



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Medicina Cardiovascolare e Biotecnologie Chirurgiche ed Urologiche
Indirizzo: Biotecnologie Chirurgiche, Medicina Metabolico-Nutrizionale e Rigenerativa
nell'Insufficienza d'Organo e dei Tessuti
Dipartimento di Discipline Chirurgiche, Oncologiche e Stomatologiche
Settore Scientifico Disciplinare MED/18

RUOLO DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DA TESSUTO ADIPOSO NELL' ARDS

IL DOTTORE
FRANCESCO DAMIANI

IL COORDINATORE
PROF.ATTILIO IGNAZIO LO MONTE

IL TUTOR
PROF.ATTILIO IGNAZIO LO MONTE

CICLO XXVI
ANNO DI CONSEGUIMENTO 2016

INDICE

1. INTRODUZIONE	2
2. ASPETTI GENERALI DELL'ARDS E DATI EPIDEMIOLOGICI	3
3. IPOTETICO RUOLO DELLA MEDICINA RIGENERATIVA E DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI	5
4. STRUTTURA E FUNZIONE DEL POLMONE	8
5. ASPETTI PATOGENETICI DELLA SINDROME DA DISTRESS RESPIRATORIO ACUTA(ARDS)	13
5.1. CRITERI DI CLASSIFICAZIONE	
5.2. ETIOLOGIA ED ASPETTI PATOGENETICI	
5.3. EZIOLOGIA SETTICA	
5.4. EZIOLOGIA NON SETTICA	
5.5. NETWORK DELLE CITOCHINE ED INFIAMMAZIONE	
5.6. LESIONE DELLA MEMBRANA ALVEOLO CAPILLARE	
5.7. EVOLUZIONE ANATOMO CLINICA	
6. TRATTAMENTO DELL'ARDS	21
7. CELLULE MESENCHIMALI STAMINALI MSC	24
7.1. CRITERI CLASSIFICATIVI E GENERALITA'	
7.2. MSC NELL'ARDS	
7.3. MECCANISMO D'AZIONE DELLE MSC NEL TRATTAMENTO DELL'ARDS	
8. NOSTRA ESPERIENZA PRESSO L'ISTITUTO ZOOPROFILATTICO A.MIRRI DELLA SICILIA	33
9. BIBLIOGRAFIA	38

INTRODUZIONE

La sindrome da distress respiratorio acuta (ARDS) è una sindrome caratterizzata da elevata incidenza nei reparti di rianimazione cui si associano alti costi economici, considerazioni etiche ed implicazioni sociali. Tale incidenza è andata crescendo negli ultimi decenni che hanno altresì visto una riduzione della mortalità. I costi di tale sindrome sono molto elevati considerato il fatto che la degenza di questi pazienti è di pertinenza intensivista-rianimatoria; richiede misure di supporto estremamente complesse quali la ventilazione meccanica, il monitoraggio invasivo di parametri cardio-respiratori, la nutrizione artificiale, l'antibiotico terapia e la gestione di infezioni da germi MDR(Multi-Drug-Resistance), il supporto farmacologico inotropico e vasopressorio; è necessaria una gestione infermieristica complessa finalizzata alla prevenzione ed al trattamento delle piaghe da decubito. Spesso nei casi più gravi è necessario disporre di dispositivi extracorporei di assistenza meccanica al circolo (contropulsazione aortica, assistenza biventricolare), alla funzione respiratoria (ECMO, Ossido nitrico-terapia), alla funzione renale (Continuos Renal Replacement Therapy). Tale complessità rimanda a considerazioni anche di natura etica. I costi sociali sono molto elevati: le sequele per i sopravvissuti sono molto importanti ed hanno ricadute sui familiari e sulla intera società.

ASPETTI GENERALI DELL'ARDS E DATI EPIDEMIOLOGICI

La sindrome è in sintesi caratterizzata da un processo infiammatorio acuto e diffuso nel parenchima polmonare. Tale infiammazione produce un accumulo di elementi cellulari infiammatori nel polmone, un danno alla membrana alveolo capillare, edema polmonare non cardiogeno, la formazione di membrane ialine, una riduzione della compliance polmonare con conseguente alterazione degli scambi gassosi risultante in una severa ipossiemia (1-6).

Parecchi disordini clinici possono estrinsecarsi in ARDS e sono stati classificati in via del tutto generale come polmonari o extra polmonari, settici o non settici; l'aspetto che maggiormente colpisce i clinici di questa patologia riguarda i comuni connotati fisiopatologici nonostante le differenti varianti eziopatologiche (polmoniti, sepsi, traumi, politrasfusioni, ustioni, pancreatiti).

Tale sindrome presenta un'incidenza estremamente elevata rispetto a quanto si sia rilevato sin dalla sua prima descrizione nel 1967 da Ashbaugh et al(7). La standardizzazione dei criteri classificativi effettuata nel 1994 dall' American European Consensus Conference (AECC)(8) ha permesso di stabilire che si tratta di una sindrome abbastanza frequente la cui mortalità(74500 morti/anno) è simile a quella registrata per cancro al seno(41528 morti/anno), all'AIDS(14802 morti/anno), all' infarto del miocardio (199454 morti/anno)(9). Sono stati registrati 78,9/100000 negli stati uniti nel 2005 con 200000 nuovi casi con una mortalità di 74500 morti e significative alterazioni fisiche e cognitive tra i sopravvissuti tra i quali meno del 50% torna alle attività lavorative un anno dopo la dimissione dall' ospedale. Secondo Angus(10) i pazienti con danno polmonare acuto non tornano ai livelli prevedibili riguardanti le funzioni fisiche a 5 anni dall'evento e presentano in questo periodo elevati costi sociali ed umani per una maggiore incidenza di malattie

intercorrenti.

Nei reparti di Terapia Intensiva il 16-18% dei pazienti ventilati meccanicamente riporta un sindrome da distress respiratorio acuta(11). Tale patologia comporta 6368000 giorni di degenza in ospedale(12).

Nonostante dalla prima descrizione ad oggi il trattamento sia stato standardizzato grazie a nuovi concetti fisiopatologici ed a criteri di classificazione (the Berlin Definition) resta ancora da definire una specifica e risolutiva terapia(13).

Attualmente il trattamento è da ritenersi esclusivamente di supporto con adeguata ventilazione meccanica protettiva, fluido terapia, supporto nutrizionale, farmaci specifici. Ognuno di questi aspetti è stato validato negli ultimi decenni da studi che sono da ritenersi evidenza scientifica di classe IA. La mortalità è ancora elevata e le sequele talvolta gravi.

IPOTETICO RUOLO DELLA MEDICINA RIGENERATIVA E DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI.

Nell'ambito della medicina rigenerativa nell'insufficienza terminale d'organo negli ultimi anni si è assistito ad un crescente interesse sull'impiego delle cellule mesenchimali staminali. Tali studi sono supportati da incoraggianti evidenze biologiche, sistemiche ed antiinfiammatorie ascrivibili all'uso terapeutico delle cellule staminali mesenchimali in studi pre-clinici.

Le cellule mesenchimali stromali (MSCs) descritte nel 1968 sono capaci di autorigenerarsi e di differenziarsi in tutte le linee cellulari.

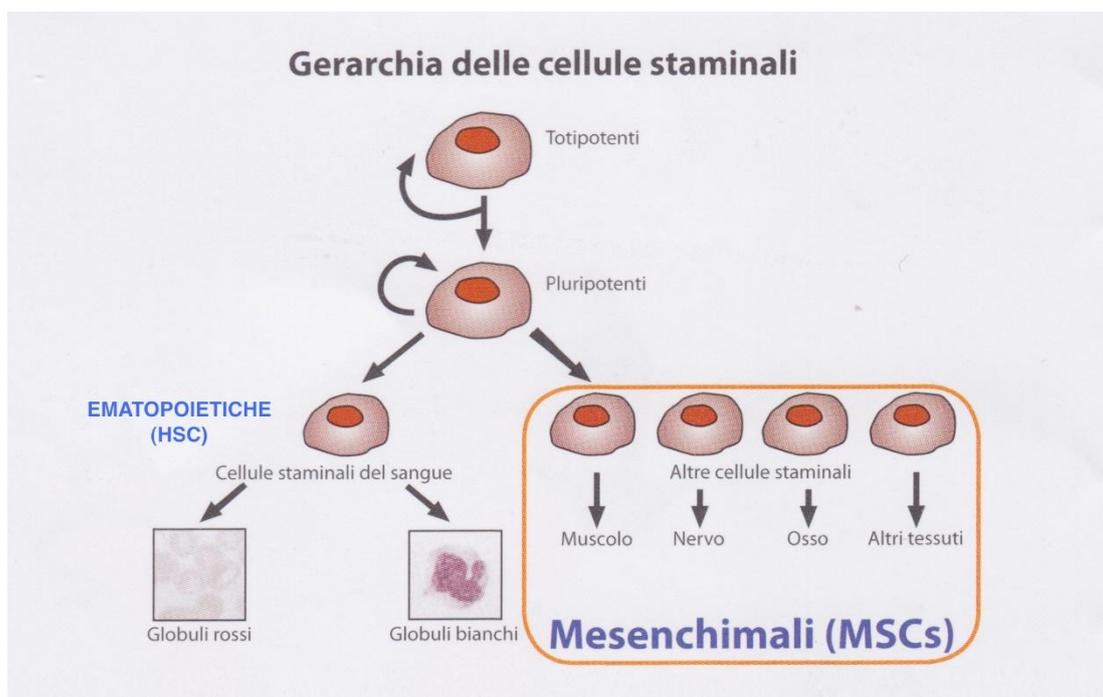


Figura 1: Caratteristiche cellule Mesenchimali

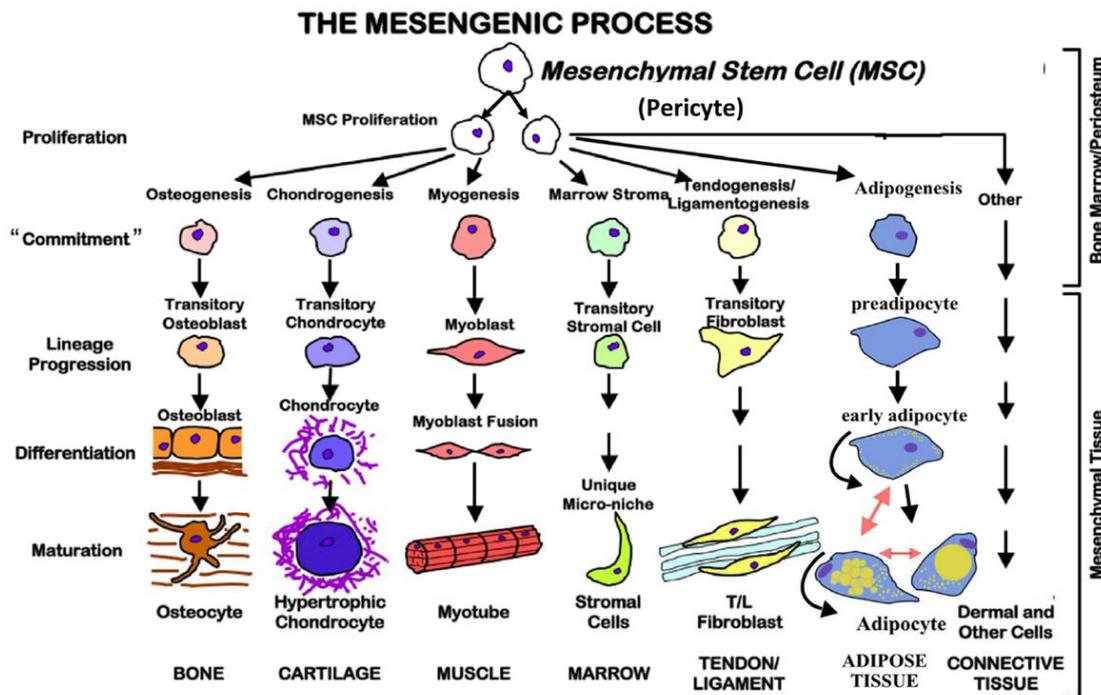


Figura 2: Processo di maturazione delle staminali.

Dati preclinici su modelli animali dimostrano che il loro impiego riduce l'infiammazione alveolare, l'edema tissutale, preserva la funzione alveolo-capillare del polmone, ha un effetto immunomodulatore, favorisce la clearance batterica.

Vi sono 11 trial clinici su clinicaltrials.gov registrati come impiego delle MSCs nell'ARDS.

Alla luce di questi dati abbiamo ipotizzato un ruolo terapeutico nell'ARDS. Il nostro lavoro si è sviluppato attraverso vari stadi:

- 1) Scelta di un modello animale da laboratorio semplice e facilmente riproducibile per la comunità scientifica. Infatti fino a poco tempo fa vi è stato poco consenso relativo ai criteri classificativi sull' ARDS nel modello animale; l' American Thoracic Society infatti ha colmato tale lacuna introducendo nel 2011 criteri che sono assimilabili a quelli umani ed il modello maggiormente validato è stato quello murino.
- 2) Abbiamo messo a punto una tecnica di intubazione orotracheale nel ratto sicura e valida

che ci ha permesso di mettere in sicurezza l'animale.

- 3) Abbiamo stabilito una metodica di prelievo di cellule staminali mesenchimali nel ratto utilizzabili in svariati campi (epatologia, nefrologia) grazie a metodiche di purificazione, differenziazione e successivo trapianto. Abbiamo ottenuto tessuto adiposo elaborato e digerito attraverso diverse fasi: lavaggio in soluzione antibiotica, omogeneizzazione, digestione enzimatica. Si ottiene così una popolazione eterogenea di cellule in grado di aderire a materiale plastico e di proliferare con le stesse caratteristiche delle cellule mesenchimali staminali. Infine abbiamo analizzato la letteratura riguardante l'impiego delle staminali mesenchimali con particolare attenzione ai loro effetti, alle modalità di prelievo, alla via di inoculazione, al giusto timing, agli effetti collaterali. Futuri orientamenti del nostro lavoro riguarderanno l'induzione sperimentale su un modello animale di un danno polmonare trattato con cellule staminali mesenchimali al fine di comprenderne bene gli effetti, la via di inoculazione, il corretto timing per verificare se realmente il loro uso terapeutico sia pronto per la medicina translazionale.

STRUTTURA E FUNZIONI DEL POLMONE

L'Apparato respiratorio svolge una funzione essenziale nell'assicurare gli scambi gassosi cioè l'assunzione di ossigeno e la eliminazione dell'anidride carbonica. Tale funzione è essenziale in quanto ci permette di assumere l'ossigeno essenziale per le funzioni biologiche e di eliminare l'anidride carbonica che rappresenta il prodotto di scarto metabolico trasportato dal torrente circolatorio al polmone. Tutto questo avviene attraverso dei gradienti pressori presenti tra sangue e superficie alveolare con l'ausilio della meccanica e dinamica respiratoria. I polmoni hanno anche una funzione di filtro di alcune sostanze, svolgono un ruolo metabolico, neuroendocrino, contribuiscono a mantenere l'equilibrio acido base del sangue, costituiscono grazie alla "piccola circolazione" una riserva di sangue che può venire incontro ad aumentate richieste metaboliche

Si distinguono spesso le grandi e le piccole vie aeree: trachea, bronchi principali, bronchioli terminali ed infine bronchioli respiratori che terminano con i sacchi alveolari che costituiscono le unità ove avvengono gli scambi gassosi.

Da un punto di vista ultrastrutturale dobbiamo notare che le cellule epiteliali sono alte e ciliate nelle vie aeree grande per garantire la funzione di umidificazione, difesa ed eliminazione dei patogeni inalanti (chimici, fisici o biologici); la struttura fibro-muscolo-cartilaginea è importante a tale livello. Nelle piccole vie aeree la funzione da assolvere è lo scambio gassoso. La ultrastruttura è molto sottile con pochi micron di spessore; l'alveolo polmonare è costituito da un epitelio basso con pneumociti di I tipo, deve stare sempre aperto e non deve collassare grazie alle proprietà tensioattive del surfattante prodotto dagli pneumociti di II tipo; sono presenti macrofagi; la membrana basale mette in contatto tali cellule con quelle endoteliali vascolari permettendo lo scambio di ossigeno e anidride carbonica tra alveolo polmonare e sangue; questa struttura permette che vi sia una elevata

superficie disponibile per gli scambi gassosi all'interno del torace.

I polmoni ricevono il sangue dalle sezioni destre del cuore tramite le arterie polmonari e drenano alle sezioni sinistre sangue che ha partecipato agli scambi gassosi. Tale disposizione anatomica della circolazione polmonare è molto importante nella trapiantologia delle cellule staminali perché favorisce il cosiddetto "primo passaggio polmonare" che favorisce l'engraftment polmonare quando si iniettano cellule staminali per via endovenosa.

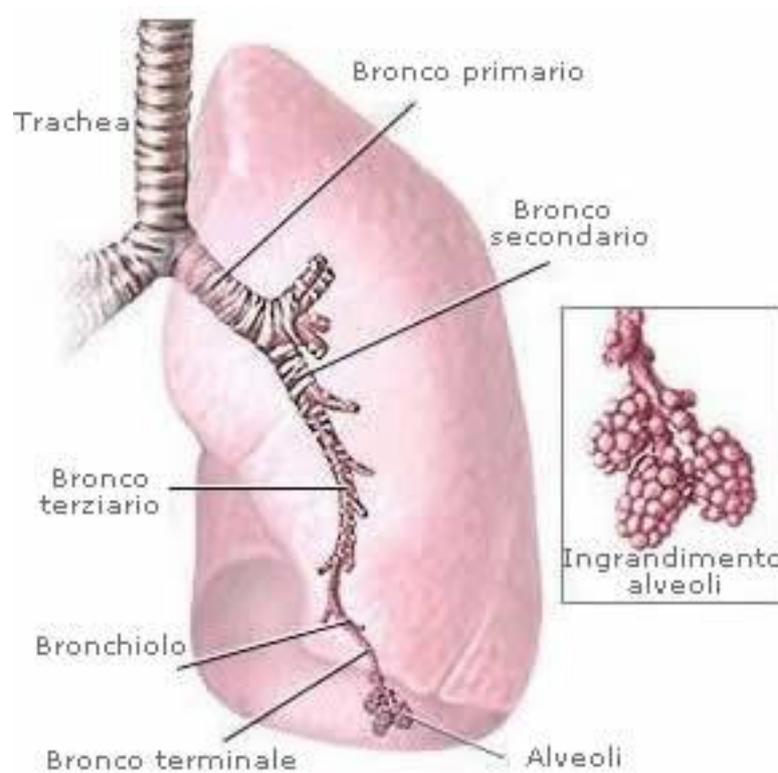


Figura 3: Progressiva diramazione delle vie aeree

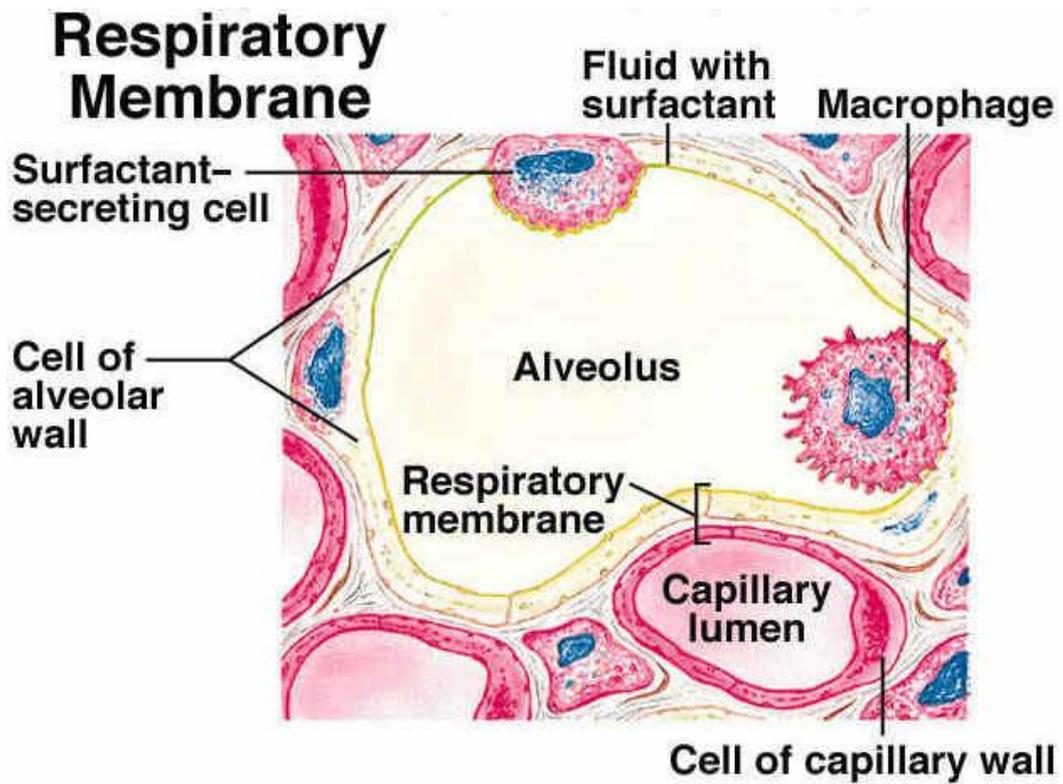


Figura 4: Ultrastruttura di alveolo polmonare normale

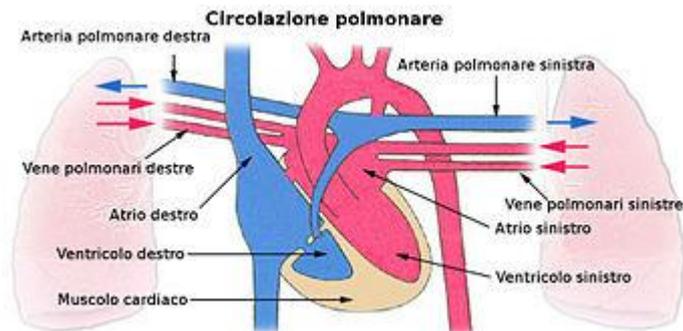


Figura 5: Schema della circolazione polmonare

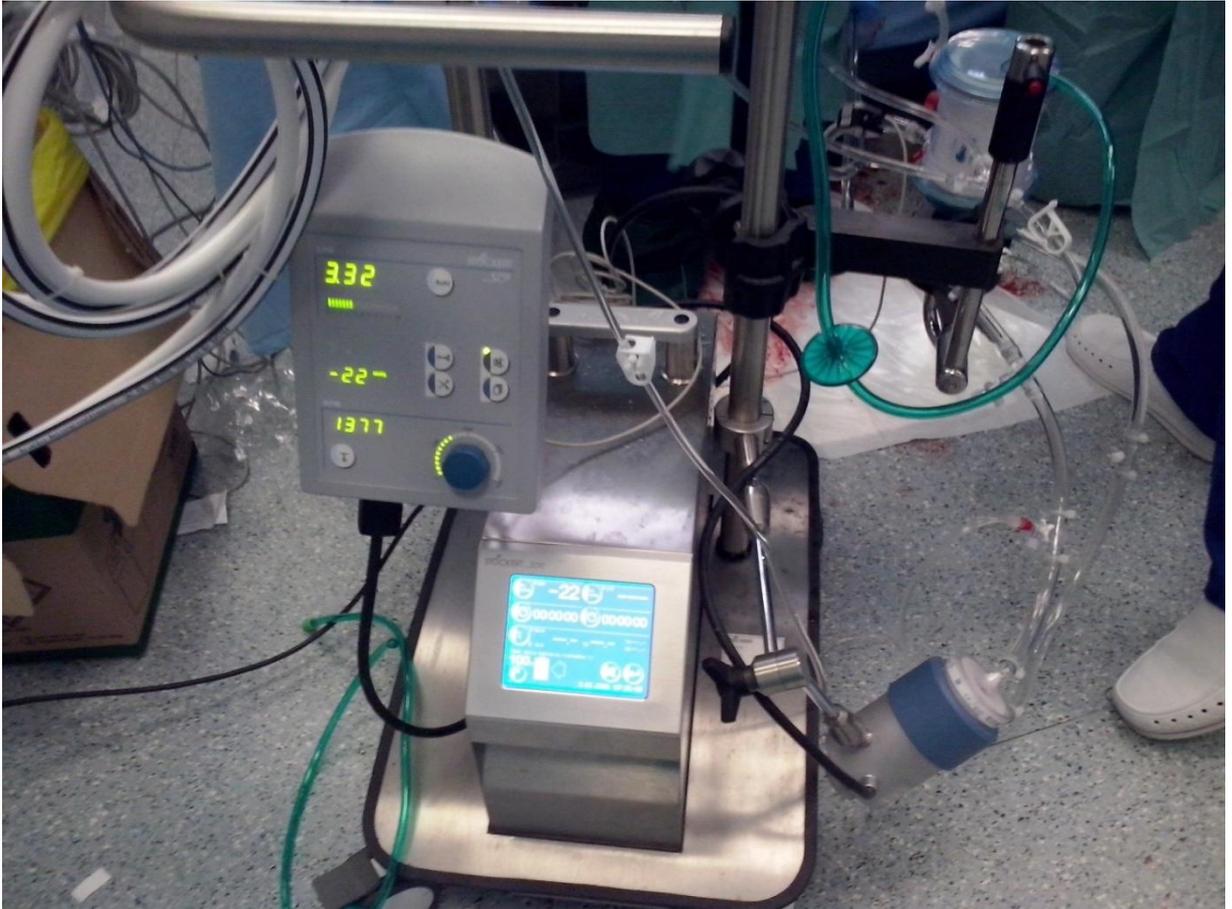


Figura 6: Allestimento ECMO (Extracorporeal Membrane Oxygenator)



Figura 7: ECMO per gravissima insufficienza cardiorespiratoria(esperienza personale).

ASPETTI PATOGENETICI DELLA SINDROME DA DISTRESS RESPIRATORIO ACUTO (ARDS)

Criteri di classificazione

L'ARDS è una grave e catastrofica situazione clinica caratterizzata da edema polmonare non cardiogeno, stato infiammatorio del polmone, riduzione della compliance polmonare e grave ipossiemia. E' una patologia che riguarda l'alveolo polmonare distribuita in maniera difforme tra le zone del polmone in maniera tale che alcuni alveoli sono collassati altri sono sovradistesi. Fu descritta la prima volta nel 1967 da Ashbaugh.

I criteri classificativi si sono modificati nel corso dei decenni precedenti. Il primo tentativo fu fatto da Murray et al nel 1988(14). Sono stati riportati diversi tentativi di score tra cui riportiamo il maggiormente usato nella tabella 1

	Score
Chest radiograph	
No alveolar consolidation	0
Alveolar consolidation confined to 1 quadrant	1
Alveolar consolidation confined to 2 quadrants	2
Alveolar consolidation confined to 3 quadrants	3
Alveolar consolidation confined to 4 quadrants	4
Hypoxaemia score	
$PaO_2/FiO_2 \geq 300$	0
PaO_2/FiO_2 225–299	1
PaO_2/FiO_2 175–224	2
PaO_2/FiO_2 100–174	3
$PaO_2/FiO_2 < 100$	4
PEEP score (when mechanically ventilated)	
≤ 5 cm H ₂ O	0
6–8 cm H ₂ O	1
9–11 cm H ₂ O	2
12–14 cm H ₂ O	3
≥ 15 cm H ₂ O	4
Respiratory system compliance score (when available)	
≥ 80 ml/cm H ₂ O	0
60–79 ml/cm H ₂ O	1
40–59 ml/cm H ₂ O	2
20–39 ml/cm H ₂ O	3
≤ 19 ml/cm H ₂ O	4
The score is calculated by adding the sum of each component and dividing by the number of components used.	
No lung injury	0
Mild to moderate lung injury	0.1–2.5
Severe lung injury (ARDS)	>2.5

Tabella 1: Murray score: prende in considerazione diversi aspetti per attribuire un punteggio e definire l'ARDS da medio a severo.

Per la prima volta in letteratura comincia a essere standardizzato il concetto di rapporto $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, la tipologia di immagine radiografica e la presenza di Peep (positive end expiration pressure). Bisognerà attendere al 1994 per revisionare tali aspetti con i criteri classificativi del 'American European Consensus Conference (AECC). Da un'analisi di tale approccio risultano alcune lacune: la mancanza di un netto criterio per definire il termine "acuto"; la scarsa sensibilità del rapporto $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$; la difficoltà nell'interpretazione dei dati radiografici.

Dal 2012 il criterio classificativo maggiormente usato è quello definito "The Berlin Definition of ARDS" scaturito da una metanalisi di 4188 pazienti con ARDS effettuata da un panel di esperti della European Society of Intensive Care Medicine, American Thoracic Society, Society for Critical Care Medicine. Sparisce il concetto di Acute Lung Injury (ALI), ancora espresso tuttavia nella letteratura riguardante i trials preclinici su modelli animali e viene definito un netto criterio temporale (acuto).

THE BERLIN DEFINITION
<p>Timing</p> <p>Onset of ARDS is within 1 week of a known clinical insult or new or worsening respiratory symptoms</p>
<p>Chest imaging (Radiography or compute tomography scan)</p> <p>Bilateral opacities – not fully explained by effusion, lobar/lung collapse or nodule</p>
<p>Origin of oedema</p> <p>Respiratory failure not explained by cardiac failure or fluid overload.</p> <p>Need objective assessment(e.g.ECHO) to exclude hydrostatic oedema if no risk factor present</p>
<p>Oxygenation</p> <p>Mild ratio between 200 and 300 with Peep or C_{pa} ≥ 5</p> <p>Moderate ratio between 100 and 200 with Peep ≥ 5</p> <p>Severe ratio ≤ 100 with Peep ≥ 5</p>

Tabella 2: The Berlin Definition.

Eziologia ed aspetti patogenetici

Diverse condizioni cliniche sono associate con lo sviluppo di ARDS; esse vengono classificate come settiche e non settiche a causa della concomitante presenza di infezioni. La sepsi può essere causata da un'infezione polmonare o non polmonare. Tra le cause non settiche si devono citare i traumi maggiori, le ustioni, la pancreatite acuta, stati tromboembolici, le trasfusioni massive, il bypass cardiopolmonare, l'aspirazione di materiale gastrico.

Eziologia settica

La sepsi è una reazione sistemica infiammatoria in presenza di una infezione microbica. L'Ards indotto da sepsi è la forma clinica più frequentemente osservata ed è tra le prime cause di morte nei pazienti critici ed incide circa nel 40% dei casi. L'incidenza di sepsi è di 150/100000 casi all'anno negli Stati Uniti. La sepsi causa una reazione infiammatoria dei neutrofili che porta ad un incremento della permeabilità endoteliale. La disfunzione endoteliale che ne consegue comporta l'incremento di acqua extra polmonare, negli spazi intravascolari, intrapolmonari causando shock ed alterazione degli scambi gassosi. Alcuni marker biochimici che correlano con la gravità del quadro clinico sono caratteristici: i livelli di proteina C sono più bassi, mentre risultano aumentati la pro calcitonina, vWF, ICAM-1, E-Selectina, IL-6, IL-8 e la IL-10.

Eziologia non settica

L' ARDS può riconoscere un'eziologia non settica. Traumi maggiori, overdose farmacologica, emorragie importanti, agenti inalanti, stati tromboembolici ed il bypass cardiopolmonare sono tra le condizioni maggiormente associate. Parecchi studi suggeriscono che la etiologia non settica si accompagna ad un miglioramento dell'outcome e riduzione di mortalità. Del resto bisogna notare che tale eziologia riguarda spesso pazienti più giovani (ad esempio i pazienti politraumatizzati) con minori co-morbilità e con score di severità clinica più bassi.

Network delle citochine ed infiammazione

Il danno della membrana alveolo-capillare ed il conseguente edema polmonare non cardiogenico sono la tappa chiave nello sviluppo dell'ARDS. Il concomitante danno delle cellule endoteliali ed epiteliali sono il risultato di una reazione infiammatoria che

coinvolge elementi cellulari e mediatori della infiammazione. I neutrofili rappresentano la prima linea cellulare coinvolta e giocano un ruolo chiave nella progressione della malattia. I neutrofili sono attivati in situ da diversi fattori chemiotattici, da una interazione con le cellule endoteliali chiamata rolling adhesion cui segue la migrazione nello spazio alveolare. La loro concentrazione aumenta notevolmente nel liquido ottenuto da lavaggio bronco alveolare (BAL). Nell'ARDS la reazione non più regolata dei neutrofili conduce a danno polmonare con la produzione di agenti citotossici, citochine pro-infiammatorie e produzione di reactive oxygen species(ROS)(15). Una ridotta apoptosi dei neutrofili è inoltre osservata. Il pattern pro infiammatorio osservato è regolato dalla attivazione del NF- κ B. E' aumentata la produzione di granulocyte macrophage colony stimulating factor(GM-CSF), di IL 8 che è un potente fattore chemiotattico per neutrofili e macrofagi insieme al Keratinocyte derived chemokine (KC), chiamato anche CXCL-1(CINC-1 nel ratto) e MIP-2 noto anche come CXCL-2. Risulta sbilanciata in favore del pattern pro infiammatorio la produzione di citochine con aumento di TNF- α , MIP-2, IL1- β ed IL-8 rispetto quelle antiinfiammatorie come la IL-4 e la IL-10(16). La attività della neutrofilo elastasi, della proteinasi, della catepsina G è esaltata ed è responsabile sia dei danni tissutali sia dell'attivazione di alcuni segnali intracellulari tra cui i più importanti sono il fosfoinositide 3-Kinasi(PI3K) ed il NF- κ B responsabili di controllare il sistema di trasduzione del segnale dalla membrana cellulare al nucleo e quindi di regolare la risposta iper-infiammatoria dei leucociti e delle cellule epiteliali(17-18).

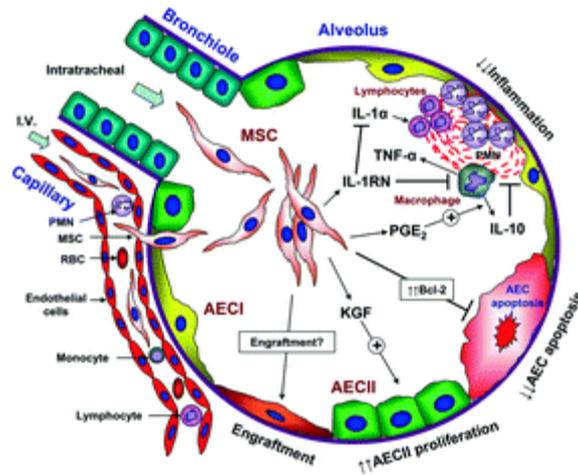


Figura 8: MSC ed Ards

What NF-κB Activates

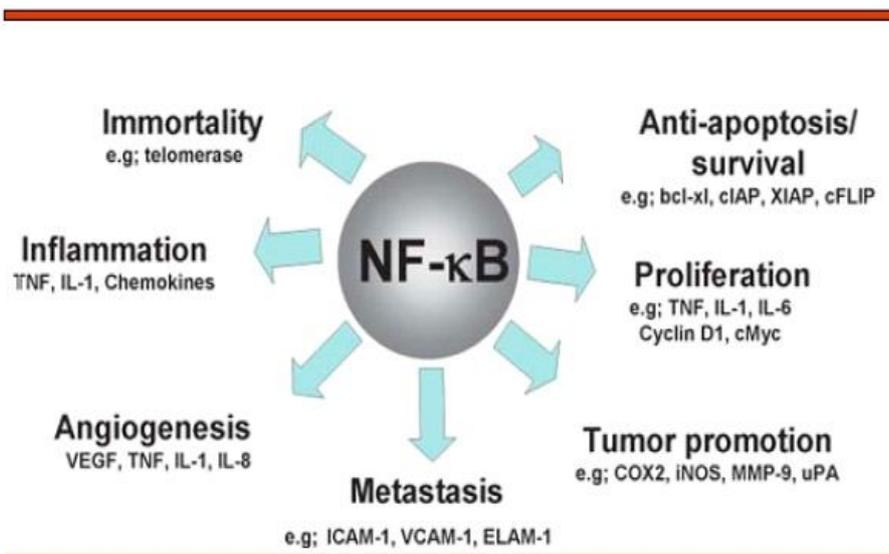


Figura 9: Effetti dell'attivazione del NF-κB. Sono visibili gli effetti sulla infiammazione, sull'apoptosi e sulla chemiotassi.

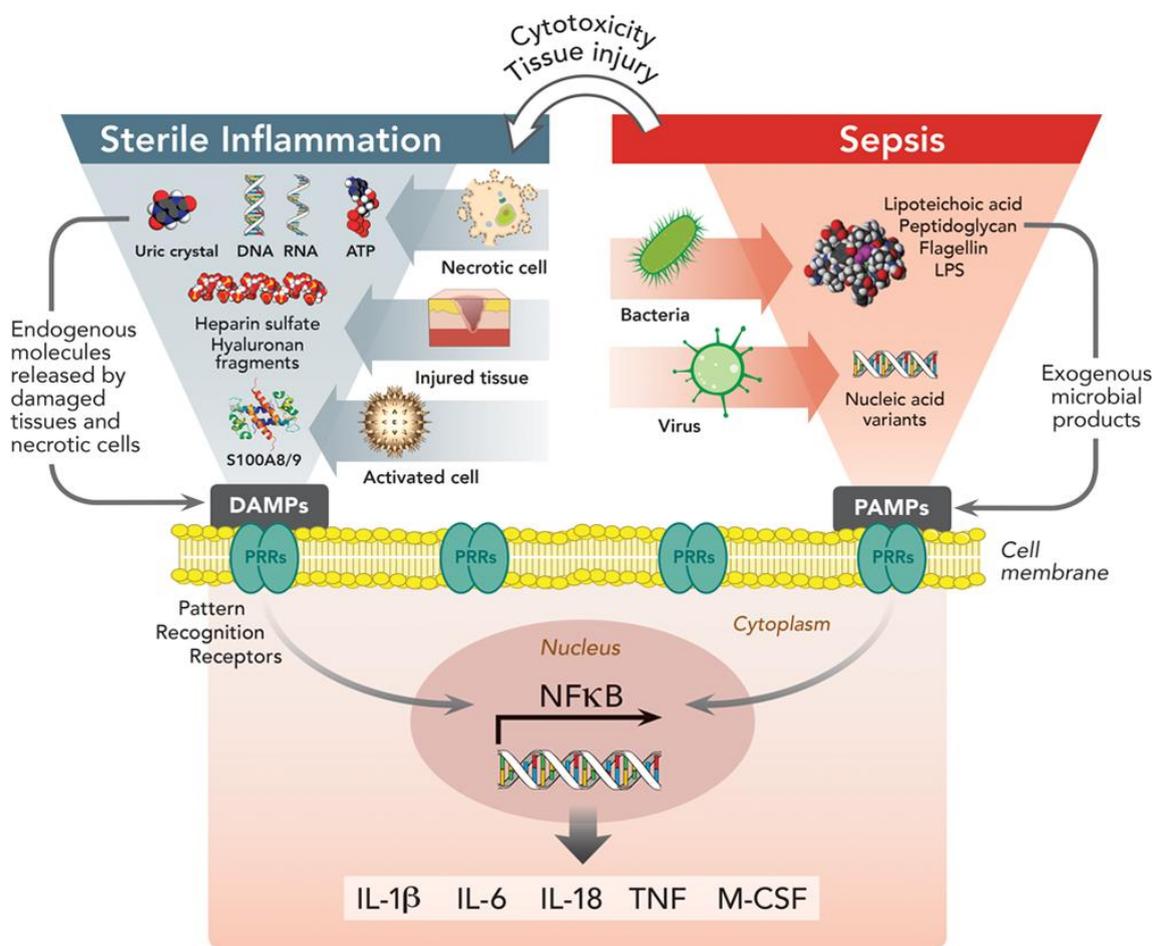


Figura 10: attivazione settica e non settica del NF-KB.

Lesione della membrana alveolo capillare

L'elemento anatomico-patologico fondamentale dell'ARDS è caratterizzato dalla lesione della membrana alveolo-capillare a causa del danno alveolare ed endoteliale del polmone. Questo comporta un edema polmonare con alveoli ricchi di elementi cellulari infiammatori e fluido ricco di proteine. Tale elemento comporta alterazione degli scambi gassosi, con ipossiemia e ipercapnia negli stadi più avanzati, diminuzione della compliance polmonare per cui il polmone risulta essere più rigido ed irregolarmente sovra disteso in alcune zone. I leucociti e le piastrine giocano un ruolo chiave in questo processo. Inoltre alcuni mediatori agiscono direttamente sull' endotelio polmonare, amplificando l'espressione di alcuni fattori chemiotattici e di alcune molecole di espressione della superficie cellulare

che amplificano la adesione dei leucociti. In particolare risultano aumentate l'espressione nel microcircolo del fattore von Willebrand (vWF) e la molecola di adesione intercellulare (ICAM-1) (19). L'epitelio alveolare in questo modo perde la capacità di produrre il surfattante alveolare per cui l'alveolo collassa a causa dello stato infiammatorio e dell'aumentata permeabilità causata dalla perdita d'integrità della funzione endoteliale.

Evoluzione anatomo-clinica

Le modificazioni prima descritte comportano diverse fasi dello sviluppo della malattia. Nella prima fase definita fase acuta si nota l'aumento del fluido intra alveolare ricco di proteine, il danno delle cellule endoteliali e degli pneumociti di tipo 1 e 2 e l'accumulo di cellule infiammatorie. Tale fase è caratterizzata da insufficienza respiratoria, edema polmonare con ipossiemia e riduzione della compliance.

Dalla fase acuta si passa alla fase di risoluzione in cui si assiste alla rigenerazione della membrana alveolo-capillare con ripresa della funzione polmonare e miglioramento degli scambi gassosi.

Quando la risoluzione è anomala ed evolve in fibrosi si ha la persistenza di insufficienza respiratoria, ipossiemia refrattaria con ipercapnia, compliance ridotta ed ipertensione polmonare.

La presenza di tessuto fibroso comporta la perdita dell'unità funzionale ed in altri termini rappresenta la impossibilità da parte dell'organismo di attuare una down regulation della risposta infiammatoria a causa di una incontrollata espressione del pattern infiammatorio(20).

TRATTAMENTO DELL'ARDS

A causa della complessità dell'eziologia e della patogenesi il trattamento dell'ARDS risulta complesso. Sicuramente è mandatorio trattare l'evento scatenante; contestualmente risulta importante il trattamento di supporto. Nonostante la massiva ricerca che si è verificata negli ultimi 40 anni per questa sindrome ancora non esiste una terapia farmacologica specifica.

Numerosi trials clinici sono stati proposti per ridurre la mortalità e migliorare l'out come. Alcuni hanno dimostrato un aumento della mortalità, mentre altri hanno dimostrato non avere alcun effetto.

Il trattamento della ARDS comprende i seguenti aspetti:

- Beta 2 agonisti
- Corticosteroidi
- Inibitori delle elastasi
- Bloccanti neuromuscolari
- Statine
- Ventilazione meccanica protettiva
- Ossido Nitrico
- Fluido terapia a regime restrittivo

Il BALTI (beta agonist lung injury trial) ed il BALTI 2 sono stati due trial clinici multicentrici sull'uso dei beta 2 agonisti(21-22). Tale categoria farmacologica potrebbe avere un ruolo grazie alla capacità di aumentare la clearance dell'acqua polmonare ed extra-polmonare attraverso un trasporto sodio mediato capace di ridurre la permeabilità vascolare; tuttavia se la somministrazione endovenosa ha causato un peggioramento del quadro clinico, la via di somministrazione inalatoria non ha prodotto un miglioramento

dell'out come(23).

Il razionale impiego di inibitori di elastasi neutrofila (NE) al fine di ridurre il danno tissutale è stato interrotto per eventi avversi(24-25).

Sicuramente l'effetto antiinfiammatorio dei corticosteroidi potrebbe diminuire questa risposta esagerata nei confronti di una noxa patogena. Nonostante tale interesse pochi benefici sono stati notati con dosaggi moderati ed alti. Ulteriori studi ne devono validare il potenziale uso.

Una review condotta sull'impiego dell'ossido nitrico somministrato per via inalatoria ha dimostrato un miglioramento sulla ossigenazione ma non ha avuto effetti sulla riduzione della mortalità. Ancora da validare è l'impiego degli inibitori delle HMG CoA-reduttasi ed il loro effetto nel ridurre i livelli di citochine(26-27).

L'uso di bloccanti neuromuscolari si propone come un valido aiuto quando il paziente non è perfettamente adattabile alla ventilazione meccanica. Tuttavia il miglioramento della sopravvivenza a 90 giorni potrebbe essere riferibile alle tecniche di ventilazione meccanica protettiva piuttosto che all'uso in se del curaro; del resto un uso prolungato di curari è associato ad elevata mortalità nei pazienti ricoverati in unità di Terapia Intensiva.

L'aspetto principe dell'ARDS è comunque rappresentato dalla ventilazione meccanica. La ventilazione meccanica ed in particolare la "ventilazione protettiva" si è dimostrata efficace nel ridurre drasticamente la mortalità. Ventilare un paziente in ARDS con bassi volumi correnti di 6-8 ml/Kg (peso corporeo ideale) rispetto alla tradizionale metodica di ventilazione meccanica con volume corrente di 10-15 ml/kg comporta una riduzione della distensione polmonare, del collasso alveolare, della pressione trans polmonare e del danno tissutale in genere(28). L'associazione di bassi volumi correnti con adeguati valori di pressione positiva di fine espirazione ha notevolmente migliorato l'ossigenazione e l'out come di questi pazienti. In particolare si previene l'atelettasia polmonare, si evita la

sovradistensione di zone polmonari già aperte, il baro trauma ed il volo trauma, si migliora l'ossigenazione senza incrementare la frazione inspiratoria dell'ossigeno e quindi si evita la tossicità polmonare dell'ossigeno, si permette al polmone di lavorare nella zona di miglior compliance che quel polmone malato può ottenere. Si deve evitare di raggiungere nelle vie aeree pressioni di picco superiori a 30 cm H₂O. Questi aspetti sono stati dedotti dal concetto di "baby lung" ossia la osservazione che in corso di ARDS una gran parte dei polmoni non prende parte agli scambi gassosi che sono assicurati invece da una parte estremamente piccola(29-30).

CELLULE MESENCHIMALI STAMINALI MSC

Criteria classificativi e generalità

La International Society of Cellular Therapy nel 2006 ha stabilito i seguenti criteri classificativi riguardanti le cellule mesenchimali staminali a causa della mancanza di specifici marker cellulari e la eterogeneità di questa popolazione(31):

1. La capacità di aderire a materiale plastico in condizioni standard di coltura tissutale
2. Tali cellule devono esprimere alcuni pattern antigenici di superficie come il CD73, CD90, CD105, e non devono esprimere altri antigeni come il CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19, CD 79 a, HLA-DR
3. Devono essere capaci di differenziarsi in vitro in tutta la linea mesenchimale, inclusa adipociti, condroblasti ed osteoblasti .

Si tratta di una linea cellulare identificata per la prima volta da Friedenstein nel 1968(32). Furono infatti descritte come una popolazione cellulare mononucleare derivata dal midollo osseo che, posta in coltura, aderiva a materiale plastico assumendo morfologia simile a fibroblasti e generando colonie formanti unità di fibroblasti(CFU-F). Tali cellule hanno in letteratura assunto diversa terminologia: adipose-derived stem cells(ASCs), bone-marrow stromale cells(BMSCs) e multipotent adult progenitor cells(MAPCs). Le MSCs sono state isolate da una gran varietà di tessuti: gelatina di Wharthon, tessuto adiposo, placenta e polmoni. Recenti osservazioni dimostrano la loro presenza come cellule peri vascolari nei tessuti sede di danno; inoltre hanno appunto un alto grado di plasticità poichè sono in grado di differenziarsi in fibroblasti, miofibroblasti e cellule epiteliali. Comunque la loro origine non è ancora perfettamente indagata; tuttavia offrono parecchi vantaggi per il loro semplice isolamento, la loro capacità di replicazione e per il fatto che non pongono problematiche di tipo etico riscontrate con l'impiego delle staminali embrionali.

A causa della complessa patogenesi dell'ARDS l'impiego delle cellule staminali mesenchimali rappresenta una possibile futura strategia terapeutica.

MSC nell'ARDS

E' già presente in letteratura specialmente in modelli animali sperimentali preclinici la dimostrazione che l'impiego delle cellule staminali riduce la gravità del danno polmonare(33). Le cellule staminali mesenchimali attenuano il danno polmonare acuto e ristabiliscono la funzione epiteliale ed endoteliale differenziandosi in queste linee cellulari o attraverso la secrezione di fattori paracrini che stimolano la riparazione cellulare. L'ARDS rappresenta in ultima analisi una risposta infiammatoria incontrollata ed aberrante. Le MSC hanno dimostrato di possedere caratteristiche immunomodulatrici; sono inoltre in grado di ridurre il danno tissutale in altri organi frequentemente colpiti in corso di ARDS come il rene, il fegato ed il miocardio. Intervengono potenziando la fagocitosi, la clearance batterica e la secrezione di peptidi antibatterici. Si prestano come vettori per la cosiddetta gene-based therapy. Sono in grado di giungere alle vie aeree distali sia tramite somministrazione intratracheale sia interamente per via endovenosa in quanto l'intera portata cardiaca si distribuisce alla circolazione polmonare rendendo il polmone un organo "privilegiato" nell'homing delle MSC.

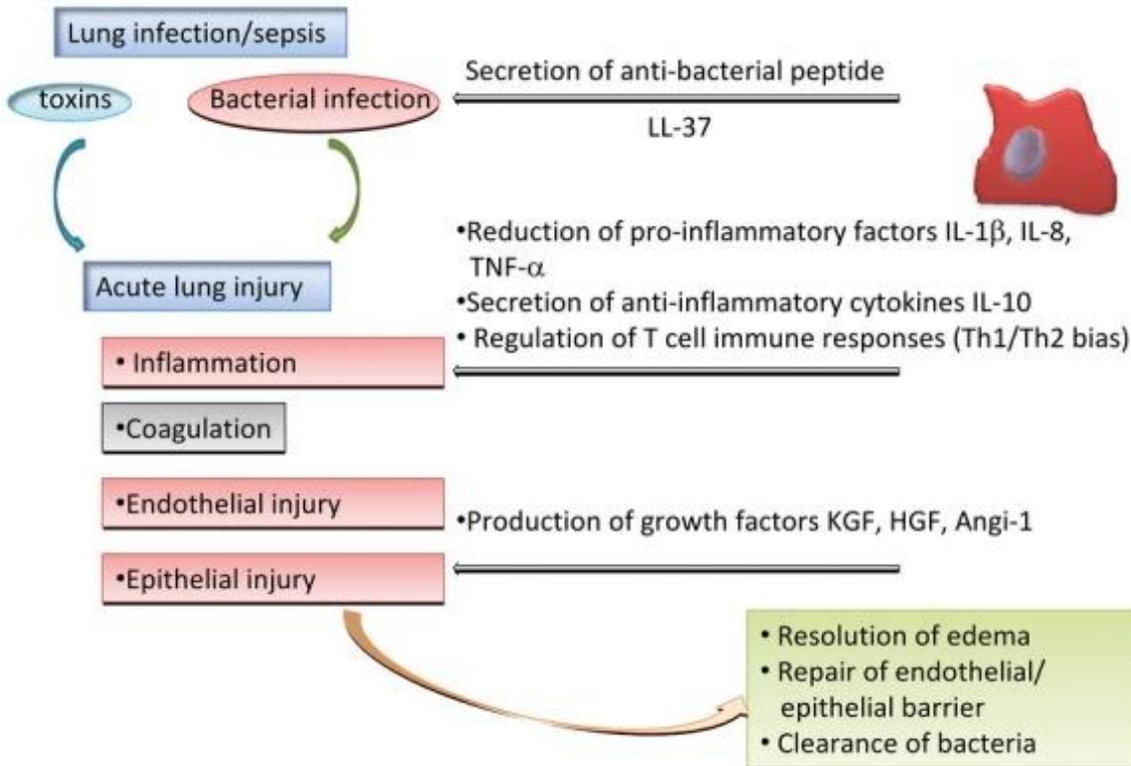


Figura 11: Ruolo delle MSC nell'ARDS.

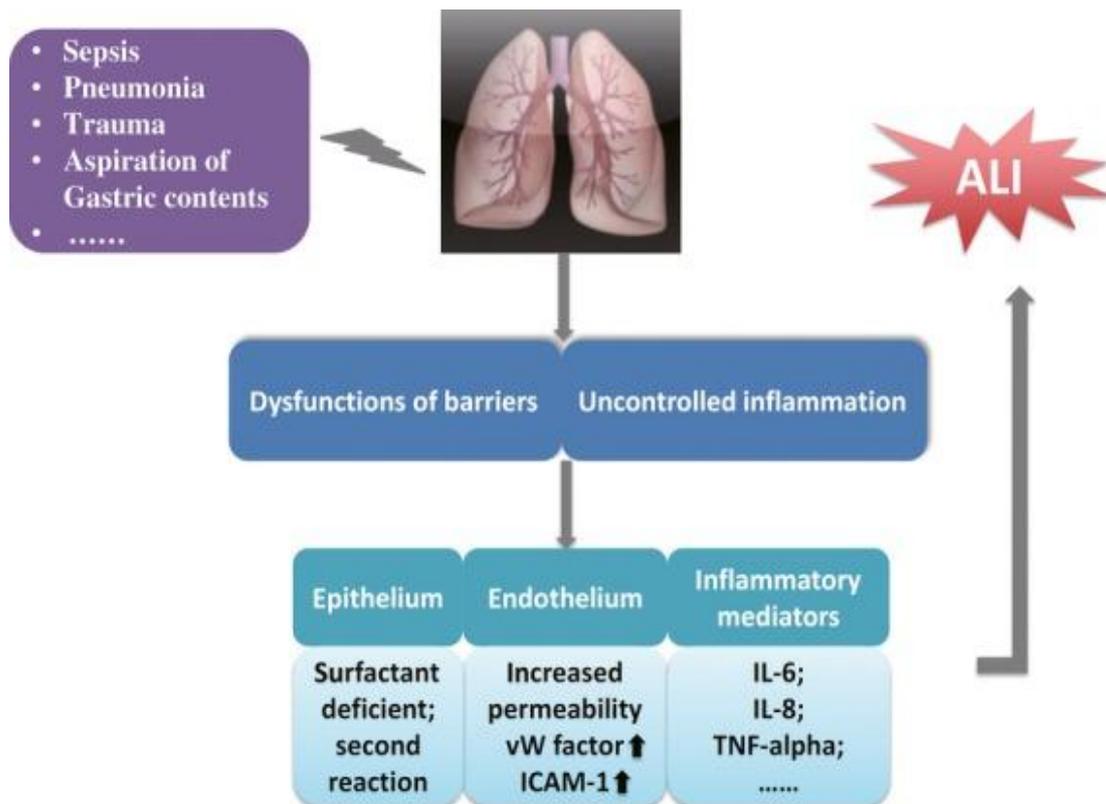


Figura 12: Effetti in corso di ALI/ARDS sull'epitelio, endotelio e sui mediatori della infiammazione che svolgono effetti paracrini.

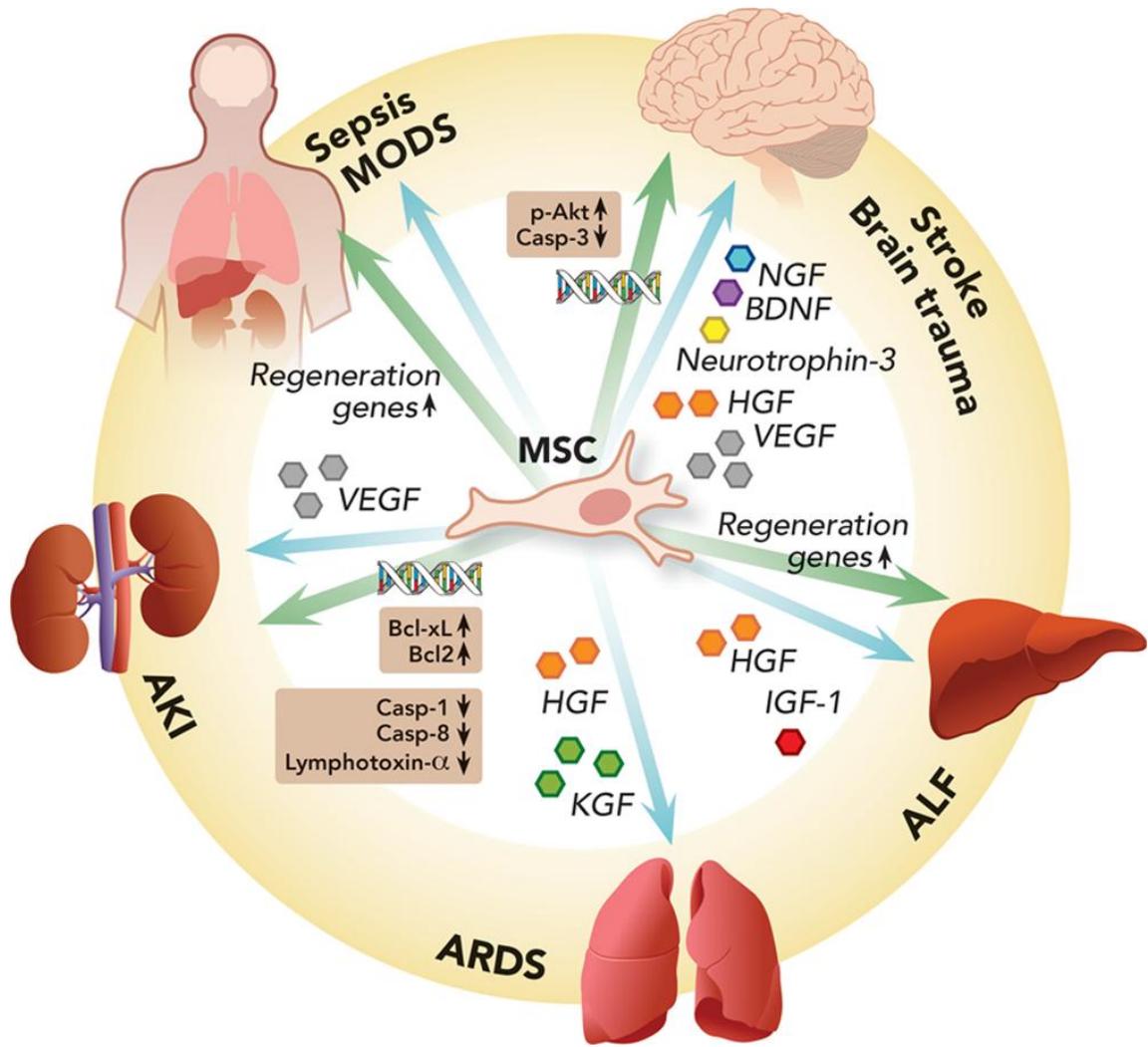


Figura 13: MSC in corso di MOF (multiple organ failure).

Meccanismo d'azione delle cellule staminali mesenchimali nel trattamento dell'ARDS.

Diversi sono i meccanismi che vengono coinvolti nel meccanismo d'azione delle cellule mesenchimali staminali nel trattamento dell'ARDS. Le principali osservazioni si basano su modelli pre-clinici. Esse possono essere così sintetizzate

1. Capacità delle MSC di migrare e di dirigersi, attecchire nel tessuto malato (homing ed engraftment)
2. Ruolo antiinfiammatorio
3. Proprietà immunomodulatrici
4. Ruolo antibatterico
5. Riduzione del danno e capacità di rigenerare il tessuto polmonare.

Recenti studi dimostrano che l'engraftment delle cellule staminali svolge un ruolo importante. Krause(34) ha dimostrato che da un singolo precursore ematopoietico si assiste ad un 20% di engraftment nel polmone con differenziazione in cellule epiteliale partendo da cellule derivate dal midollo osseo. Ortiz(35) ha somministrato MSC purificate da topo maschio BALB/c resistente alla bleiomicina a femmine sensibili a bleiomicina C57BL/6. L'analisi attraverso fluorescenza ha rivelato che le cellule somministrate resistenti a bleiomicina si erano disposte intorno le aree di danno ed avevano assunto caratteri epitelio-like. Roias ha notato che la somministrazione di MSC bone-marrow derived in ratti mielosoppressi e con danno polmonare indotto da bleiomicina è stata protettiva. Tale protezione è associata a differenziazione delle cellule engrafted in specifici fenotipi cellulari polmonari(36). Tali studi non sono però stati confermati da altre osservazioni sperimentali ed il ruolo dell'engraftment e dell'homing delle MSC deve essere ancora studiato in fondo. Questo meccanismo richiede l'intervento di citochine chemioattrattive, enzimi proteolitici, molecole di adesione. I tessuti sito di lesione rilasciano segnali come lo stromal cell derived factor-1(SDF-1), il platelet -derived grow factor, le proteine

chemioattrattivi dei monociti, il basic fibroblast growth factor i quali fungono da stimolo per la espansione, proliferazione e migrazione del pool di MSC endogene o impiantate.

Le MSC esprimono recettori per chemiochine (CCR) chiamati CCR1, CCR2, CCR4, CCR8, CCR10, CXCR1, CXCR2(37). L'interazione tra i fattori chemiotattici e i recettori permette appunto l'homing e l'engraftment; nelle MSC si avrebbero modificazioni del citoscheletro attraverso fosforilazione e polarizzazione delle proteine di membrana; il legame SDF-1/CXCR4 potenzia la migrazione delle MSC nel danno polmonare indotto da bleiomicina(38-39). Le MSC potrebbero interagire con l'endotelio polmonare e mantenere l'integrità della barriera vascolare (VE-caderine e beta-catenine) inibendo l'adesione dei leucociti tramite VCAM-1 ed ICAM-1.

Una incontrollata risposta infiammatoria in corso di ARDS è responsabile della compromissione polmonare e di altri organi. Le MSC sono in grado di produrre una down-regulation delle citochine infiammatorie, stimolando altresì la secrezione di fattori antiinfiammatori: è così diminuito il rilascio di IL-1 β , IL-8, IFN- γ , TNF- α , IL-1 α , IL-6 e delle macrophage inflammatory protein(MIP), mentre è stimolata la secrezione di fattori antiinfiammatori come IL-4 e IL-10 e dell'antagonista del recettore dell'interleuchina 1 (IL-1ra).

Le cellule mesenchimali modulano la risposta immunitaria interagendo con i linfociti B, le cellule natural killer, le cellule dendritiche e i linfociti T. In particolare vi sarebbe uno switch nella espressione delle cellule Th1 a quelle Th2, quindi da un pattern infiammatorio ad uno antiinfiammatorio con la conseguente secrezione dei fattori paracrini prima citati(40).

Gli effetti antibatterici sono rappresentati dalla produzione di fattori solubili antimicrobici tra cui il più citato in letteratura è lo human cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP – 18/LL-37)(41). In un modello di sepsi polimicrobica proposta da Mei, la sepsi è stata

indotta nel topo tramite legatura e puntura del ceco, seguita da una infusione dopo 6 ore di soluzione salina o MSC. La analisi successiva dei liquidi biologici prelevati dimostrava un numero di colony forming units (CFU) maggiore nel gruppo trattato con salina rispetto al gruppo trattato con MSC(42). Questo trattamento quindi direttamente o indirettamente favorirebbe la clearance batterica. Krasnodemskaya ha dimostrato che in un modello di polmonite da E. Coli la somministrazione intra tracheale di MSC riduce la crescita batterica nel BAL e nei preparati polmonari, mentre la simultanea somministrazione di un anticorpo neutralizzante il peptide LL-37 inibisce la clearance batterica. Nello studio di Kim un danno polmonare è stato indotto con somministrazione intra tracheale di E. Coli. Con la somministrazione di MSC dopo 3 ore si è notato rispetto al gruppo di controllo che a 7 giorni la sopravvivenza è più elevata, il danno polmonare ridotto, l'acqua polmonare, la conta batterica nel sangue e nel BAL diminuiti(43).

La disfunzione del microcircolo polmonare e delle cellule alveolari determinano un aumento della permeabilità vascolare, un infiltrato infiammatorio con edema e danno polmonare. Le MSC sono in grado di restaurare la normale funzione della barriera alveolo-capillare, ridurre la permeabilità vascolare, interagire con le cellule alveolari e diminuire la quantità di edema polmonare. Tali effetti sono in parte legati alla capacità dell MSC di differenziarsi in cellule epiteliali polmonari. Kotton (44)ha dimostrato che cellule staminali derivate da midollo osseo sono in grado di disporsi lungo l'epitelio alveolare ed esprimere marker caratteristici delle cellule epiteliali alveolari; si è inoltre notato che le cellule dell'alveolo polmonare originano da un precursore cellulare presente sia nel torrente ematico sia nel midollo osseo identificato con un marker CK5CXCR4 e tale marker di superficie è responsabile della rigenerazione del tessuto polmonare(45).

Tuttavia si ritiene che tali meccanismi occorrono tra l'1% e il 5%.

Il ruolo principale delle MSC nella rigenerazione del tessuto polmonare e nella riduzione

dell'edema è legato ai fattori paracrini. Le cellule staminali in corso di ALI sono in grado di produrre svariate sostanze che interagiscono con le cellule alveolo-capillari ristabilendo la normale funzione alveolare; ad esempio il keratinocyte growth factor (KGF), HGF, l'angiopoietina-1(46). Il KGF attraverso il pathway PI3K aumenterebbe la attività della pompa Na-K ATPasi incrementando l'espressione dei canali del sodio nelle cellule alveolari e riducendo quindi l'edema(47-48); l'angiopoietina potenzia la integrità della barriera vascolare modificando le molecole di adesione ed inibendo il legame e la successiva tras migrazione dei leucociti.

NOSTRA ESPERIENZA PRESSO L' ISTITUTO ZOOPROFILATTICO A.MIRRI DELLA REGIONE SICILIA

INTRODUZIONE

Nell'ambito della chirurgia sperimentale l'impiego di animali di piccola taglia per sperimentazioni in vivo è sempre maggiormente usata. Le tecniche di anestesia che richiedono anestesia generale con intubazione orotracheale sono ormai divenute momenti essenziali per il buon esito della sperimentazione(49).

L'intubazione orotracheale nel ratto è molto difficile a causa della taglia estremamente piccola dell'animale, delle strutture anatomiche di piccole dimensioni (cavità orale, epiglottide e corde vocali) per il passaggio di una protesi orotracheale e per la mancanza di specifica ed adatta strumentazione(50).

Noi descriviamo una tecnica semplice e rapida per l'intubazione orotracheale del ratto

L'animale viene premedicato in una camera di vetro; con l'aiuto di un laringoscopio con lama neonatale, una lunghetta ed un bastoncino di cotone, il ratto viene intubato con un tubo posizionato su guida metallica che ne facilita il posizionamento in trachea(51).

Le caratteristiche del tubo sono di cruciale importanza per l'intera tecnica, rendendola sicura, semplice, rapida ed economica. Noi abbiamo enfatizzato il ruolo della strumentazione tecnica (il tubo orotracheale) rispetto alla posizione che il ratto dovrebbe assumere che in letteratura è definito come un aspetto essenziale di tutta la procedura.

MATERIALI E METODI

Gli esperimenti sono stati condotti secondo i criteri dettati dal German Animal Protection Act del 1986. Tutti gli animali sono stati usati per chirurgia sperimentale sotto anestesia generale inalatoria. Settanta ratti (tra 25 e 30 settimana di vita) di peso compreso tra 400 e 500 grammi sono stati inclusi nel protocollo anestesilogico. Un tavolo chirurgico, una lunghetta ed un bastoncino di cotone, un ventilatore per piccoli animali, ossigeno ed isoflurane sono stati usati

I ratti sono stati premedicati con domitor 40 mcg/kg im e posti in una camera di vetro dove respirano una miscela di ossigeno ed isoflurane fino alla perdita del riflesso ciliare; vengono posti sul tavolo operatorio con la lunghetta di cotone che circonda gli incisivi superiori. L'anestesista si pone alla testa dell'animale. La cavità orale è aperta con il laringoscopio neonatale e la lingua spostata con l'ausilio del bastoncino di cotone. Viene identificata l'epiglottide e le corde vocali. Il tubo montato su guida metallica sottile ed atraumatica viene così avanzato direttamente in laringe e la guida viene rimossa. I ratti vengono collegati al sistema di ventilazione e grazie alle sincrone escursioni toraciche viene confermata l'intubazione.

I parametri ventilatori son stati i seguenti: frequenza respiratoria 55/min., tempo inspiratorio 30%, pressioni medie tra 9 e 15 cm H₂O, volume corrente 2ml/kg, modalità ventilatoria PCM, FiO₂ 50% con Isoflurane 2,5-3 %. Un sistema di evacuazione di gas era presente.

RISULTATI

Abbiamo intubato 70 ratti per chirurgia sperimentale addominale e sperimentazioni in vivo. Il tempo necessario per l'intubazione per un anestesista esperto è stato di 3-5 minuti.

Abbiamo osservato 5% di fallimento di intubazione orotracheale, assenza di danni alla cavità orale, alla laringe ed alla trachea.

DISCUSSIONE

L'intubazione orotracheale del ratto è stata descritta da vari autori in letteratura(52). Le problematiche relative a tale procedura si possono sintetizzare in tre aspetti: l'anatomia delle vie aeree superiori, la posizione dell'animale durante la procedura e la disponibilità e la scelta di materiale adeguato. Per ottenere una percentuale di successo pari al 90% l'intubazione orotracheale non può essere ottenuta con tecniche "alla cieca". Molte metodiche richiedono costi elevati e curve di apprendimento lunghe ed includono l'impiego di fibre ottiche, di specchi riflettenti montati sulla testa dell'operatore, di otoscopi, di un piano di metallo inclinato. La mini tracheotomia è complessa da un punto di vista tecnico. Kesel nel 1964 descrisse una tecnica di visualizzazione diretta dell'epiglottide e delle corde vocali con materiale apposito, ma l'incidenza di danni tissutali delle vie aeree superiori era elevata(53). Le tecniche alla cieca comportano molteplici tentativi risultanti in danni tissutali come edema e sanguinamenti. Kastle descrive un metodo semplice di intubazione attraverso la tecnica di Seldinger e l'ausilio di un tavolo particolare difficilmente riproducibile in tutti i laboratori sperimentali(54). L'impiego di fibre ottiche, di microscopi chirurgici, della tecnica della mini tracheotomia si rivelano di buona qualità, sicuri ed atraumatici ma si associano a costi elevati e lunghi training (55).

La tecnica da noi descritta rappresenta molteplici vantaggi: permette la visualizzazione diretta della laringe, evitando traumi e consentendo il buon esito dell'esperimento da laboratorio, enfatizza il ruolo di strumentazione ben nota ad un anestesista(tubo, laringoscopio, guida metallica) rispetto ad altri aspetti descritti in letteratura come la posizione dell'animale o l'impiego di strumentazione complessa; è semplice, veloce, rapida da apprendere, economica e facilmente riproducibile in tutti i laboratori.



Figura 14: Ratto intubato. Si noti la presenza di un filo guida atraumatico all'interno del tubo.

BIBLIOGRAFIA

1. Goodman RB, Pugin J, Lee JS et al. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. *Cytokine Growth factor Rev* 2003;14:523-525
2. Saguil A, Fargo M. Acute respiratory distress syndrome: Diagnosis and management. *Am Fam Physician* 85:352-358
3. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342:1334-1339
4. Crimi E, Slutsky AS. Inflammation and the acute respiratory distress syndrome. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2004;18:477-92
5. Villar J. What is the acute respiratory distress syndrome ? *Respir Care*. 2011;56:1539-45
6. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 2012;122:2731-2740
7. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 1967;2:319-323
8. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanism, relevant outcomes and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:818-824
9. Rubenfeld GD. Epidemiology of acute lung injury. *Crit Care Med* 2003;31(Suppl):S276-S284
10. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome and associated costs and care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-10
11. Garber BG, Hebert PC, Yelle J-D, Hodder RV, McGowan J. Adult respiratory distress syndrome: a systematic overview of incidence and risk factors. *Crit Care Med* 1996;24:687-695
12. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 2005;353:274-280
13. The ARDS Definition Task Force. Acute Respiratory distress syndrome. *JAMA*. 2012;307:2526-33

14. Murray JF, Matthay, M.A., Luce, J.M., et al. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *The American review of respiratory disease*. 1988;138:720-3.
15. Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med*. 2011;17(3-4):293-307. Epub 2010/11/04.
16. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2002;283(1):R7-28. Epub 2002/06/19.
17. Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Radella F, 2nd, Park DR, et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(10 Pt 1):1896-903. Epub 2001/12/06.
18. Soehnlein O, Oehmcke S, Ma X, Rothfuchs AG, Frithiof R, van Rooijen N, et al. Neutrophil degranulation mediates severe lung damage triggered by streptococcal M1 protein. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2008;32(2):405-12. Epub 2008/03/07.
19. Moss M, Gillespie MK, Ackerson L, Moore FA, Moore EE, Parsons PE. Endothelial cell activity varies in patients at risk for the adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 1996;24(11):1782-6. Epub 1996/11/01.
20. Puneet P, Moochhala S, Bhatia M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2005;288(1):L3-15. Epub 2004/12/14.
21. Perkins GD, McAuley DF, Thickett DR, Gao F. The beta-agonist lung injury trial (BALTI): a randomized placebo-controlled clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(3):281-7. Epub 2005/10/29.
22. Gao Smith F, Perkins GD, Gates S, Young D, McAuley DF, Tunnicliffe W, et al. Effect of intravenous beta-2 agonist treatment on clinical outcomes in acute respiratory distress syndrome (BALTI-2): a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet*. 2012;379(9812):229-35. Epub 2011/12/15.
23. Matthay MA, Brower RG, Carson S, Douglas IS, Eisner M, Hite D, et al. Randomized, placebo-controlled clinical trial of an aerosolized beta(2)-agonist for treatment of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(5):561-8. Epub 2011/05/13.
24. Zeiher BG, Artigas A, Vincent JL, Dmitrienko A, Jackson K, Thompson BT, et al. Neutrophil elastase inhibition in acute lung injury: results of the STRIVE study. *Crit Care Med*. 2004;32(8):1695-702. Epub 2004/08/03.

25. Boyle AJ, Sweeney RM, McAuley DF. Pharmacological treatments in ARDS; a state-of-the-art update. *BMC medicine*. 2013;11(1):166. Epub 2013/08/21.
26. Afshari A, Brok J, Moller AM, Wetterslev J. Inhaled nitric oxide for acute respiratory distress syndrome and acute lung injury in adults and children: a systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *Anesthesia and analgesia*. 2011;112(6):1411-21. Epub 2011/03/05.
27. Craig TR, Duffy MJ, Shyamsundar M, McDowell C, O'Kane CM, Elborn JS, et al. A randomized clinical trial of hydroxymethylglutaryl- coenzyme a reductase inhibition for acute lung injury (The HARP Study). *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(5):620-6. Epub 2010/09/28.
28. Network ARDS. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *NEJM*. 2000;342(18):1301.
29. Gattinoni L, Pesenti A, Bombino M, Baglioni S, Rivolta M, Rossi F, et al. Relationships between lung computed tomographic density, gas exchange, and PEEP in acute respiratory failure. *Anesthesiology*. 1988;69(6):824-32. Epub 1988/12/01.
30. Gattinoni L, Pesenti A. The concept of "baby lung". *Intensive Care Med*. 2005;31(6):776-84. Epub 2005/04/07.
31. Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006, 8:315–317.
32. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP: Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and tissues. *Transplantation* 1968, 6:230–247.
33. Hoffman AM, Paxson JA, Mazan MR, Davis AM, Tyagi S, Murthy S, Ingenito EP: Lung-derived mesenchymal stromal cell post-transplantation survival,persistence, paracrine expression, and repair of elastase-injured lung.*Stem Cells Dev* 2011, 20:1779–1792.
34. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R,Neutzel S, Sharkis SJ: Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001, 105:369–377
35. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG: Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin

- exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:8407–8411.
36. Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, Brigham KL: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005, 33:145–152.
 37. Lee JW, Fang X, Krasnodembskaya A, Howard JP, Matthay MA: Concise review: Mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors. *Stem Cells* 2011, 29:913–919. Ringe J, Strassburg S, Neumann K, et al. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem.* 2007; 101: 135–46.
 38. Liebler JM, Lutzko C, Banfalvi A, et al. Retention of human bone marrow-derived cells in murine lungs following bleomycin induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 295: L285–92.
 39. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet.* 2003;362: 697–703.
 40. Weiss DJ, Kolls JK, Ortiz LA, et al. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5: 637–67.
 41. Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, et al. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells.* 2010; 28: 2229–38.
 42. Mei SH, Haitsma JJ, Dos Santos CC, Deng Y, Lai PF, Slutsky AS, Liles WC, Stewart DJ: Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010, 182:1047–1057.
 43. Kim ES, Chang YS, Choi SJ, et al. Intratracheal transplantation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells attenuates *Escherichia coli*-induced acute lung injury in mice. *Respir Res.* 2011; 12: 108.
 44. Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development.* 2001,128: 5181–8.
 45. Gomperts BN, Belperio JA, Rao PN, et al. Circulating progenitor epithelial cells traffic via CXCR4/CXCL12 in response to airway injury. *J Immunol.* 2006; 176: 1916–27.
 46. Sartori C, Matthay MA. Alveolar Epithelial fluid transport in acute lung injury: new insights. *Eur Respir J.* 2002; 20: 1299–313

47. Guery BP, Mason CM, Dobard EP, et al. Keratinocyte growth factor increases transalveolar sodium reabsorption in normal and injured rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155: 1777–84.
48. Portnoy J, Curran-Everett D, Mason RJ. Keratinocyte growth factor stimulates alveolar type II cell proliferation through the extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-OH kinase pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004; 30: 901–7.
49. Alpert M, Goldstein D, and Triner L. Technique of endotracheal intubation in rats. *Lab Anim Sci* 32: 78–79, 1982.
50. Jou Im, Tsai Yt, Tsai Cl, Wu Mh, Chang Hy, Wang Ns. Simplified rat intubation using a new oropharyngeal intubation wedge. *J Appl Physiol* 89:1766-1770, 2000
51. Tomasello G, Sinagra E, Raimondo D, Palumbo VD, Puleio R, Cottone M, Damiani P, Traina G, Abruzzo A, Damiani F, Buscemi S, Noto M, Lo Monte AI. Validation of a modified model of TNBS-induced colitis in rats. How to induce a chemical colitis in rats. *Acta Biomed.* 2015 Apr 27;86(1):92-6.
52. Costa DI, Lehmann Jr, Harold Wm, Drew Rt. Transoral intubation of rodents using a fiberoptic laryngoscope. *Lab Anim Sci* 36:256-261, 1986
53. Kesel H. A simple aid in the intubation of small animals. *Lab Anim Care* 14:499-500, 1964.
54. Sigrid Kastl, U. Kotschenreuther, B. Hille, J. Schmidt, H. Gepp, and W. Hohenberger. Simplification of rat intubation on inclined metal plate. *Adv Physiol Educ* 28: 29–32, 2004;
55. Yasaki S and Dyck PJ. A simple method for rat endotracheal intubation. *Lab Anim Sci* 41: 620–622, 1991.