lmnb2	<i>Lamin-B2</i>	↓		↓	
Lpl	<i>Lipoprotein lipase</i>	↓		↓	↓
Lrrc47	<i>Leucine-rich repeat-containing protein 47</i>	↓	↓	↑	↑
Lsm11	<i>U7 snRNA-associated Sm-like protein LSM11</i>	↑	↑	↑	
Magix	<i>PDZ domain-containing protein MAGIX</i>	↑	↑	↑	↑
Map7d3	<i>MAP7 domain-containing protein 3</i>	↓		↓	
Mapk8	<i>Mitogen-activated protein kinase 8</i>	↓	↓	↑	↓
Mast2	<i>Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2</i>	↓		↓	
Mbp	<i>Myelin basic protein</i>	↓	↑	↓	↑
Mbp	<i>Myelin basic protein</i>	↓		↓	
Mcemp1	<i>Mast cell-expressed membrane protein 1</i>	↓			
Mrpl54	<i>39S ribosomal protein L54, mitochondrial</i>	↑	↑	↑	↑
Nat9	<i>N-acetyltransferase 9</i>	↓	↓	↓	↓
Pc	<i>Pyruvate carboxylase, mitochondrial</i>	↓		↓	
Plekhs1	<i>Pleckstrin homology domain-containing family S member 1</i>	↓	↑	↓	↑
Plgrkt	<i>Plasminogen receptor (KT)</i>	↓	↑	↓	↑

Pnck	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1B	↑		↑	↑
Pnkp	Bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase	↑	↑	↑	
Ppif	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial	↑	↑	↑	↑
Psp1	PC4 and SFRS1-interacting protein	↑	↑	↑	
Psm7	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	↓	↓	↓	↓
Rab9b	Ras-related protein Rab-9B			↓	
Racgap1	Rac GTPase-activating protein 1	↓	↑	↓	↑
Rack1	Receptor of activated protein C kinase 1	↑	↑	↑	↑
Ralb	Ras-related protein Ral-B	↓	↑	↓	↑
Rbm12b1	RNA-binding protein 12B-A	↑	↑	↑	↑
Rbmy1a1	RNA-binding motif protein, Y chromosome, family 1 member A1	↓		↓	
Rcor3	REST corepressor 3	↑	↓		↓
Rfc2	Replication factor C subunit 2	↓	↓	↓	↓
Rnf186	RING finger protein 186	↓	↑		↑
Rpl3	60S ribosomal protein L3	↓	↓	↓	
Rps2	40S ribosomal protein S2	↓		↓	
Sardh	Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial	↓	↑	↓	↑
Scp2d1	SCP2 sterol-binding domain-containing protein 1	↓			
Serpinb5	Serpin B5	↑	↑	↓	↑
Sipa111	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 1	↓	↑	↓	
Ska2	Spindle and kinetochore-associated protein 2	↓	↓	↓	↓
Slc25a23	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-3	↓		↓	
Slc25a40	Solute carrier family 25 member 40	↓	↑	↓	↑
Slc2a1	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	↓	↓	↓	↓
Slc35d3	Solute carrier family 35 member D3	↑	↑	↑	↑
Slmap	Sarcolemmal membrane-associated protein	↓	↓	↓	↓
Snd1	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	↓		↓	↑
Sod2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	↑	↑	↑	↑
Spry4	Protein sprouty homolog 4	↓	↓	↑	
Src	Neuronal proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	↓		↓	
Stard7	StAR-related lipid transfer protein 7, mitochondrial			↑	
Stau2	Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog	↑	↑	↑	↑

Stpg3	<i>Protein STPG3</i>	↓	↓	↑	
Sytl3	<i>Synaptotagmin-like protein 3</i>	↓		↓	↓
Tdrd5	<i>Tudor domain-containing protein 5</i>	↓		↓	
<b>Them5</b>	<b><i>Acyl-coenzyme A thioesterase THEM5</i></b>	↓	↓	↑	
Tjp3	<i>Tight junction protein ZO-3</i>	↓	↓	↓	↓
Tmem38b	<i>Trimeric intracellular cation channel type B</i>	↓		↓	
Trappc2l	<i>Trafficking protein particle complex subunit 2-like protein</i>	↓	↓	↓	↓
Trmt10b	<i>tRNA methyltransferase 10 homolog B</i>	↑	↑	↑	↑
Ttc22	<i>Tetratricopeptide repeat protein 22</i>	↓	↓	↓	↓
Twf2	<i>Twinfilin-2</i>	↓	↓	↓	↓
Wfdc6b	<i>WAP four-disulfide core domain protein 6B</i>	↑	↑	↑	↑
Xrcc1	<i>DNA repair protein XRCC1</i>		↓	↑	
Ybey	<i>Putative ribonuclease</i>	↑	↓	↑	↓
Zc3h13	<i>Zinc finger CCCH domain-containing protein 13</i>	↓		↓	↓

Tab.5 Elenco delle proteine modulate dal PM10 dopo Proteomica 2D-DIGE. In arancione sono segnate le proteine coinvolte nel metabolismo cellulare, mentre in azzuro le proteine coinvolte nel metabolismo tumorale.

Dall'analisi bioinformatica effettuata si identificano molti pathways che dopo somministrazione di PM10 risultano alterati (Tab.5). Negli animali trattati con PM10 si ha una significativa alterazione del metabolismo cellulare che si esplica principalmente con il blocco del ciclo dell'urea, un ciclo metabolico che si ha esclusivamente nel fegato e che è volto a ridurre la concentrazione di ammoniaca che proviene dal catabolismo degli amminoacidi e che oltre una certa concentrazione è tossica. Il ciclo dell'urea consiste nella reazione tra ammoniaca e acido carbonico che formano carbammato (ovvero l'ammide dell'acido carbonico) per avere urea (ovvero la diammide dell'acido carbonico); questa reazione viene realizzata nella cellula in 5 passaggi energeticamente favorevoli. Dal ciclo vengono forniti altri metaboliti importanti come l'arginina che, pur essendo un amminoacido essenziale per l'infanzia, in età adulta è prodotta dal ciclo. La prima reazione di innesco del ciclo è quella che porta alla formazione di carbamil-fosfato ad opera dell'enzima CARBAMIL FOSFATO SINTETASI (Cps1), nel mitocondrio:



Il ciclo dell'urea è regolato a livello della carbamil fosfato sintetasi I. L'enzima è attivato allostericamente dall'N-acetilglutammato, a sua volta sintetizzato dall'acetil-CoA e dal glutammato in una reazione catalizzata dall'enzima N-acetilglutammato sintasi (Fig.42A). Una volta attivato l'enzima Cps1 si innesca il meccanismo di recupero di ione ammonio tossico e la sua conversione attraverso il ciclo in urea, composto non tossico che viene facilmente escretato. Un'altra reazione significativamente alterata dal PM10 è quella catalizzata nel citosol dall'ARGININOSUCCINATO SINTETASI I (**Ass1**) che catalizza la seguente reazione:



Questa reazione comporta la formazione nel citosol di argininosuccinato, intermedio del ciclo dell'urea e a fumarato, intermedio invece del ciclo di Krebs, promuovendo inoltre lo "smaltimento" di un ulteriore gruppo amminico (Fig42B).

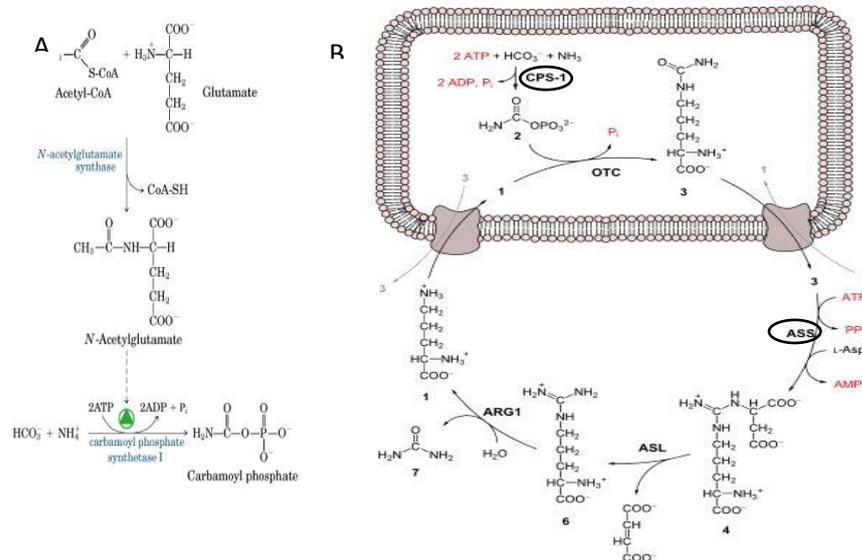


Fig.42 Reazione di attivazione dell'enzima Cps1 (A); Ciclo dell'urea (B).

L'importanza di questo enzima è nell'andare a collegare due cicli metabolici molto importanti per la cellula, il ciclo dell'urea e il ciclo di Krebs attraverso il cosiddetto "Shunt dell'aspartato-argininosuccinato". Questo collegamento avviene per formazione di intermedi chiave: 1-

conversione del fumarato, prodotto nel ciclo dell'urea, in malato; 2-l'aspartato, prodotto nel mitocondrio durante il ciclo di Krebs, che tramite uno specifico traslocatore di membrana detto shuttle (o sistema navetta) aspartato - glutammato viene trasportato nel citosol; 3- ed infine, l'arginosuccinato nel citosol, proveniente dalla reazione catalizzata dall'arginosuccinato sintetasi a partire dalla citrullina nel ciclo dell'urea (Fig43).

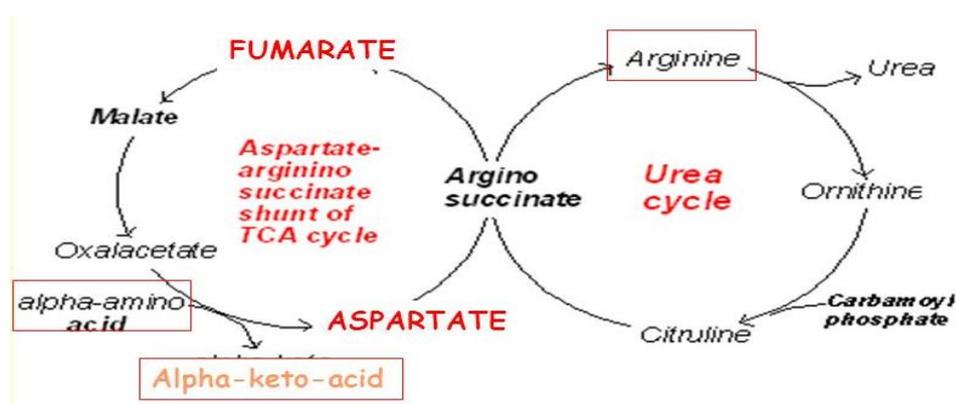


Fig. 43 Shunt dell'aspartato argininosuccinato

Entrambe queste proteine dall'analisi proteomica risultano essere significativamente diminuite sia negli animali trattati con HFD che in quelli in dieta normale, dopo esposizione al particolato. In generale, un deficit enzimatico a carico del ciclo dell'urea porta ad un accumulo di ammoniaca tossica per l'organismo e ad un conseguente aumento nel citoplasma di carbamilfosfato inutilizzato che comporterà un aumento della sintesi di acido orotico, uracile ed uridina. Nei casi in cui si abbia una carenza di carbamil fosfato sintetasi o di ornitina transcarbamilasi si può avere un accumulo di azoto sotto forma di glicina e glutammina. Altre proteine che fanno parte del metabolismo degli amminoacidi e che dall'analisi risultano essere significativamente alterate sono:

- La **dimetilglicina deidrogenasi**, è un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, che catalizza la seguente reazione:



- La **sarcosina deidrogenasi**, è un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, che catalizza la seguente reazione:

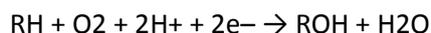


La glicina non è un amminoacido essenziale e oltre a trovarlo nella dieta, l'organismo è in grado di sintetizzarlo dalla serina (a sua volta prodotta dal 3-fosfoglicerato). Nel fegato la sintesi della glicina è catalizzata dall'enzima glicina deidrogenasi (una sintasi chiamata anche enzima del clivaggio enzimatico) e la conversione risulta facilmente reversibile. Questa proteina risulta essere uno dei maggiori costituenti del collagene, che contiene addirittura il 35% di questo amminoacido ed è poi costituito da prolina ed idrossiprolina (21%), alanina (11 %). In condizioni di dieta normale, la sarcosina deidrogenasi (**SARDH**), stimolata dalla somministrazione di PM10 aumenta la propria attività ossidoreduttasica per produrre glicina, fenomeno che viene sovertito in condizioni di dieta grassa (HFD). Gli acidi biliari che compongono la bile (acido colico e chenodesossicolico) vengono prodotti dagli epatociti a partire dal colesterolo e, successivamente, uniti alla glicina e la taurina. Nell'intestino essi vengono ulteriormente modificati dalla flora batterica, che li scinde in glicina, taurina e acidi biliari, i quali, a loro volta sono in parte trasformati in acidi biliari secondari (acido desossicolico e litocolico). Nel fegato possono essere ulteriormente elaborati con sintesi di acidi biliari terziari (acido ursodesossicolico) e/o nuovamente uniti alla glicina e alla taurina ed eliminati nuovamente nella bile. Alla luce di questo si può dire che, il PM10 in dieta normale, porta ad un aumento della formazione di glicina, importante per la formazione di piruvato, collagene e trasporto degli acidi biliari. Introducendo, invece, una dieta ad alto contenuto di colesterolo e acidi grassi, si ha un blocco nella produzione della glicina, dovuto probabilmente anche ad una diminuzione della disponibilità di substrato (sarcosina) ad opera dell'enzima **DMGDH**. Questo fenomeno comporta un sovertimento del normale metabolismo amminoacidico, ad un accumulo di N-N-metilglicina

a livello epatico ed è indice di una deregolazione del metabolismo dell'azoto. Quest'ultimo è regolato dalla glutammia sintetasi che promuove la rimozione di ammoniaca libera tossica ed è un enzima che è regolato allostericamente proprio dalla glicina, che se diminuita blocca la conversione del glutammato in glutammia.

Alle proteine descritte fino a qui se ne aggiungono altre, elencate di seguito, che vediamo coinvolte nel metabolismo degli acidi carbossilici.

**Il Cytochrome P450 2C54 (Cyp2c54)**; le reazioni catalizzate dalle isoforme del citocromo P450 sono svariate. La più comune è una classica reazione da monossigenasi: il trasferimento di un atomo di ossigeno dall'ossigeno molecolare a un substrato organico, con riduzione del secondo atomo di ossigeno ad acqua:



Molte delle isoforme enzimatiche di citocromo P450 fino ad oggi individuate agisce nel metabolismo dei farmaci, a livello della fase I dell'eliminazione di composti xenobiotici da parte dell'organismo; i substrati della reazione, infatti, sono rappresentati principalmente da molecole lipofile in cui l'attacco di ossigeno aumenta l'idrofilicità e favorisce l'azione dei successivi enzimi detossificanti e il conseguente smaltimento. Data questa spiccata tendenza del cyp450 lo studio e la caratterizzazione biochimica delle isoforme negli animali sono mirati principalmente a definire il loro tipo di risposta metabolica agli stress da xenobiotici, in modo da poterli utilizzare come organismi modello nelle sperimentazioni di nuovi farmaci e nella ecotossicologia. Poiché l'effetto del contaminante può essere individuato anche in dosi subletali, prima della comparsa di danni irrimediabili agli organismi e all'ecosistema, la variazione dei livelli di citocromo P450 può rappresentare un primo campanello d'allarme di una necessità di intervento di risanamento

del sito esaminato. Nel nostro modello sperimentale i livelli di Cyp450 risultano essere significativamente aumentati dopo somministrazione di inquinante ambientale.

**L'Acyl-coenzyma A thioesterase (THEM5)**; questo enzima gioca un ruolo molto importante nel metabolismo degli acidi grassi mitocondriale e catalizza la seguente reazione:



Quando la cellula ha sufficiente quantità di ATP, data dal notevole apporto energetico che ottiene dall'incremento della via glicolitica e dal ciclo di Krebs, l'acetil-CoA in eccesso, viene utilizzato per produrre acidi grassi, da intendere come vere e proprie macromolecole di riserva. Il processo di sintesi avviene nel citoplasma delle cellule del fegato e del tessuto adiposo e porta proprio alla formazione di palmitato. Con l'invecchiamento e con una dieta grassa i topi secondo la letteratura sviluppano un fegato grasso a causa dell'alterazione del metabolismo degli acidi grassi mitocondriale e del rimodellamento della cardiolipina sulla membrana mitocondriale. Queste alterazioni correlano con una diminuzione della beta ossidazione mitocondriale e la formazione di corpi chetonici.

**L'aconitato idratasi (o aconitasi) (ACO1)**; è un enzima di localizzazione mitocondriale che catalizza la isomerizzazione del citrato ad isocitrato nel corso del ciclo di Krebs, nel modo seguente:



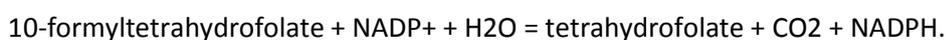
Questa proteina dopo somministrazione di PM10 diminuisce significativamente, comportando quindi un blocco a livello del ciclo di Krebs.

**La Piruvato Carbossilasi (PC)** è un altro enzima che, dopo somministrazione di PM10 diminuisce significativamente, comportando un accumulo di piruvato. La piruvato carbossilasi è un enzima

la cui attività è regolata dalla concentrazione epatica di Acetil-CoA; il PM10 come abbiamo detto, causa una diminuzione della  $\beta$  ossidazione e quindi ad una diminuzione della disponibilità di acetil CoA che comporta quindi una inattivazione di questo enzima e ad un blocco del ciclo di Krebs.

Oltre al metabolismo cellulare, dalla analisi di proteomica emergono dati interessanti sull'alterazione del metabolismo tumorale. Le cellule tumorali infatti, sovvertono il metabolismo della cellula per sfruttare le risorse energetiche e inducono dei cambiamenti nella proliferazione e nella regolazione del ciclo cellulare e nella produzione di specie reattive dell'O<sub>2</sub> che porta ad un aumento dello stress ossidativo. Con l'analisi bioinformatica ho individuato, quindi, le seguenti proteine:

- **l'Aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1 (Aldh1l1)**, enzima che promuove la seguente reazione:



Questa enzima fa parte della famiglia delle aldeidi deidrogenasi e dalla letteratura si evince come una perdita di funzione, o una diminuzione significativa di attività di questa proteina sia correlato con una diminuzione dell'apoptosi, un aumento della motilità cellulare e nella progressione tumorale.

- **l'Aldehyde dehydrogenase 4 family, member A1 (Aldh4l1)**, enzima che catalizza la seguente reazione:



ALDH4 è un enzima NAD<sup>+</sup> della matrice mitocondriale che catalizza il secondo step della degradazione della prolina. La P53, principale marker apoptotico attiva la trascrizione genica per

questa proteina con lo scopo di andare a diminuire lo stress cellulare indotto dalle specie reattive dell'O<sub>2</sub> (131). Nel mio modello sperimentale questa proteina risulta essere significativamente diminuita ad indicare, infatti un notevole aumento intracellulare di ROS indotte dal danno da PM10.

- **Putative hexokinase (HKDC1)**, anche detta esochinasi, è un enzima, appartenente alla classe delle transferasi, che catalizza la seguente reazione:



Questo è un enzima chiave della glicolisi ed è coinvolto anche nella sintesi del glicogeno ed è responsabile del trasferimento di un gruppo fosfato da una molecola ad alta energia (in questo caso ATP) ad un substrato. I substrati dell'esochinasi sono diversi zuccheri esosi, glucidi a sei atomi di carbonio come il glucosio, substrato della glicolisi stessa, o il mannosio. Più propriamente, dunque, il termine esochinasi si riferisce ad una classe di isoenzimi, relativamente aspecifici, che catalizzano la fosforilazione di esosi. Le esochinasi I è un isoenzima a "bassa Km", poiché ha una elevata affinità per il glucosio anche a basse concentrazioni (anche inferiori a 1 mM). L'aumentata presenza di esochinasi che ritroviamo negli animali in HFD e in dieta normale dopo somministrazione del PM10, è un fenomeno correlato alla presenza di tumore, come dimostrato dalla letteratura che riporta un dato di incremento di esochinasi fino a 200 volte (132). Ciò permette alle cellule tumorali di avviare verso la glicolisi una maggior quantità di glucosio e di sostenere dunque con un'alta concentrazione di ATP la crescita neoplastica (questo effetto è definito Effetto Warburg, dal nome del ricercatore Otto Warburg che lo identificò nel 1930).

- **L'interleuchina 11 (IL11)**, è una citochina prodotta principalmente dagli epatociti in risposta alla specie reattive dell'ossigeno probabilmente rilasciate dagli epatociti stessi in apoptosi. L'IL11 viene secreta dalle cellule morenti e al tempo stesso, attraverso la fosforilazione di STAT3 negli

epatociti adiacenti, promuove un fenomeno di proliferazione compensativa. Studi in vitro, che fanno uso di una molecola agonista del recettore dell'IL11 dimostrano come un incremento dell'attività di questa interleuchina scaturisca una cascata di eventi che portano infine ad un aumento della proliferazione cellulare anche in presenze di molti tipi di cancro.

- **BAD**, fa parte della famiglia di proteine pro-apoptotiche Bcl2 che regolano la via intrinseca dell'apoptosi e la cui espressione, dopo trattamento con PM10 è significativamente diminuita. Dalla letteratura è noto che nell'HCC si ha una netta diminuzione dell'espressione di questa proteina pro-apoptotica; unico trattamento valido per i pazienti affetti da HCC è il Sorafenib, farmaco inibitore multichinasico che agisce anche su BAD, bloccandone i siti inibitori e rendendo, quindi, il tumore sensibile all'apoptosi indotta da questa proteina (133).
- **26S proteasome regulatory chain , p40 (PSMD7)** è una proteasi molto conservata che è stata vista aumentare fino a 10 volte nel metastasi epatiche. E' un enzima responsabile della degradazione delle proteine a breve vita o di lunga vita come la ciclina A, B, E la p21, p27, p53, cJun e cfos. La p40, quindi svolge un ruolo importante nella regolazione del ciclo cellulare, nell'apoptosi, nell'angiogenesi e nel funzionamento del sistema immunitario. Questa proteina, bersaglio del trattamento farmacologico del Bortezomib (inibitore proteasico) è stata vista giocare un ruolo chiave nell'indurre la morte cellulare per apoptosi in numerosi modelli tumorali (cancro alla prostata, colon, pancreas e altri ancora) ed è per questo che la terapia inibitoria del proteasoma viene proposta come efficace terapia contro la proliferazione neoplastica.

#### **4.4 CONCLUSIONI 2° PROGETTO**

La NAFLD è una delle principali cause di danno epatico cronico nei Paesi Industrializzati, in quanto strettamente associata allo stile di vita tipico di queste aree geografiche. La prevalenza della NAFLD è in progressivo aumento sia nella popolazione adulta che in quella pediatrica. Se

la prognosi della NAFL è piuttosto benigna, la stessa cosa non può essere affermata per la NASH. Nel momento in cui si innesca il processo necro-infiammatorio (NASH), l'andamento prognostico si modifica radicalmente. In circa 10 anni il 25% dei pazienti con NASH va incontro a cirrosi mentre in alcuni casi si assiste all'insorgenza di un carcinoma epatocellulare, ma talvolta può insorgere ancor prima della fase cirrotica. È per tutte queste motivazioni che è di fondamentale importanza individuare quei fattori che determinano la progressione del danno epatico fino allo stadio terminale della malattia e che, pertanto, comportano una modificazione in negativo della storia naturale di quest'ultima. Scopo di questo studio è stato quello di valutare il ruolo di alcuni dei principali meccanismi di progressione della NAFL. In particolar modo mi sono soffermata su due fattori principali: la dieta ipercalorica e l'inquinamento atmosferico. L'insorgenza di obesità dovuta ad una dieta occidentale ricca di alimenti grassi, comporta la comparsa di insulino-resistenza e incremento degli acidi grassi liberi circolanti (FFA), ponendo le basi per lo sviluppo della steatosi e della steatoepatite. L'incremento della perossidazione lipidica e la produzione di ROS, confermate attraverso analisi di proteomica 2D-DIGE, provocano danno cellulare e la liberazione di citochine pro-infiammatorie, responsabili dell'attivazione delle cellule stellate, della chemiotassi leucocitaria e di tutti i fenomeni coinvolti nella flogosi locale. Ho anche visto attraverso le analisi preliminari effettuate su linee cellulari tumorali come il PM10 andasse a modificare il ciclo replicativo, promuovendone la proliferazione e quindi un fenotipo maggiormente aggressivo delle cellule tumorali. Questo risultato, riprodotto in vivo, su modelli di impianto di cellule tumorali nel fegato, ha confermato questo dato: infatti si ha un quadro istopatologico molto più severo nei gruppi dove era stata somministrato il particolato atmosferico rispetto ai controlli. Alcuni dei componenti del PM10 sono direttamente coinvolti nel processo di cancerogenesi, attraverso l'interazione con specifiche sequenze geniche coinvolte nella regolazione della proliferazione cellulare. I dati ottenuti in questo studio

suggeriscono, quindi, che l'esposizione al PM10 e la dieta iperlipidica rappresentano un fattore di rischio significativo per la progressione della NAFLD a NASH e l'insorgenza di epatocarcinoma. Negli studi in vivo, sono stati valutati gli effetti della HFD e dell'esposizione al PM10, sia singolarmente che in associazione, e i risultati evidenziano il ruolo sinergico esistente tra dieta iperlipidica ed esposizione al PM10 nel determinare la progressione del danno epatico. Il principale meccanismo fisiopatologico coinvolto nell'evoluzione della patologia è lo stress ossidativo, la cui valutazione è stata effettuata attraverso la misurazione degli addotti esociclici del DNA (M1dG). La flogosi tissutale e la produzione di specie reattive dell'ossigeno costituiscono un substrato ambientale favorevole allo sviluppo e alla crescita dell'epatocarcinoma. Come dimostrato dalla analisi di proteomica, il PM10 induce delle significative modificazioni del metabolismo cellulare epatico e soprattutto promuove e favorisce la crescita neoplastica.

## 5 MATERIALI E METODI

---

### 5.1 LE COLTURE CELLULARI

Le HSCs umane sono state isolate a partire da sezioni chirurgiche di 10-20 gr di fegato umano normale non utilizzabile per trapianto e previa autorizzazione dei comitati etici istituzionali, tramite doppia digestione con pronase e collagenasi e successiva centrifugazione su gradiente di Nycodenz, seguendo il seguente protocollo.

Le resezioni chirurgiche sono state lavate con Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), sminuzzate con un bisturi e trasferite in una fiasca per la successiva digestione enzimatica, sempre mantenendo condizioni di sterilità. La digestione enzimatica del tessuto è stata eseguita in 100

ml di DMEM/F12, contenenti 0.5% di pronase (103 Unità proteolitiche/mg; Calbiochem, San Diego, CA), 0.05% di collagenasi tipo IV (Sigma Chemical CO, St Louis, MO), 10mg/ml di deossiribonucleasi (DNase) di pancreas bovino (Calbiochem), in agitazione per 30 minuti a 37°C. La sospensione cellulare risultante è stata filtrata attraverso una garza di nylon con maglie di 100 µm e il materiale non digerito è stato nuovamente sottoposto a digestione con concentrazioni ridotte di pronase (0.05%), per essere poi unito al filtrato della prima digestione. Il pool di cellule mesenchimali è stato raccolto dalla sospensione così ottenuta centrifugando a 800'g per 10 minuti, sottoposto a diversi lavaggi in DMEM/F12 contenente 10mg/ml di DNase e infine centrifugato su gradiente continuo di Nycodenz (Histodenz, Sigma) a concentrazione finale dell'11.5%. Le cellule stellate purificate formano una banda discreta e vengono recuperate all'interfaccia Nycodenz-sovrinatante. Dopo l'isolamento, le cellule sono state messe in Iscove's Modified Dulbecco's Medium supplementato con il 20% di FBS, insulina 0.6 IU/ml, glutamina 2mM, sodio piruvato 0.1mM, aminoacidi non essenziali 0.1mM e soluzione antibiotica-antimicotica, in atmosfera controllata al 5% di CO<sub>2</sub> e a 37°C.

Gli esperimenti in vitro descritti sono stati eseguiti utilizzando linee di HSCs umane ottenute da altrettanti isolamenti indipendenti. La vitalità delle colture è stata verificata tramite esclusione del trypan blu ed è sempre risultata maggiore del 95%.

Le altre linee cellulari utilizzate per questo lavoro sono state: cellule HEPA 1-6, derivate da epatocarcinoma di topo; cellule HEPG2, HuH7 e Hep3B, cellule di epatocarcinoma umano e le 3T3, fibroblasti murini e le cellule Lx2, HSC immortalizzate. Queste linee cellulari sono state cresciute nel medium Eagle modificato secondo Dulbecco (DMEM) con 10%FBS "Fetal Bovine Serum", 2% Glutamina e 100mg/ml di streptomina e penicillina (antibiotici)eccezione fatta per le cellule Lx2 che sono state fatte crescere in Iscove's Modified Dulbecco's Medium.

Tutti i modelli cellulari sono stati cresciuti in incubatore con atmosfera controllata al 5% di CO<sub>2</sub> e a 37°C.

#### **5.1.1 Studio della proliferazione cellulare mediante incorporazione di Timidina Triziata (TH3)**

Le HSC sono coltivate in Iscove's Medium (Iscove's modified Dulbecco's medium, IMDM, with sodium bicarbonato, Sigma) al 20% di Fetal Bovine Serum (Gibco), in piastre da 6 wells ad una densità di circa 106 cellule/pozzetto. Dopo aver coltivato per 24h le cellule in Iscove's Sfif, a ciascun pozzetto viene aggiunta di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentrazioni crescenti (da 10mM a 500mM) dopo 12, 24 e 48h è stato aggiunto 50µl di TH3 precedentemente diluita 1:50 in Hank's (Hank's Balanced Salt Solution Modified, HBSS, Sigma). Le cellule sono così incubate a 37°C per 4 ore, trascorse le quali viene tolto il terreno da ciascun campione e aggiunto 2ml di TCA 5% (Acido TriCloroAcetico) freddo ad ogni pozzetto. I campioni sono conservati in ghiaccio per 15 minuti. Successivamente si aspira il TCA 5% e lo si aggiunge di nuovo sempre nella stessa quantità (2ml) per due volte consecutive. L'operazione si effettua mantenendo i campioni in ghiaccio. Dopo aver aspirato per l'ultima volta il TCA 5% si aggiungono 750 µl NaOH-SDS e si conservano i campioni a 37°C per 30 minuti. Da ciascun pozzetto si prelevano 500 µl di campione e si trasferiscono in vials con 50 µl di HCl 6N e 5 ml di liquido di scintillazione. I vials sono inseriti nel β-Counter il quale trasformerà in dati numerici la quantità di TH3 incorporata dalle cellule di ciascun campione.

#### **5.1.2 Valutazione delle Senescenza cellulare**

Il kit di senescenza cellulare (Bio Vision) è un test istochimico che valuta l'attività dell'enzima beta-galattosidasi (SA-beta-GAL) in sezioni tissutali o cellule in coltura. Le cellule sono piastrate in multi-well da 6 e una volta raggiunta la confluenza si procede con la rimozione del medium di crescita e al lavaggio con PBS 1X. Successivamente le cellule sono fissate con soluzione apposita

presente nel kit per poi essere sottoposte a colorazione che è mantenuta overnight a 37 °C. Il giorno seguente si osservano le cellule al microscopio e si procede con l'acquisizione delle immagini.

### **5.1.3 Determinazione dell'apoptosi e della crescita cellulare**

La crescita cellulare è stata valutata al citofluorimetro MUSE Cell Analyzer (Millipore) con il kit "Muse Cell count & Viability Kit" (Millipore), che a partire da una sospensione cellulare fornisce il numero assoluto di cellule, la quantità di cellule vitali e la percentuale di vitalità cellulare nel campione in esame. Nello specifico, le cellule Hepa 16, AML-12 e mHSC sono state piastrate e a 24h dalla piastratura sono state trattate con il PM10 a concentrazioni crescenti per 24h, 48h e 72h; al termine di tale periodo le cellule sono state staccate e contate seguendo il protocollo fornito dal produttore.

L'apoptosi è stata valutata con il Kit "Muse Annexin V e Death Cell" su cellule HSC umane trattate per 24h con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e con il farmaco ex527 (5 µl/ml) e poi staccate dal substrato di crescita e 100 µl della sospensione cellulare di ogni campione, avente una concentrazione compresa tra 1X10<sup>6</sup> e 1X10<sup>7</sup> cellule /mL, sono stati incubati per 20 minuti a temperatura ambiente con la soluzione di colorazione, prima di essere analizzati dal citofluorimetro.

## **5.2 ESTRATTI NUCLEARI**

Le proteine nucleari sono state estratte utilizzando il "CelLytic NuCLEAR EXTRACTION Kit" (Sigma), seguendo il protocollo "Nuclear Protein Extraction from 200 µl of packed cell volume without the use of a detergent," in cui è stato usato il buffer di lisi isotonic. L'estratto nucleare ottenuto è stato risospeso in HEPES (pH 7.9) 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, NaCl 0.42 M, EDTA 0,2 mM e 25% di glicerolo, cui sono stati aggiunti DTT 0.1 M e 1% di protease inhibitor cocktail. I lisati

sono stati centrifugati a 20.000 g per 10 minuti a 4 °C e i supernatanti sono stati congelati prima in azoto liquido e successivamente riposti a -80 °C, fino al loro utilizzo.

### 5.3 ESTRATTI CITOPLASMATICI E MITOCONDRIALI

Le proteine sono state estratte utilizzando il kit "*Cytocrome C Release Apoptosis Assay Kit*" (Calbiochem). È stato seguito il protocollo indicato dal kit partendo da  $5 \times 10^7$  cellule per ogni punto sperimentale. Gli estratti citoplasmatici e mitocondriali ottenuti, sono stati quantizzati allo spettrofotometro mediante l'impiego del reagente colorimetrico Bradford ed infine conservate a -80°C, fino al loro utilizzo.

### 5.1 RT- PCR (REVERSE TRASCRIPCIÓN- POLYMERASE CHAIN REACTION)

L'RNA totale è stato estratto con il TRIzol™ (Invitrogen) seguendo il protocollo fornito dalla ditta. Un µg di RNA ottenuto dalle cellule è stato trascritto in 20 µl di reazione, a 42°C per 60 minuti, utilizzando dei "random-esameri" e la MMLV (Virus della Leucemia Murina Molony) (Life Technologies Inc, Gaithersburg.MD).

#### 5.1.1 Analisi Real Time (qPCR)

Abbiamo utilizzato 500 ng di retrotrascritto per effettuare una Real Time qPCR; il cDNA è stato sottoposto ad amplificazione mediante termociclatore ABI PRISM 7000, usando "QuantiTect primer assay" 10x (contenente i primer) e "QuantiTect Sybr green PCR Master Mix" 2X (contenente HotStarTaq DNA polimerasi, QuantiTect Sybr green PCR buffer, Sybr green, e rox passivo che serve per normalizzare il segnale di fluorescenza del Sybr Green), seguendo il protocollo "QuantiTect SYBR Green PCR" (Qiagen). La reazione è avvenuta in un volume finale di 50 µl. L'amplificazione è stata eseguita attraverso 3 step: incubazione a 95°C per 15 secondi per attivare la HotStarTaq DNA polimerasi; annealing a 56°C per 30 secondi e estensione a 76°C

per 30 secondi, per un totale di 40 cicli. La normalizzazione è stata eseguita mediante confronto dei livelli di espressione del gene GAPDH (housekeeping). I primers murini utilizzati sono stati:  $\alpha$ -SMA, TGF $\beta$ , MMP9, MMP2, TIMP1, TNF $\alpha$ , IL18, IL9 e SREBP.

### **5.1.2 Valutazione dello stato ossidativo indotto**

Dopo circa 48 settimane di dieta grassa e/o esposizione al PM10 alcuni topi di questo modello sperimentale sono stati sacrificati per poter eseguire una valutazione dello stress ossidativo, del livello di citochine e del conseguente danno cellulare. Lo stress ossidativo, la perossidazione lipidica porta alla produzione di malonilaldeide (MDA). L'MDA e i suoi derivati si formano soprattutto durante l'ossidazione del DNA. Gli addotti esociclici del DNA, tra cui l'M1dG rappresenta un marker di stress ossidativo e di perossidazione lipidica. I livelli epatici di M1dG sono stati misurati utilizzando <sup>32</sup>P-DNA con un post labeling assay, tecnica altamente sensibile impiegata per l'analisi del danno ossidativo del DN indotto dai ROS. Tali addotti sono stati misurati nei fegati dei topi C57BL/6 dopo 8 settimane di dieta ad alto contenuto di grassi ed esposizione al PM10. Nello specifico, il DNA è stato estratto dai fegati degli animali e purificato attraverso un metodo che richiede la digestione da parte della ribonucleasi A e trattamento con ribonucleasi T1 e proteinasi K. Si procede con l'estrazione con l'estradiolo utilizzando fenolo; successivamente si esegue la precipitazione con fenolo/cloroformio/isoamile (25:24:1) ed etanolo. La concentrazione e la purezza del DNA viene determinata con l'ausilio di uno spettrofotometro. I campioni di DNA epatico vengono conservati a -80°C e poi analizzati con spettrometria di massa (MALDI-TOF-MS).

## **5.2 PROCESSO DI PREPARAZIONE PER ANALISI ISTOLOGICHE**

Gli organi espunti dai diversi modelli in vivo, vengono conservati con due modalità diverse:

- in azoto liquido, dove abbiamo raccolto i lobi accessori dei fegati, per analisi quali: estrazioni di proteine da tessuto e taglio di tessuto al criostato per analisi immunohistochimiche. Abbiamo utilizzato questo metodo di conservazione principalmente per i tessuti fluorescenti dei topi transgenici;

- in formalina, per il lobo destro e sinistro dei fegati che subiranno invece un processo di paraffinazione;

I campioni congelati in azoto liquido sono stati tagliati ancora congelati mediante il criostato, e le sezioni di 5-7  $\mu\text{m}$  così ottenute sono state immerse in formalina tamponata al 4% per 10 minuti, prima di venire utilizzate per colorazioni o analisi immunohistochimiche. I campioni conservati in formalina invece, vengono messi in H<sub>2</sub>O distillata da un minimo di due ore, fino a un massimo di 48 ore a seconda di quanto tempo sono stati lasciati in formalina (da 1 settimana ad un mese). Il fegato viene poi tagliato con l'uso di un bisturi in diverse porzioni, che vengono messi in contenitori da inclusione e si procede con incubazioni secondo il seguente protocollo:

- 30 minuti in H<sub>2</sub>O distillata, per due volte;
- 45 minuti in EtOH 50%;
- 45 minuti in EtOH al 75%;
- 45 minuti in EtOH al 95%;
- 30 minuti in EtOH al 100%, per due volte;
- 30 minuti in Bioclear, per due volte;

In seguito i pezzi vengono messi in Paraffina, poi cambiata almeno una volta ed infine si procede con l'inclusione dei pezzi in blocchetti.

### 5.2.1 Colorazioni istologiche

I pezzi di tessuto in paraffina vengono tagliati al microtomo per ottenere delle sezioni di 5µm, che vengono lasciate almeno per 12 ore a 37°C. Prima della vera e propria colorazione queste subiscono un processo di deparaffinazione, sotto cappa chimica:

- 20 minuti in Bioclear
- 5 minuti in EtOH 100%
- 5 minuti in EtOH 95%
- 5 minuti in EtOH 75%
- 5 minuti in EtOH 50%
- 10 minuti in H<sub>2</sub>O distillata;

Al seguito le sezioni sono state sottoposte a due tipi di colorazioni differenti:

- **Ematossilina- Eosina.** Questa colorazione verosimilmente è la combinazione di coloranti più comune in istologia. L'ematossilina è un colorante vegetale, estratto dal legno di una leguminacea, l'*Haematoxylum campechianum*. Il preparato viene prima immerso nella soluzione di ematossilina (5 minuti) e quindi dopo il lavaggio, in H<sub>2</sub>O distillata che viene poi sostituita con H<sub>2</sub>O corrente, viene immerso nella soluzione di eosina (2 minuti) e nuovamente lavato in H<sub>2</sub>O distillata 5 minuti. L'ematossilina colora in blu-violetto i componenti cellulari carichi negativamente, come acidi nucleici, proteine di membrana e membrane cellulari, elastina. Questi componenti sono detti basofili e si trovano prevalentemente a livello del nucleo, che assume pertanto il colore blu. L'eosina colora invece in rosso rosato i componenti carichi positivamente, come molte proteine cellulari, quelle mitocondriali, oltre alle fibre collagene. Questi componenti sono detti eosinofili o acidofili e determinano una colorazione rosata di tutte le rimanenti zone cellulari, il citoplasma e le sostanze extracellulari.

- **Sirius Red** è un metodo per la determinazione collagene, consentendo misure morfometriche quantitative da eseguire in aree di tessuto definite (134). Per la colorazione è stato utilizzato il Picrosirius (0,5% in soluzione acquosa satura di acido picrico), un colorante azoico anionico che colora selettivamente il collagene, reagendo attraverso i suoi gruppi solforici acidi con i gruppi basici ionizzabili presenti nelle molecole del collagene (135). Le molecole del colorante si dispongono parallelamente alle fibre collagene e questo allineamento concorre ad incrementare la naturale birifrangenza del tessuto. La colorazione porta ad evidenziare quindi le fibre collagene in rosso intenso con un background giallo/arancione del tessuto circostante.

A seguito per entrambe le colorazioni le sezioni istologiche vanno incontro nuovamente ad un processo di paraffinazione che prevede:

- 30 secondi in EtOH 95%
- 30 secondi in EtOH 100%
- 10 minuti in Bioclear;

Di seguito, i vetrini sono stati coperti con balsamo DPX "Neutral Mounting Medium" (Aldrich), e vetrino copri-oggetto, posti ad essiccare e quindi osservati al microscopio ottico a luce polarizzata (Leica DFC 320) .

### 5.2.2 Immunisto chimica

Sono state utilizzate sezioni di 5-7  $\mu\text{m}$  che sono state raccolte su vetrini portaoggetti e lasciate asciugare a 37°C; le sezioni di tessuto provenienti da tessuti congelati sono stati immersi per 10 minuti in formalina tamponata al 4% e poi passati in acqua distillata per rimuovere la formalina in eccesso. Dopo il processo di reidratazione sono passate in acqua distillata per 5 minuti. Poi le sezioni sono state immerse in soluzione H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% in acqua distillata per un periodo di un'ora a temperatura ambiente, per inibire le perossidasi epatiche; in seguito i vetrini sono stati immersi in una soluzione di PBS (phosphate-buffered saline) e BSA (bovine serum albumin) al

2%, per saturare gli antigeni di superficie, per circa un'ora; a questo punto le sezioni sono state lavate in PBS e incubate Over Night (ON) a 4°C con l'anticorpo specifico disciolto in PBS/BSA al 2%:

- Anticorpo anti- $\alpha$ -SMA Abcam, in diluizione 1:200;
- Anticorpo anti-SIRT1 policlonale di coniglio (Cell Signaling) in diluizione 1:100;
- Anticorpo anti-PCNA Abcam in diluizione 1:400;

Il giorno seguente le sezioni sono state lavate in PBS per 10 minuti due volte, per poi essere incubate a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari coniugati a perossidasi che errano poi rilevati attraverso il trattamento con un cromogeno, la 3,3-DiaminoBenzidina (Sigma-SIGMAFAST™ DAB), che sviluppa un precipitato color marrone in corrispondenza del complesso Ag – Ab. Infine, dopo un lavaggio in acqua distillata per 5 minuti, le sezioni sono state controcolorate con ematossilina per 5 minuti e disidratate in soluzioni crescenti di etanolo e in Bioclear, e infine montate con Dpx.

### 5.2.3 Immunofluorescenza su sezioni istologiche

I frammenti di tessuto epatico congelati sono stati fissati con Formalina tamponata al 4% per 10 minuti a temperatura ambiente, poi sono stati tagliati al criostato per ottenere delle sezioni istologiche di circa 5-7 $\mu$ m; successivamente sono stati fatti almeno due lavaggi con acqua distillata di 10 minuti l'uno e poi è stata impiegata una soluzione 10 mM di TRIS Base + 1mM di EPTA + 0,05% TWEEN a pH 9, che è stata portata prima a ebollizione e poi sono stati immersi completamente i vetrino con le sezioni istologiche per 10 minuti; seguono due lavaggi di acqua distillata (10 minuti caduno) e altri due lavaggi con PBS per 5 minuti; a questo punto è stato aggiunto PBS 0,1 M Glicina, per bloccare l'autofluorescenza del tessuto. Le sezioni sono state circoscritte con un pennarello idrofobico e incubate con una soluzione di PBS al 10% + NGS (Normal Goat Serum) per 30 minuti a temperatura ambiente e in seguito con l'anticorpo

specifico O/N a 4°C utilizzando una cameretta umida. Gli anticorpi primari utilizzati per questa analisi sono stati:

- Anti-Caspasi 3 attivata, diluito 1:50
- Anti- a-SMA, diluito 1:100
- Anti-SIRT1, diluito 1:100

Il giorno seguente si procede con l'incubazione di 1h a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario specifico coniugato con un fluoroforo di rilevazione (mouse/rabbit AlexaFluor 638 nm) e con il DAPI (1:2000) per la marcatura dei nuclei. In questa fase è necessario ridurre al minimo l'esposizione alla luce per evitare la degradazione degli anticorpi secondari impiegati. In fine le sezioni sono state lavate due volte con PBS per 10 minuti, poi con acqua distillata e sono state montate con alcune gocce di Prolong Gold antifade medium (invitrogen) ed è stato fatto aderire il vetrino copri oggetto; dopo di che è stato lasciato asciugare over-night a temperatura ambiente e le immagini sono state acquisite con microscopio a fluorescenza Leica CTR 6000.

#### 5.2.4 Immunofluorescenza su cellule

L'immunofluorescenza è stata effettuata su cellule mHSC e hHSC primarie trattate con Resveratrolo e con il farmaco ex527, inibitore della sirtuina 1.

100,000 di queste cellule sono state piastrate su dei vetrini copri oggetto, prima lavati in EtOH al 75%, adagiati sul fondo di multiwells da 6 pozzetti e fatte crescere overnight a 37°C. Le cellule sono state trattate o trasfettate secondo necessità e poi lasciate crescere come previsto dal protocollo sperimentale. Sono state poi fissate in paraformaldeide al 4% in PBS per circa 15 minuti a temperatura ambiente, prima di essere lavate con PBS 1X per almeno due volte. Dopo sono state incubate 10 minuti a -20°C in Metanolo e nuovamente lavate in PBS 1X. Il bloccaggio dei siti aspecifici è stato effettuato con NGS 10%+PBS10X+ 0,01% PBS/TRYTON in H<sub>2</sub>O distillata. A questo è seguito l'incubazione con l'anticorpo anti-SIRT1 policlonale di coniglio (Cell Signaling)

diluito 1:100 in blocking solution e tenuto overnight a 4°C. Dopo l'incubazione con il primario sono stati eseguiti 3 lavaggi di 5 minuti ciascuno in PBS. È stato utilizzato l'anticorpo secondario specifico per la detection, anti-rabbit AlexaFluor 532 (Invitrogen) e DAPI (Invitrogen), quest'ultimo utilizzato per la marcatura nucleare delle cellule. I vetrini sono stati montati in *Prolong Gold antifade medium (Invitrogen)* e le immagini sono state acquisite con microscopio a fluorescenza Leica CTR 6000.

### 5.3 ESTRAZIONE DI PROTEINE TOTALI DA TESSUTI

Lavorando in ghiaccio secco, con l'uso di un bisturi freddo si tagliano i piccoli frammenti di tessuto che vengono incubati con un buffer di lisi (*Ripa Buffer*) addizionato ad un cocktail di inibitori proteasici (1%) e fosfatasi (1%), in un volume di circa 10 µl per mg di campione. Si procede, sempre in ghiaccio, con una degradazione meccanica del tessuto con l'uso di un pestello e facendo attenzione a non produrre bolle e poi si lasciano i campioni a -80°C per almeno un'ora. Successivamente si procede centrifugando i campioni a temperatura ambiente per 10 minuti a 12000 RPM; il supernatante formatosi contenente le proteine di interesse è stato recuperato. A questo punto si procede con il dosaggio delle proteine con metodo Bradford, valutando la loro concentrazione in rapporto ad una curva di taratura ottenuta variando la concentrazione di BSA "*Serum Bovine Albumine*".

### 5.4 WESTERN BLOT

Quaranta µg di estratti proteici nucleari, mitocondriali o totali, una volta quantizzati con metodo Bradford, sono stati denaturati a 70°C per 5 minuti, sottoposti a SDS-PAGE Elettroforesi su un gel al 10%, e trasferiti (*electroblotting*) su una membrana in PVDF, precedentemente attivata con metanolo o nitrocellulosa. La membrana è stata poi incubata in 5% di latte (FLUKA Sigma) in PBST (Phosphate Buffered Saline + Tween20 allo 0,05%) per il bloccaggio dei siti aspecifici. Gli anticorpi primari IgG policlonali anti-Sirt1 (Upstate) di coniglio, anti-p53 (S.Cruz) monoclonali di

coniglio; anti- $\alpha$ Tubulina (Cosmo Bio LTD, Japan) monoclonale di topo, GAPDH (Millipore) di coniglio, anti-Acetil-lisina (Abcam) di coniglio con diluizione 1:1000, ( 1:5000, esclusivamente per il GAPDH) sono stati incubati overnight a 4°C in blocking buffer. Dopo 2 lavaggi in PBST la membrana è stata incubata con anticorpo secondario specifico per la specie del primario (1:2000), coniugato con perossidasi (HRP) per 1h in blocking buffer a temperatura ambiente. La rilevazione delle proteine di interesse è stata eseguita con il sistema di chemiluminescenza ECL-plus (Amersham; Arlington Heights, IL) ed analizzati mediante il sistema Image Quant (Amersham).

## 5.5 PROTEOMICA: 2D DIGE

Il termine “proteoma” è stato coniato da Mark Wilkins nel 1995 per descrivere l’insieme delle proteine codificate dal genoma di un lato organismo. Una delle tecniche che permettono di studiarlo con ottime performans è la DIGE-2D (*Two Dimensional Differential In Gel Electrophoresis*) è una tecnica proteomica quantitativa che consente la separazione, all’interno dello stesso gel bidimensionale, di 2 o più campioni proteici pre-marcati. La marcatura viene effettuata usando fluorofori della famiglia delle cianine, denominati Cy2, Cy3 e Cy5, che hanno lunghezze d’onda d’eccitazione e di emissione diverse. Essi sono molecole che contengono un gruppo estere N-idrossisuccinilico, che è in grado di formare legami covalenti con il carbonio  $\epsilon$  del gruppo amminico delle lisine senza modificare le proprietà chimico-fisiche delle proteine stesse. Il primo vantaggio derivato dall’introduzione dei fluorofori è che due campioni, marcati con due fluorofori differenti, possono essere fatti migrare all’interno di uno stesso gel. Il secondo è l’introduzione dello standard interno. Quest’ultimo viene preparato miscelando quantità uguali di ogni estratto proteico facente parte del disegno sperimentale, che viene poi marcato con un fluoroforo e fatto migrare unitamente a ciascun campione marcato con un fluoroforo differente. Questo permette, nella successiva fase di analisi, di effettuare una normalizzazione

degli spot proteici per eliminare le eventuali variazioni sperimentali ed evidenziare quelle che sono le reali variazioni biologiche.

#### 5.5.1 Estrazione proteica

L'obiettivo dell'estrazione proteica è quello di raggiungere il maggior grado di solubilizzazione, disaggregazione, denaturazione e riduzione delle proteine contenute nel campione biologico. Essa consiste nella lisi cellulare e nella solubilizzazione delle proteine. La lisi cellulare favorisce la distruzione delle cellule mediante tecniche meccaniche come la sonicazione. Mentre la solubilizzazione delle proteine avviene aggiungendo al campione proteico un opportuno tampone di lisi. I reagenti contenuti nel tampone sono Urea e Tiourea, agenti denaturanti responsabili della rottura dei legami idrogeno e il CHAPS, detergente zwitterionico che solubilizza le proteine idrofobiche e minimizza l'aggregazione proteica. Considerando la limitata variabilità interindividuale dei topi provenienti dalla medesima nidiata e cresciuti in condizioni standardizzate, i campioni sono stati uniti in pool in base al loro gruppo di appartenenza e solubilizzati in lysis buffer per 2D-DIGE (7 M Urea, 2 M Tiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris, 1mM PMSF, pH 8.5) in rapporto di 6 µl per mg di tessuto. Per assicurare la completa solubilizzazione delle proteine, i frammenti di tessuto sono stati disgregati mediante 3 cicli di sonicazione a immersione, mantenendo la soluzione in ghiaccio. Gli estratti sono stati centrifugati una prima volta per 20 min a 12000 g a 20 °C, per eliminare l'eventuale materiale non solubilizzato. Il surnatante è stato prelevato, sottoposto a 3 ulteriori cicli di sonicazione e ricentrifugato a 16000 g per 40 min. Il surnatante così ottenuto è stato conservato a -80 °C per le analisi successive.

#### 5.5.2 Preparazione dei campioni alla marcatura

La 2D-DIGE è basata sulla marcatura degli estratti proteici prima della separazione bidimensionale. Perché questo passaggio avvenga correttamente è necessario controllare il pH dell'estratto e misurarne la concentrazione proteica. La solubilizzazione delle proteine tende ad

acidificare il tampone di lisi, perciò il pH degli estratti è stato misurato mediante l'impiego di cartine tornasole (Sigma-Aldrich) e riportato tra 8 e 9 mediante l'aggiunta di NaOH 1 M. La concentrazione proteica è stata determinata mediante il kit PlusOne 2-D Quant Kit (GE Healthcare). La procedura prevista dal kit si basa su una precipitazione quantitativa delle proteine solubilizzate eliminando le

sostanze interferenti che invece rimangono in soluzione, quali detergenti, riducenti, anfoline, Urea e Tiourea. Le proteine precipitate sono risospese in una soluzione contenente ioni rame in grado di legarsi in maniera specifica alle molecole proteiche. Gli ioni rame rimasti liberi in soluzione reagiscono con una seconda soluzione (Working color reagent) con lo sviluppo di colore che risulta essere inversamente proporzionale alla quantità di proteina contenuta. La concentrazione proteica del campione viene ottenuta per confronto con i valori di assorbanza di una apposita curva standard creata con quantità crescenti di una soluzione di BSA a concentrazione nota.

### 5.5.3 Marcatura dei campioni

In questo lavoro si è adottato un protocollo quantitativo per la marcatura chiamato Minimal Labeling, in cui il fluoroforo si lega al 1-2% delle lisine disponibili e solo ad una lisina per molecola proteica. Sono stati utilizzati due fluorofori (CyDye DIGE, GE Healthcare): Cy3 per la marcatura dello standard interno e Cy5 i singoli campioni. I fluorofori vengono forniti liofilizzati e devono essere ricostituiti in DMF in modo tale da ottenere una concentrazione di CyDye pari a 1 mM (stock solution). A partire dalla stock solution è stata preparata una soluzione di CyDye 400 mM (working solution): ciascun  $\mu\text{l}$  di working solution contiene 400 pmoli di CyDye sufficienti per marcare 50  $\mu\text{g}$  di estratto proteico. Per ogni campione sono stati marcati 150  $\mu\text{g}$  di proteine con il Cy5 e 150  $\mu\text{g}$  di proteine con il Cy3, per separare ogni estratto in triplicato. La reazione di marcatura è stata effettuata per 30 minuti in ghiaccio, al buio e bloccata con L-Lisina 10 mM. Dopo l'aggiunta della lisina, i campioni sono stati lasciati 10 minuti in ghiaccio al buio e

successivamente è stato aggiunto un volume di 2X sample buffer (Urea 8 M, DTT 130 mM, CHAPS 4%, anfoline pH 3-10 1%).

#### 5.5.4 Prima dimensione: isoelettrofocalizzazione

L'isoelettrofocalizzazione (IEF) è un metodo elettroforetico ad alta risoluzione che separa le proteine in base al loro punto isoelettrico (pI). Questa è stata effettuata su IPG strip (Immobiline Dry Strip Gel, GE Healthcare), strisce di gel disidratate di acrilamide e bisacrilamide (T=4% C=3%) co-polimerizzate su un supporto in plastica con un'apposita miscela di immobiline che formano il gradiente di pH (le strips utilizzate hanno un gradiente di pH 3-10 non lineare e sono lunghe 24 cm). Prima dell'uso le strips devono essere reidratate con un tampone di reidratazione (Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 2%, DTT 65 mM, anfoline 0.5%, e blu di bromofenolo) al quale vengono aggiunti 40 µg di campione marcato con Cy5 e 40 µg di standard interno marcato con Cy3. L'isoelettrofocalizzazione viene condotta sull'IPGphor (GE Healthcare) a voltaggi molto elevati (fino a 8000 V) e correnti molto basse (fino ad un massimo di 50 µA per IPG strip). Gli strip holder sono appositi contenitori in ceramica che hanno ad ogni estremità un elettrodo, in ognuno di essi viene alloggiata una strip; grazie al contatto del gel con gli elettrodi è possibile condurre l'isoelettrofocalizzazione. Il protocollo di IEF utilizzato è mostrato in Tabella 6. La corsa è suddivisa in 9 step e viene condotta a 20°C, fino al raggiungimento di 75000 Volt ora totali.

Step	Voltaggio (V)	Tempo (h)
Reidratazione	30	6
Reidratazione	60	6
I Step	200	1
II Step	500	1
III Step	1000	1.5
IV Step	2000	1.5
V Step	3000	1.5
VI Step	3000-8000	4
VII Step	8000	7*

Tab. 6 Protocollo utilizzato per l'isoelettrofocalizzazione. (\*) La corsa viene fermata quando si raggiungono gli 75000 volt-ora totali.

#### 5.5.5 Equilibratura delle strips

Al termine della separazione isoelettroforetica le strips vengono equilibrate allo scopo di ridurre i ponti disolfuro con un agente riducente (ditiotreitolo, DTT), di alchilare i gruppi sulfidrilici, bloccandoli definitivamente. con un agente alchilante (iodoacetamide) e di rivestire le proteine di cariche negative (mediante dodecilsolfato di sodio, SDS). L'equilibratura delle strips prevede due passaggi: nel primo le *strip* vengono messe a contatto con il tampone di equilibratura contenete DTT 65 mM per 15 minuti, nel secondo con il tampone di equilibratura contenete iodoacetamide 135 mM per 8 minuti. Il tampone di equilibratura è composto da Urea 6 M, glicerolo 20%, 375 mM Tris HCl pH 8.8, SDS 2%. L'urea, insieme al glicerolo, riduce l'effetto di elettroendosmosi che interferirebbe con il trasferimento in seconda dimensione delle proteine. La quantità di SDS che si lega alle proteine è proporzionale alla loro massa, in modo che la separazione elettroforetica delle proteine in presenza di SDS avvenga in base alla massa molecolare. L'SDS denatura le proteine e le riveste di cariche negative consentendo la loro migrazione verso l'anodo. I passaggi d'equilibratura vengono

condotti in agitazione moderata su un apposito apparecchio, l'*Immobiline Dry Strip Reswelling Tray* (GE Healthcare).

#### 5.5.6 Seconda dimensione: SDS-PAGE

La seconda dimensione consiste in un'elettroforesi su gel di poliacrilammide condotta in presenza di SDS, in cui le proteine migrano sulla base della loro massa molecolare. Per effettuarla è stato utilizzato il sistema verticale *Ettan Dalt twelve* (GE Healthcare), che permette la separazione contemporanea di 12 gel. I gel (25 x 20 cm), aventi lo spessore di 1 mm, sono stati polimerizzati contemporaneamente in un'apposita camera di polimerizzazione (*Ettan Dalt II gel caster*, GE Healthcare). La soluzione di *Running gel* è costituita da 12% Acrilamide/Bisacrilamide a partire da una *soluzione stock* 40% T, 2.5% C, Tris HCl 375 mM, pH 8.8, acqua ultrapura fino a volume. La miscela viene degasata per 20 minuti per favorire l'eliminazione dell'ossigeno che interferirebbe con la polimerizzazione del gel. Infine sono stati aggiunti iniziatore e catalizzatore della polimerizzazione: rispettivamente APS (ammonio persolfato) e TEMED (N,N,N,N'-tetramethylethylene-diamine) con concentrazioni finali rispettivamente pari a 0.5% e 0.03%. Dopo l'equilibratura, le strips vengono tamponate con carta da filtro per eliminare la soluzione di equilibratura in eccesso. Con una pipetta *Pasteur* viene depositata una soluzione di agarosio allo 0.5% in tampone di corsa sulla sommità del gel, per poter far aderire le strips orizzontalmente al gel di seconda dimensione. La seconda dimensione viene condotta in tampone di corsa per SDS-PAGE (Tris HCl 25 mM, glicina 0.192 M, SDS 0.1%).

#### 5.5.7 Acquisizione delle immagini

L'acquisizione delle immagini consiste nella scansione dei gel con un particolare scanner a doppio raggio laser (*Typhoon 9200 variable mode imager*, GE Healthcare). Lo scanner acquisisce due immagini per ciascun gel, una per lo standard interno marcato con Cy3 e l'altra per il campione marcato con Cy5. Le proteine marcate con il Cy3 sono state

visualizzate utilizzando il laser verde (532 nm) con filtro di emissione a 580 BP, quelle marcate con Cy5 con laser rosso (633 nm) con filtro di emissione a 670 BP. Inoltre è stato impostato il parametro PMT (fotomoltiplicatore), il quale permette di controllare la saturazione delle macchie proteiche visualizzate sulla mappa (la risoluzione è stata impostata a 100 micron). Prima dell'analisi le immagini sono state tagliate, al fine di eliminare le aree estranee, utilizzando il programma *ImageQuant* (GE Healthcare).

#### **6.2.8 Analisi delle immagini**

L'analisi d'immagine viene effettuata utilizzando un software (*DeCyder software*, GE Healthcare), creato appositamente per studiare l'espressione proteica differenziale di campioni marcati con fluorofori. Il software è caratterizzato da un particolare algoritmo, in grado di effettuare la codetection di campioni differenzialmente marcati e separati all'interno dello stesso gel. Le operazioni di *detection*, sottrazione del *background*, quantizzazione, normalizzazione e *inter-gel matching* avvengono in modo completamente automatico, o in ogni caso con un minimo intervento dell'operatore. Il programma si avvale dei seguenti moduli per analizzare i gel di un esperimento:

- Imager Loader;
- DIA (*Differential In-gel Analysis*);
- BVA (*Biological Variation Analysis*);
- Batch Processor;
- EDA (*Extended Data Analysis*).

Le immagini dei gel vengono importate nel *DeCyder 2D database* mediante l'utilizzo dell'apposito modulo *Image Loader*.

#### **5.5.8 Il modulo DIA (Differential In-gel Analysis)**

Il modulo DIA consente di effettuare: il riconoscimento (*spot detection*), la quantizzazione, la sottrazione del *background* e la normalizzazione delle macchie proteiche. Lo *spot detection* definisce il contorno delle macchie proteiche e ne misura

area, altezza, volume e pendenza. Il volume di ogni macchia proteica corrisponde alla somma dell'intensità dei pixel che si trovano all'interno dei confini di ciascuna macchia. Il modulo ne calcola inoltre l'abbondanza espressa come rapporto tra il volume della macchia marcata con Cy5 e la rispettiva marcata con Cy3 (*standard interno*). Il software sottrae al volume di ogni macchia il valore di *background* che consiste nel più basso valore di decimo percentile dei pixel presenti sul confine di ogni macchia. Lo *spot detection* viene effettuata in modo automatico dal software, questo comporta che impurità non proteiche dovute all'eterogeneità del gel e aree molto piccole non contenenti spot vengano invece considerate come spot. Questi ultimi possono essere rimosse applicando particolari filtri raggruppati nella funzione *Exclude Filter* (*Max slope* > 1.2, *Volume* < 15000, *Peak height* < 30 e > 100000).

#### 5.5.9 Il modulo BVA (Biological Variation Analysis)

Il modulo BVA permette di eseguire: il *Matching* multiplo tra gel, la comparazione e l'analisi statistica delle abbondanze proteiche tra i gruppi sperimentali per la rilevazione di spot significativamente variate. Viene scelto, automaticamente o dall'operatore, un gel chiamato *Master Gel*, che contiene il maggior numero di macchie proteiche. Tutti i gel dell'esperimento sono poi confrontati con il master gel, in modo che ciascuna macchia di ciascun gel risulti associata alla corrispondente macchia nel *Master Gel* (*Gel Matching*). Se la migrazione della macchia in gel diversi non dovesse risultare identica, è possibile utilizzare la funzione *landmarking* per associare manualmente le macchie e garantire l'accuratezza del *gel-to-gel matching*. Infine viene effettuato manualmente un controllo per eliminare eventuali errori nel *matching* (*mismatch*). Il modulo *Batch Processor* implementa le funzioni dei moduli DIA e BVA svolgendo in modo completamente automatizzato lo *spot detection*, la quantizzazione ed il *matching* delle macchie.

#### 5.5.10 Il modulo EDA (Extended Data Analysis)

Il modulo EDA permette di analizzare un insieme ampio e complesso di dati derivanti da studi proteomici. Attraverso l'applicazione di diversi test statistici e di sofisticati metodi di *clustering*, permette di effettuare analisi a più variabili sui dati d'espressione proteica derivanti dal modulo BVA, raggruppandoli secondo modelli comuni d'espressione. È suddiviso in tre parti chiamate *Setup*, *Calculation* e *Results*. Nella fase di *Setup* vengono importati i dati dal BVA, i gel importati vengono assegnati ad un gruppo sperimentale. Con questi dati viene creato il *Base set* che rappresenta l'insieme dei dati sui quali si baseranno le analisi successive. I parametri applicati per la creazione del *Base set* sono: *% of spot maps where protein is present > 90*, per includere solo le macchie presenti nel 90% dei gel, e *Remove unassigned spot maps*, per eliminare i gel che non sono stati assegnati ad alcun gruppo sperimentale. Nella seconda fase, quella di *Calculation*, vengono impostate le analisi statistiche che si desiderano eseguire sul *Base set*. Le analisi statistiche sono di tre tipologie: *Differential expression analysis*, *Principal components analysis* e *Hierarchical clustering*. I risultati ottenuti da queste analisi possono essere visualizzati nella sezione *Results*. In questo lavoro è stata utilizzata la funzione *Differential expression analysis* che permette di eseguire lo *Student's T-test* per determinare le macchie differenzialmente espresse tra i gruppi sperimentali. Come livello di significatività statistica è stato scelto 0,01 (*p value*). Il software fornisce inoltre una misura quantitativa dell'entità della variazione, *Average Ratio* (o *Fold change*). È stata inoltre applicata la *Principal components analysis* (PCA) per visualizzare la distribuzione dei gel e delle macchie proteiche del disegno sperimentale, favorendo così l'identificazione eventuali *outliers*. La PCA è infatti un calcolo utilizzato nell'ambito della statistica multivariata che ha lo scopo di semplificare le complesse variabili caratteristiche di un sistema, proiettandole in un nuovo sistema cartesiano dove vengono ordinate in

ordine decrescente di varianza. In questo nuovo sistema cartesiano, la nuova variabile con la maggiore varianza viene proiettata sul primo asse (PCA1), la seconda per dimensione di varianza, sul secondo asse (PCA2) e così via.

#### 5.5.11 Identificazione delle proteine

L'identificazione degli spot proteici viene effettuata mediante allestimento di gel preparativi e comporta: la separazione bidimensionale in gel, la colorazione con colorante, l'escissione delle macchie proteiche e l'identificazione mediante spettrometria di massa MALDI delle proteine contenute nei frammenti di gel. Dalle mappe preparative, oltre alle macchie risultate variate dall'analisi 2D-DIGE, vengono prelevate la maggior parte delle macchie visibili con la colorazione per creare una *mappa standard* del tessuto in esame.

### 5.6 MODELLI MURINI

- **Modello sperimentale di Hight Fat Diet (HFD)**; Il protocollo sperimentale prevede l'utilizzo di una dieta normale e una HFD e la somministrazione di PM10. I gruppi sperimentali utilizzati sono stati 4: un gruppo in Normal Diet (ND), un gruppo in Hight Fat Diet (HFD), un gruppo in ND trattato con PM10 ed un gruppo in HFD trattato con PM10. I topi, C57BL/6N, di 4 settimane sono stati sottoposti ad una dieta ad alto contenuto calorico (HFD) della Harlan Laboratories in formato di pellet contenenti 4.5 Kcal/g, con il 21% di grassi provenienti dal latte, con il 42 % delle Kcal provenienti dal grasso per 12 settimane al fin di ottenere un modello di NASH (steatoepatite su base non alcolica). Il numero di animali da utilizzare ai fini sperimentali è stato ridotto al numero minimo necessario per garantire il raggiungimento della significatività statistica. In considerazione della letteratura disponibile e utilizzando come parametri del calcolo  $p \leq 0.05$  e potenza 90%, questo numero è stato calcolato in 6 animali per gruppo sperimentale; questo numero è stato determinato sulla base della variabilità di risposta fenotipica indotta dai trattamenti e tutti gli esperimenti sugli animali sono stati condotti in

accordo con le norme etiche istituzionali. Per questi gruppi di animali abbiamo creato 4 diversi modelli chirurgici sperimentali

- **Modello sperimentale di danno epatico da CCl<sub>4</sub> (modello acuto e cronico)**; dopo un periodo di acclimatazione di 7 giorni è stato indotto il danno somministrando a livello intraperitoneale tetracloruro di carbonio (CCl<sub>4</sub>) in olio minerale, alla concentrazione di 0.1ml/Kg (119). 6h prima dell'induzione del danno abbiamo somministrato attraverso gavage l'inibitore di Sirt1, EX527 (6-Cloro-2,3,4,9-tetraidro-1H-carbazol-1-carbossammide) e la somministrazione è continuata ogni giorno per tutta la durata della sperimentazione. Per il gruppo di animali trattati con PM10, ne abbiamo invece sospeso la somministrazione per via IP, in quanto troppo invasiva per la salute dell'animale. I topi sono stati sacrificati previa anestesia, campioni di fegato sono stati raccolti e conservati in formalina o a -80C.

- **Modello sperimentale di danno dell'albero biliare attraverso BDL "Legatura del dotto biliare principale"**; la legatura è stata effettuata su topi di 4-6 settimane che sono stati sottoposti alla legatura della via biliare principale (BDL) per 2 settimane come da procedura descritta in letteratura (120). I topi sono stati suddivisi poi in due gruppi: uno di controllo che ha ricevuto ogni 48 ore, il veicolo (Sodio Carbossi-metil cellulosa), e un gruppo è stato trattato con "ex527", inibitore di SIRT1 somministrato in quantità di 30 mg/Kg. Dopo 6 somministrazioni suddivise in 2 settimane i topi sono stati sacrificati ed è stato effettuato il prelievo del fegato per le successive analisi sperimentali;

- **Modello ortotopico singenico**; sono stati usati topi maschi C57/BL6 (HARLAN) di quattro settimane di età. Gli animali sono stati mantenuti in un ciclo luce/buio di 12 ore ricevendo cibo e acqua ad libitum. Dopo aver anestetizzato i topi con Avertin, abbiamo impiantato 2000000 di cellule HEPA1-6 tramite procedura laparoscopica nella regione sottocapsulare del lobo sinistro del fegato dell'animale. Gli animali del secondo modello

sperimentale (PM10) hanno invece ricevuto il particolato per via IP trascorsi tre giorni dall'intervento e per le 2 settimane successive. Al termine di questo periodo di tempo gli animali di entrambi i modelli sperimentali sono stati soppressi e al momento del sacrificio sono state misurate le lesioni macroscopiche visibili sulla superficie del fegato utilizzando un calibro di riferimento. Sono stati quantificati sia il numero che le dimensioni delle lesioni e ne sono stati prelevati gli organi per le successive analisi.

#### **5.6.1 Analisi delle masse tumorali**

Al momento del sacrificio sono state misurate le lesioni macroscopiche visibili sulla superficie del fegato utilizzando un calibro. Sono stati quantificati sia il numero che le dimensioni delle lesioni. Successivamente il tessuto epatico è stato fissato in paraformaldeide al 10% e incluso in paraffina: sono state ottenute sezioni epatiche di 5 µm da quattro differenti regioni del lobo sinistro distanti tra loro almeno 2 mm; sono state poi colorate con H&E, ed è stata infine quantificata l'area della superficie tumorale e sana (BIOQUANT NOVA PRIME Measurement Software).

#### **5.6.2 Analisi statistiche**

I dati sono stati espressi come media  $\pm$ SD. Il test t di student è stato calcolato per comparare i vari gruppi sperimentali. Le differenze vengono considerate statisticamente significative se  $p < 0,05$ . Le analisi sono state condotte usando il pacchetto statistico R.

## ..Ringraziamenti..

*In questi anni di lavoro nel Dipartimento di Gastroenterologia ho trovato dei colleghi, anzi meglio dire degli Amici splendidi che mi hanno “ubriacato” con la loro voglia di conoscenza, senza la quale la Ricerca non avrebbe senso. Li vorrei ringraziare uno ad uno perché in questi anni hanno condiviso con me la propria vita e le proprie conoscenze ed io, nel mio piccolo, voglio condividere con loro questo traguardo...*

*Grazie...*

*Mirko Tarocchi*

*Simone Polvani*

*Sara Tempesti*

*Andrea Galli*

*Elisabetta Ceni*

*Tommaso Mello*

*Lucia Picariello*

*Barbara Orsini*

*Vi porterò sempre nel cuore..*



## 6 BIBLIOGRAFIA

---

1. Georges-Labouesse EN, George EL, Rayburn H, Hynes RO. Mesodermal development in mouse embryos mutant for fibronectin. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 1996;207(2):145-56.
2. Naito M, Hasegawa G, Takahashi K. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microscopy research and technique*. 1997;39(4):350-64.
3. Mrass P, Weninger W. Immune cell migration as a means to control immune privilege: lessons from the CNS and tumors. *Immunological reviews*. 2006;213:195-212.
4. Seki S, Habu Y, Kawamura T, Takeda K, Dobashi H, Ohkawa T, et al. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. *Immunological reviews*. 2000;174:35-46.
5. Van Rooijen N, Kors N, vd Ende M, Dijkstra CD. Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell and tissue research*. 1990;260(2):215-22.
6. Fabriek BO, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology*. 2005;210(2-4):153-60.
7. Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Advances in experimental medicine and biology*. 1985;186:409-19.
8. Schaller E, Macfarlane AJ, Rupec RA, Gordon S, McKnight AJ, Pfeffer K. Inactivation of the F4/80 glycoprotein in the mouse germ line. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(22):8035-43.
9. Sleyster EC, Knook DL. Relation between localization and function of rat liver Kupffer cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1982;47(5):484-90.
10. Bouwens L, Baekeland M, De Zanger R, Wisse E. Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology*. 1986;6(4):718-22.
11. Hoedemakers RM, Morselt HW, Scherphof GL, Daemen T. Heterogeneity in secretory responses of rat liver macrophages of different size. *Liver*. 1995;15(6):313-9.
12. Roberts SK, Ludwig J, Larusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Gastroenterology*. 1997;112(1):269-79.
13. Kanno N, LeSage G, Glaser S, Alvaro D, Alpini G. Functional heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *Hepatology*. 2000;31(3):555-61.
14. Alpini G, Lenzi R, Sarkozi L, Tavoloni N. Biliary physiology in rats with bile ductular cell hyperplasia. Evidence for a secretory function of proliferated bile ductules. *The Journal of clinical investigation*. 1988;81(2):569-78.
15. Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*. 2004;39(6):1739-45.
16. Alvaro D, Alpini G, Onori P, Franchitto A, Glaser SS, Le Sage G, et al. Alfa and beta estrogen receptors and the biliary tree. *Molecular and cellular endocrinology*. 2002;193(1-2):105-8.

17. Alvaro D, Mancino MG, Glaser S, Gaudio E, Marzioni M, Francis H, et al. Proliferating cholangiocytes: a neuroendocrine compartment in the diseased liver. *Gastroenterology*. 2007;132(1):415-31.
18. Popper H, Kent G, Stein R. Ductular cell reaction in the liver in hepatic injury. *Journal of the Mount Sinai Hospital, New York*. 1957;24(5):551-6.
19. Lesage G, Glaser SS, Gubba S, Robertson WE, Phinizy JL, Lasater J, et al. Regrowth of the rat biliary tree after 70% partial hepatectomy is coupled to increased secretin-induced ductal secretion. *Gastroenterology*. 1996;111(6):1633-44.
20. Vacanti JP, Folkman J. Bile duct enlargement by infusion of L-proline: potential significance in biliary atresia. *Journal of pediatric surgery*. 1979;14(6):814-8.
21. Alvaro D, Gigliozzi A, Attili AF. Regulation and deregulation of cholangiocyte proliferation. *Journal of hepatology*. 2000;33(2):333-40.
22. Slott PA, Liu MH, Tavoloni N. Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology*. 1990;99(2):466-77.
23. LeSage GD, Benedetti A, Glaser S, Marucci L, Tretjak Z, Caligiuri A, et al. Acute carbon tetrachloride feeding selectively damages large, but not small, cholangiocytes from normal rat liver. *Hepatology*. 1999;29(2):307-19.
24. Desmet VJ. Current problems in diagnosis of biliary disease and cholestasis. *Seminars in liver disease*. 1986;6(3):233-45.
25. Petropoulos CJ, Yaswen P, Panzica M, Fausto N. Cell lineages in liver carcinogenesis: possible clues from studies of the distribution of alpha-fetoprotein RNA sequences in cell populations isolated from normal, regenerating, and preneoplastic rat livers. *Cancer research*. 1985;45(11 Pt 2):5762-8.
26. Sirica AE, Cihla HP. Isolation and partial characterizations of oval and hyperplastic bile ductular cell-enriched populations from the livers of carcinogen and noncarcinogen-treated rats. *Cancer research*. 1984;44(8):3454-66.
27. Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(24):8681-5.
28. Wake K, Motomatsu K, Dan C, Kaneda K. Three-dimensional structure of endothelial cells in hepatic sinusoids of the rat as revealed by the Golgi method. *Cell and tissue research*. 1988;253(3):563-71.
29. Gressner AM, Lotfi S, Gressner G, Lahme B. Identification and partial characterization of a hepatocyte-derived factor promoting proliferation of cultured fat-storing cells (parasinusoidal lipocytes). *Hepatology*. 1992;16(5):1250-66.
30. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Seminars in liver disease*. 2001;21(3):311-35.
31. Tsutsumi M, Takada A, Takase S. Characterization of desmin-positive rat liver sinusoidal cells. *Hepatology*. 1987;7(2):277-84.
32. Niki T, Pekny M, Hellemans K, Bleser PD, Berg KV, Vaeyens F, et al. Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 1999;29(2):520-7.
33. Buniatian G, Gebhardt R, Schrenk D, Hamprecht B. Colocalization of three types of intermediate filament proteins in perisinusoidal stellate cells: glial fibrillary acidic protein as a new cellular marker. *European journal of cell biology*. 1996;70(1):23-32.
34. Neubauer K, Knittel T, Aurisch S, Fellmer P, Ramadori G. Glial fibrillary acidic protein--a cell type specific marker for Ito cells in vivo and in vitro. *Journal of hepatology*. 1996;24(6):719-30.

35. Friedman SL, Wei S, Blaner WS. Retinol release by activated rat hepatic lipocytes: regulation by Kupffer cell-conditioned medium and PDGF. *The American journal of physiology*. 1993;264(5 Pt 1):G947-52.
36. Senoo H, Sato M, Imai K. Hepatic stellate cells--from the viewpoint of retinoid handling and function of the extracellular matrix. *Kaibogaku zasshi Journal of anatomy*. 1997;72(2):79-94.
37. Maher JJ, McGuire RF. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 1990;86(5):1641-8.
38. Schmitt-Graff A, Kruger S, Bochard F, Gabbiani G, Denk H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. *The American journal of pathology*. 1991;138(5):1233-42.
39. Badid C, Mounier N, Costa AM, Desmouliere A. Role of myofibroblasts during normal tissue repair and excessive scarring: interest of their assessment in nephropathies. *Histology and histopathology*. 2000;15(1):269-80.
40. Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell*. 1999;96(5):737-49.
41. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *Journal of hepatology*. 2003;38 Suppl 1:S38-53.
42. Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Seminars in liver disease*. 1999;19(2):129-40.
43. Orrego H, Medline A, Blendis LM, Rankin JG, Kreaden DA. Collagenisation of the Disse space in alcoholic liver disease. *Gut*. 1979;20(8):673-9.
44. Tsutsumi M, Urashima S, Matsuda Y, Takase S, Takada A. Changes in type IV collagen content in livers of patients with alcoholic liver disease. *Hepatology*. 1993;17(5):820-7.
45. Lietard J, Loreal O, Theret N, Campion JP, L'Helgoualc'h A, Turlin B, et al. Laminin isoforms in non-tumoral and tumoral human livers. Expression of alpha1, alpha2, beta1, beta2 and gamma1 chain mRNA and an alpha chain homologous to the alpha2 chain. *Journal of hepatology*. 1998;28(4):691-9.
46. Musso O, Rehn M, Saarela J, Theret N, Lietard J, Hintikka, et al. Collagen XVIII is localized in sinusoids and basement membrane zones and expressed by hepatocytes and activated stellate cells in fibrotic human liver. *Hepatology*. 1998;28(1):98-107.
47. Friedman SL. Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver. *Seminars in liver disease*. 1990;10(1):20-9.
48. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(4):2247-50.
49. Ueberham E, Low R, Ueberham U, Schonig K, Bujard H, Gebhardt R. Conditional tetracycline-regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis. *Hepatology*. 2003;37(5):1067-78.
50. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology*. 2002;36(4 Pt 1):850-60.
51. Marra F, Choudhury GG, Pinzani M, Abboud HE. Regulation of platelet-derived growth factor secretion and gene expression in human liver fat-storing cells. *Gastroenterology*. 1994;107(4):1110-7.
52. Safadi R, Ohta M, Alvarez CE, Fiel MI, Bansal M, Mehal WZ, et al. Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 cells and attenuation by transgenic interleukin-10 from hepatocytes. *Gastroenterology*. 2004;127(3):870-82.

53. Sahai A, Malladi P, Melin-Aldana H, Green RM, Whittington PF. Upregulation of osteopontin expression is involved in the development of nonalcoholic steatohepatitis in a dietary murine model. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2004;287(1):G264-73.
54. Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Lora JM, Al-Garawi A, Sole M, et al. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology*. 2003;125(1):117-25.
55. Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *Journal of hepatology*. 2001;35(2):297-306.
56. Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, et al. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology*. 1997;25(2):361-7.
57. Casini A, Cunningham M, Rojkind M, Lieber CS. Acetaldehyde increases procollagen type I and fibronectin gene transcription in cultured rat fat-storing cells through a protein synthesis-dependent mechanism. *Hepatology*. 1991;13(4):758-65.
58. Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, et al. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut*. 2004;53(3):438-45.
59. Yu C, Wang F, Jin C, Huang X, Miller DL, Basilico C, et al. Role of fibroblast growth factor type 1 and 2 in carbon tetrachloride-induced hepatic injury and fibrogenesis. *The American journal of pathology*. 2003;163(4):1653-62.
60. Gines P, Cardenas A, Arroyo V, Rodes J. Management of cirrhosis and ascites. *The New England journal of medicine*. 2004;350(16):1646-54.
61. Davis GL, Albright JE, Cook SF, Rosenberg DM. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2003;9(4):331-8.
62. Popper H, Uenfriend S. Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations. *The American journal of medicine*. 1970;49:707-21.
63. Schaffner F, Klion FM. Chronic hepatitis. *Annual review of medicine*. 1968;19:25-38.
64. Milani S, Herbst H, Schuppan D, Hahn EG, Stein H. In situ hybridization for procollagen types I, III and IV mRNA in normal and fibrotic rat liver: evidence for predominant expression in nonparenchymal liver cells. *Hepatology*. 1989;10(1):84-92.
65. Kinnman N, Housset C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2002;7:d496-503.
66. Suskind DL, Muench MO. Searching for common stem cells of the hepatic and hematopoietic systems in the human fetal liver: CD34+ cytokeratin 7/8+ cells express markers for stellate cells. *Journal of hepatology*. 2004;40(2):261-8.
67. Higuchi H, Gores GJ. Mechanisms of liver injury: an overview. *Current molecular medicine*. 2003;3(6):483-90.
68. Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology*. 2004;39(2):273-8.
69. Vinas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Berenguer C, Enrich C, et al. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology*. 2003;38(4):919-29.
70. Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Seminars in liver disease*. 2001;21(3):417-26.

71. Shi Z, Wakil AE, Rockey DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(20):10663-8.
72. Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T. Differentiation and function of Kupffer cells. *Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan*. 2004;37(1):16-28.
73. Thurman RG. II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *The American journal of physiology*. 1998;275(4 Pt 1):G605-11.
74. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2002;7:d793-807.
75. Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, Xu L, Wang LH, Lin HC, et al. DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(9):1369-78.
76. Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2002;7:d1899-914.
77. Schwabe RF, Bataller R, Brenner DA. Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2003;285(5):G949-58.
78. Shek FW, Benyon RC. How can transforming growth factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis? *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2004;16(2):123-6.
79. Borkham-Kamphorst E, Stoll D, Gressner AM, Weiskirchen R. Antisense strategy against PDGF B-chain proves effective in preventing experimental liver fibrogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;321(2):413-23.
80. Williams EJ, Benyon RC, Trim N, Hadwin R, Grove BH, Arthur MJ, et al. Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo. *Gut*. 2001;49(4):577-83.
81. Cho JJ, Hocher B, Herbst H, Jia JD, Ruehl M, Hahn EG, et al. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2000;118(6):1169-78.
82. Kamada Y, Tamura S, Kiso S, Matsumoto H, Saji Y, Yoshida Y, et al. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology*. 2003;125(6):1796-807.
83. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *International journal of cancer*. 2001;94(2):153-6.
84. Bosch FX, Ribes J, Borrás J. Epidemiology of primary liver cancer. *Seminars in liver disease*. 1999;19(3):271-85.
85. Raza SA, Clifford GM, Franceschi S. Worldwide variation in the relative importance of hepatitis B and hepatitis C viruses in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *British journal of cancer*. 2007;96(7):1127-34.
86. Wogan GN. Review of the toxicology of tamoxifen. *Seminars in oncology*. 1997;24(1 Suppl 1):S1-87-S1-97.
87. Soini Y, Chia SC, Bennett WP, Groopman JD, Wang JS, DeBenedetti VM, et al. An aflatoxin-associated mutational hotspot at codon 249 in the p53 tumor suppressor gene occurs in hepatocellular carcinomas from Mexico. *Carcinogenesis*. 1996;17(5):1007-12.
88. Mathurin P, Beuzin F, Louvet A, Carrie-Ganne N, Balian A, Trinchet JC, et al. Fibrosis progression occurs in a subgroup of heavy drinkers with typical histological features. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2007;25(9):1047-54.

89. Loeb LA, James EA, Waltersdorff AM, Klebanoff SJ. Mutagenesis by the autoxidation of iron with isolated DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(11):3918-22.
90. Polio J, Enriquez RE, Chow A, Wood WM, Atterbury CE. Hepatocellular carcinoma in Wilson's disease. Case report and review of the literature. *Journal of clinical gastroenterology*. 1989;11(2):220-4.
91. Ioannou GN, Splan MF, Weiss NS, McDonald GB, Beretta L, Lee SP. Incidence and predictors of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2007;5(8):938-45, 45 e1-4.
92. Chiamonte M, Stroffolini T, Vian A, Stazi MA, Floreani A, Lorenzoni U, et al. Rate of incidence of hepatocellular carcinoma in patients with compensated viral cirrhosis. *Cancer*. 1999;85(10):2132-7.
93. Kojiro M. Histopathology of liver cancers. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2005;19(1):39-62.
94. Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Seminars in liver disease*. 2005;25(2):181-200.
95. Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology*. 1999;30(6):1434-40.
96. Ng KK, Vauthey JN, Pawlik TM, Lauwers GY, Regimbeau JM, Belghiti J, et al. Is hepatic resection for large or multinodular hepatocellular carcinoma justified? Results from a multi-institutional database. *Annals of surgical oncology*. 2005;12(5):364-73.
97. Blander G, Guarente L. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annual review of biochemistry*. 2004;73:417-35.
98. Borra MT, Smith BC, Denu JM. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(17):17187-95.
99. Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(10):4623-35.
100. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*. 2004;303(5666):2011-5.
101. Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Aoyama H, Yoshimochi K, Fukamizu A. Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(32):11278-83.
102. Sebastian C, Satterstrom FK, Haigis MC, Mostoslavsky R. From sirtuin biology to human diseases: an update. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(51):42444-52.
103. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, et al. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*. 2001;107(2):149-59.
104. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*. 2001;107(2):137-48.
105. Bouras T, Fu M, Sauve AA, Wang F, Quong AA, Perkins ND, et al. SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory domain 1. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(11):10264-76.
106. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The EMBO journal*. 2004;23(12):2369-80.

107. McBurney MW, Yang X, Jardine K, Hixon M, Boekelheide K, Webb JR, et al. The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(1):38-54.
108. Villalba JM, Alcain FJ. Sirtuin activators and inhibitors. *BioFactors*. 2012;38(5):349-59.
109. Chen J, Chan AW, To KF, Chen W, Zhang Z, Ren J, et al. SIRT2 overexpression in hepatocellular carcinoma mediates epithelial to mesenchymal transition by protein kinase B/glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin signaling. *Hepatology*. 2013;57(6):2287-98.
110. Lin SY, Elledge SJ. Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell*. 2003;113(7):881-9.
111. Gordon BS, Delgado Diaz DC, Kostek MC. Resveratrol decreases inflammation and increases utrophin gene expression in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Clinical nutrition*. 2013;32(1):104-11.
112. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 2006;444(7117):337-42.
113. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*. 2006;127(6):1109-22.
114. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, et al. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*. 2007;450(7170):712-6.
115. Dalaklioglu S, Genc GE, Aksoy NH, Akcıt F, Gumuslu S. Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. *Human & experimental toxicology*. 2013;32(6):662-71.
116. Bedalov A, Gatabonton T, Irvine WP, Gottschling DE, Simon JA. Identification of a small molecule inhibitor of Sir2p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(26):15113-8.
117. Grozinger CM, Chao ED, Blackwell HE, Moazed D, Schreiber SL. Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(42):38837-43.
118. Trapp J, Meier R, Hongwiset D, Kassack MU, Sippl W, Jung M. Structure-activity studies on suramin analogues as inhibitors of NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylases (sirtuins). *ChemMedChem*. 2007;2(10):1419-31.
119. Smith MR, Syed A, Lukacsovich T, Purcell J, Barbaro BA, Worthge SA, et al. A potent and selective Sirtuin 1 inhibitor alleviates pathology in multiple animal and cell models of Huntington's disease. *Human molecular genetics*. 2014;23(11):2995-3007.
120. Desmouliere A, Darby I, Costa AM, Raccurt M, Tuchweber B, Sommer P, et al. Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1997;76(6):765-78.
121. Tuchweber B, Desmouliere A, Bochaton-Piallat ML, Rubbia-Brandt L, Gabbiani G. Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1996;74(1):265-78.
122. Oller AR, Oberdorster G, Seilkop SK. Derivation of PM10 size-selected human equivalent concentrations of inhaled nickel based on cancer and non-cancer effects on the respiratory tract. *Inhalation toxicology*. 2014;26(9):559-78.
123. Mahalingaiah S, Hart JE, Laden F, Terry KL, Boynton-Jarrett R, Aschengrau A, et al. Air pollution and risk of uterine leiomyomata. *Epidemiology*. 2014;25(5):682-8.

124. Yang MC, Wang CJ, Liao PC, Yen CJ, Shan YS. Hepatic stellate cells secretes type I collagen to trigger epithelial mesenchymal transition of hepatoma cells. *American journal of cancer research*. 2014;4(6):751-63.
125. Thompson AI, Conroy KP, Henderson NC. Hepatic stellate cells: central modulators of hepatic carcinogenesis. *BMC gastroenterology*. 2015;15:63.
126. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Hvidberg M, Jensen SS, Kettel M, Sorensen M, et al. Air pollution from traffic and cancer incidence: a Danish cohort study. *Environmental health : a global access science source*. 2011;10:67.
127. Markevych I, Wolf K, Hampel R, Breitner S, Schneider A, von Klot S, et al. Air pollution and liver enzymes. *Epidemiology*. 2013;24(6):934-5.
128. Kim KN, Lee H, Kim JH, Jung K, Lim YH, Hong YC. Physical Activity- and Alcohol-dependent Association Between Air Pollution Exposure and Elevated Liver Enzyme Levels: An Elderly Panel Study. *Journal of preventive medicine and public health = Yebang Uihakhoe chi*. 2015;48(3):151-69.
129. Lee YC, Cohet C, Yang YC, Stayner L, Hashibe M, Straif K. Meta-analysis of epidemiologic studies on cigarette smoking and liver cancer. *International journal of epidemiology*. 2009;38(6):1497-511.
130. Trichopoulos D, Bamia C, Lagiou P, Fedirko V, Trepo E, Jenab M, et al. Hepatocellular carcinoma risk factors and disease burden in a European cohort: a nested case-control study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(22):1686-95.
131. Yoon KA, Nakamura Y, Arakawa H. Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. *Journal of human genetics*. 2004;49(3):134-40.
132. Bustamante E, Pedersen PL. High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(9):3735-9.
133. Galmiche A, Ezzoukhry Z, Francois C, Louandre C, Sabbagh C, Nguyen-Khac E, et al. BAD, a proapoptotic member of the BCL2 family, is a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Molecular cancer research : MCR*. 2010;8(8):1116-25.
134. Malkusch W, Rehn B, Bruch J. Advantages of Sirius Red staining for quantitative morphometric collagen measurements in lungs. *Experimental lung research*. 1995;21(1):67-77.
135. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal*. 1979;11(4):447-55.