UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA
LABORATORIO DI ONCOLOGIA SPERIMENTALE E ISTOLOGIA

Modello epatico di organo coltura

1. Introduzione

I modelli di espianto d'organo offrono diversi vantaggi, rilevanti per gli studi dei meccanismi fisiopatologici, come danno cellulare, la secrezione, la differenziazione e lo sviluppo di neoplasie. Organi o piccoli espianti possono essere rimossi *in vivo* e mantenuti in coltura per lunghi periodi, se particolare attenzione è rivolta alla composizione dei mezzi di coltura, la selezione del substrato, e l'atmosfera di incubazione.

Nei tessuti umani, ottenuti da autopsia o da intervento chirurgico, ulteriore attenzione deve essere rivolta all'intervallo post-mortem, la temperatura, l'idratazione e la causa della morte.

Attualmente stiamo utilizzando nel nostro laboratorio, colture di espianto d'organo, invaso da tumori maligni, per stabilire la possibilità dell'azione diretta di agenti antineoplastici, in un ambiente cellulare, caratterizzato da vari tipi di cellule e tessuti, all'interno di un organo.

Ci proponiamo, in particolare, di studiare l'azione antineoplastica *in vivo,* di un integratore alimentare, il Citozym, prodotto dalla CITOZEATEC, S.r.l. (Peschiera Borromeo, Milano), del quale in pubblicazioni precedenti abbiamo evidenziato l'attività antineoplastica *in vitro* [**1**]. Il fine è di evitare la degradazione operata dall'ambiente gastrico, usando come bersaglio, direttamente l'organo colpito dal tumore. Tale sperimentazione dovrebbe fornire nuove evidenze, sull'alta efficienza della somministrazione dell'agente direttamente in circolo, che quindi dovrebbe risultare molto più attiva della usuale somministrazione orale. Ovviamente queste prove sperimentali saranno preziose per proporre un trial clinico futuro.

La parte preliminare di questo progetto, che presentiamo, è stata eseguita su due biopsie epatiche, ottenute dall' ablazione chirurgica di un carcinoma epatocellulare, di stadio III C (T3-N1-M0 – AJCC), in pazienti rispettivamente di anni 67 e 74.

Sulla base di una nostra precedente sperimentazione, effettuata su espianti epatici di topi C57BL/6 [**2**], il mezzo di coltura dell'espianto utilizzato è stato arricchito con una concentrazione finale di Citozym del 10 e del 15% .

2. Risultati Preliminari

2.1 preparazione degli espianti d'organo

L'espianto d'organo, prelevato e stato istologicamente definito come invaso da carcinoma epatocellulare di stadio III C. lavato con soluzione salina (PBS 2%) e posto in coltura in presenza di ossigenazione continua. E' stato valutato il volume della massa tumorale principale, ignorando i noduli più piccoli.

Si evidenzia che la fase successiva della sperimentazione, in corso di lavorazione, si centrerà su organi interi, prelevati immediatamente post-mortem, che verranno mantenuti vitali con perfusione attraverso la vena porta.

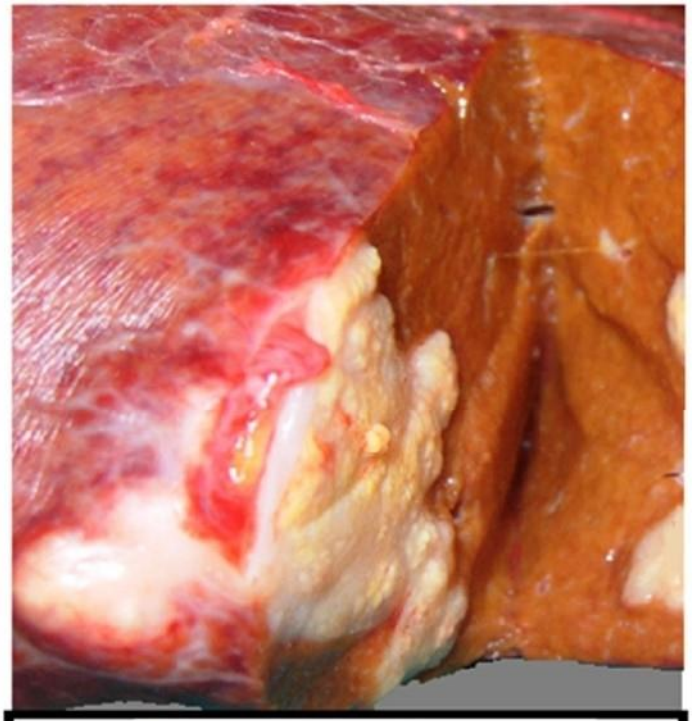


Figura 1. biopsia epatica

2.2 Coltura di espianti d'organo.

I mezzi di coltura utilizzati sono stati preliminarmente preparati in accordo con i dati ottenuti in un precedente lavoro in corso di stampa [2]. In Figura 1, un espianto epatico invaso da epatocarcinoma, è evidente la massa tumorale che appare immersa nel parenchima epatico.

2.3 valutazione della dimensione della massa tumorale e del danno cellulare

La prima fase del protocollo sperimentale compendia la valutazione iniziale della massa tumorale, espressa come volume parziale su volume totale della biopsia. Tale procedura è effettuata misurando con appositi specilli il diametro della massa tumorale, che appare sferoidale (figura 1). Tale misura è quindi rapportata al volume totale della biopsia.

I valori sono espressi in percentuale di invasione. La Figura 2, indica le variazioni percentuali del volume della massa tumorale in relazione al trattamento di coltura in presenza del 10% di Citozym. La concentrazione del 15% è risultata citotossica con livelli di LDH rilasciata superiori del 45%. E' stato possibile ridurre la massa tumorale del 37.5% ed estendere i tempi di coltura a 15 giorni, con valori di LDH inferiori del 20%, sulla base delle esperienze precedenti riportate sulla pubblicazione in corso di stampa [2].

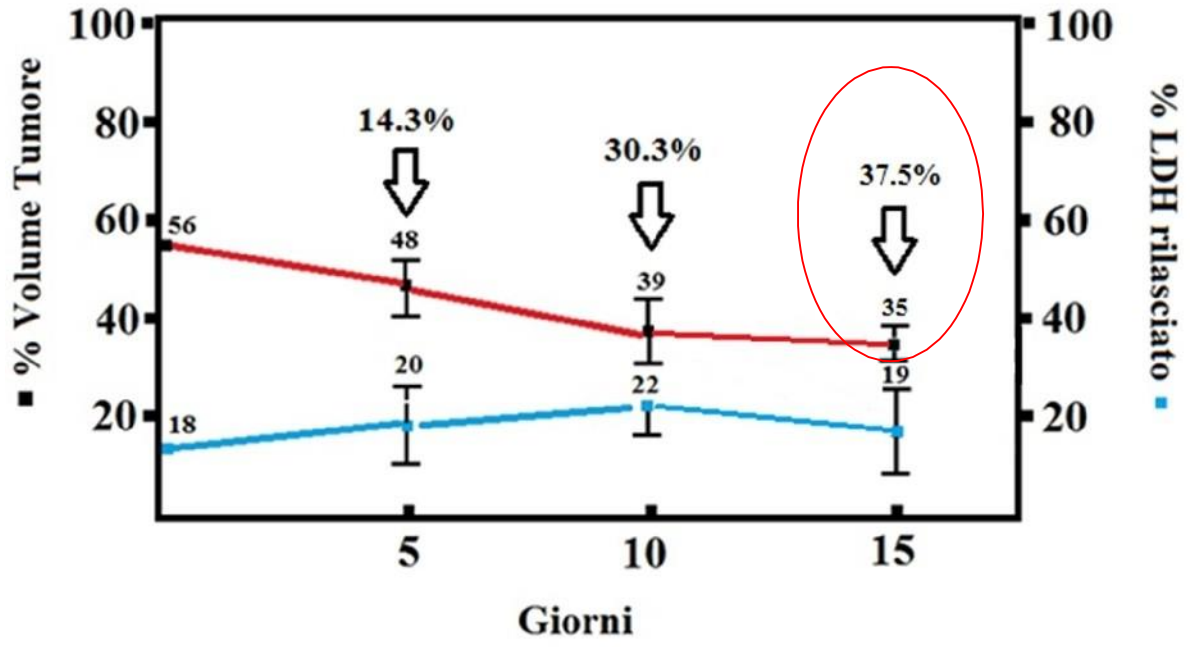


Figura 2. *Riduzione percentuale della massa tumorale durante i 15 giorni di trattamento dell'espianto di fegato con il 10% di Citozym nel mezzo di coltura. Valutazione del danno cellulare conseguente all'incubazione dell'espianto valutato tramite i livelli di LDH rilasciato nel mezzo.*

Questo risultato è stato possibile grazie alla composizione del terreno di coltura degli espianti e l'ossigenazione continua della coltura [2].

3. Parte successiva del programma sperimentale

Attualmente procediamo con la perfusione di organi interi, prelevati post-mortem su 4 pazienti portatori di carcinoma epatocellulare di stadio IV C.

I sistemi di perfusione adottati sono indicati nella figura 3.

La soluzione di trattamento ha una concentrazione

in Citozym del 15% [(1)]. Preliminare al trattamento è la pre-perfusione con soluzione fisiologica, eparina, HEPES e antibiotici. Tale metodica permette di mantenere vitale l'organo per periodi sufficienti per poter valutare eventuli riduzione di volume dei noduli tumorali.

(1) Necessaria a causa della diluizione operata dalla perfusione

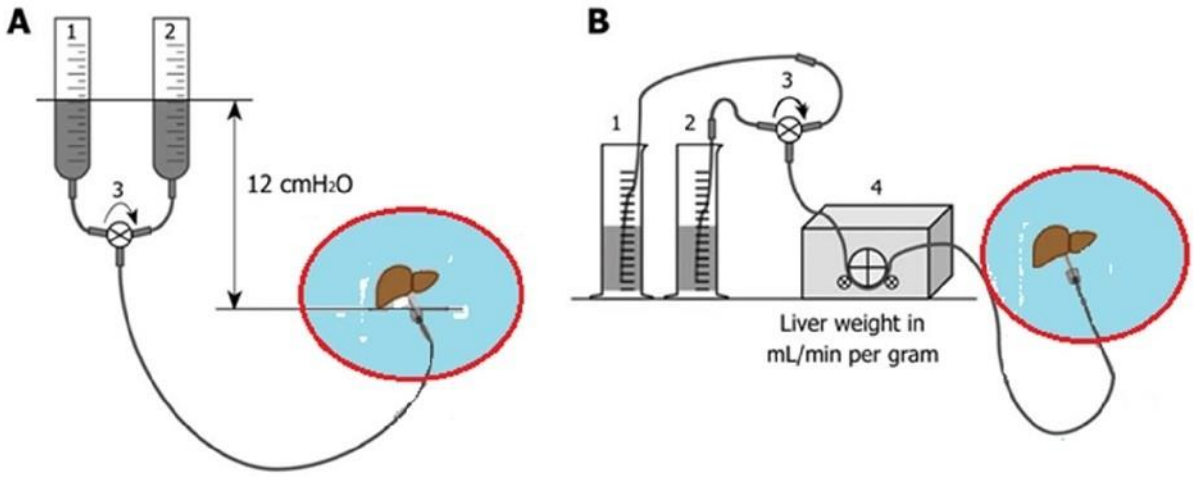


Figura 3. *Diagramma schematico raffigurante le diverse e più frequentemente utilizzati metodi di perfusione-trattamento, per il tessuto epatico.* ***A****: Perfusione e trattamento a gravità-mediata, utilizzando la pressione dell'acqua a 12 cm: (1) buffer di pre-perfusione; (2) soluzione di trattamento; (3) Sistema di tri-valvola, che facilita la commutazione tra le due soluzioni; e (4) incannulamento della vena porta;* ***B****: Pompa di perfusione a un flusso di 1 ml / g tessuto epatico: (1) buffer di pre-perfusione; (2) soluzione trattamento; (3) Sistema di tri-valvola; (4) pompa peristaltica a basso flusso; e (5) incannulamento della vena porta.*

4. Conclusioni.

Mantenere vitali organi invasi da neoplasie, prelevati post-mortem, permette di poter studiare i parametri correlati con la potenziale attività antineoplastica di un agente, in condizioni molto simili a quelle che si riscontrano nell'organismo umano. La perfusione con soluzioni nutritive, mima entro certi limiti, la perfusione ematica, apportando tutti i

nutrienti necessari per mantenere vitale il tessuto e irrorare la massa tumorale. La metodica da noi utilizzata nella sperimentazione, può dimostrare in maniera inequivocabile, l'attività antitumorale della miscela di componenti che caratterizza il Citozym, superando i limiti, il più delle volte contestati, della coltura tumorale *in vitro* o l'uso di animali, indubbiamente lontani dal modello umano. I risultati preliminari, che presentiamo dimostrano, come la coltura di un espianto epatico invaso da un carcinoma epatocellulare, ha permesso di evidenziare l'attività antiproliferativa di una soluzione di Citozym, a bassa concentrazione, sulla massa tumorale. In conclusione, si può affermare che il modello proposto permette di ottenere risultati sicuramente più attendibili che potranno essere molto utili per lo studio dei meccanismi molecolari, alla base dell'attività antineoplastica del Citozym.

Bibliografia:

[1] *Antonelli F and Beninati S. Enhanced survival of B16-F10 melanoma tumour- bearing C57BL6/N mice treated with a mixture of antioxidants in: Recent Res Devel in Life Sci. Research Signpost, Trivandrum India.2011;5:51-60*

[2] *Torricelli et al. Organ Culture Model of Liver for the Study of Cancer Treatment for Hepatocellular Carcinoma. Cancer Research Journal 2016* ***in press****].*

Prof. Simone Bennati

Roma 07/03/2016

Dott. Francesco Antonelli