

## Relazione Programma di ricerca STM

Nell'ambito del programma "Short-term mobility" del CNR, ho sviluppato il progetto di ricerca "Analisi della citotossicità di farmaci antitumorali in epatociti primari umani sani" nell'arco di tempo che va dal 9 al 30 settembre 2015, presso il laboratorio di Cell Transplantation and Regenerative Medicine Department of Laboratory Medicine, Pathology, F56 Karolinska Institutet Stockholm Sweden 141-86, diretto dal professor Stephen Strom. Durante questo periodo ho condotto degli esperimenti per valutare su epatociti primari umani sani la citotossicità di alcuni farmaci e composti naturali che hanno attività antitumorali su cellule di epatocarcinoma, come evidenziato da studi in corso presso l'IBIM-CNR di Palermo. Il laboratorio ospitante del Karolinska Institutet settimanalmente ha disponibilità di pezzi chirurgici di fegato umano da resezione o da espianti. Da questi pezzi tissutali sono stati isolati gli epatociti, secondo la metodologia già da tempo messa a punto nel laboratorio ospitante. In breve, i principali vasi epatici vengono incannulati e suturati, quindi il tessuto viene perfuso mediante l'ausilio di una pompa peristaltica. La perfusione prevede tre fasi caratterizzate dall'uso di tre soluzioni diverse: 1- Hank's balanced salt solution (HBSS; senza calcio, magnesio, e rosso fenolo; Lonza), per lavare via le cellule ematopoietiche presenti nel tessuto; 2- HBSS supplementato con EGTA, chelante del Calcio, per rendere più deboli le giunzioni intracellulari; 3- EMEM supplementato di collagenase per la completa digestione e dissociazione del tessuto. Successivamente viene eseguita la rottura meccanica del tessuto mediante un paio di forbici sterili. Infine, l'omogenato ottenuto si filtra attraverso una garza per eliminare i detriti e pezzi tissutali non dissociati e ottenere una sospensione cellulare ancora eterogenea. L'arricchimento in epatociti si ottiene attraverso tre successive centrifugazioni sequenziali a bassa velocità ( $85-90 \times g$ ). La metodica non è semplice e spesso si osserva una grande variabilità nella resa e nella qualità finale degli epatociti. Alla fine di ogni isolamento di epatociti viene valutata immediatamente la vitalità cellulare contando le cellule in camera di Thoma dopo colorazione con il colorante Trypan blue. Dalla vitalità cellulare dipende anche l'indice di sopravvivenza "in vitro" degli epatociti. Per le successive analisi di citotossicità dei diversi farmaci/composti, gli epatociti purificati vengono piastrati in numero di 80000/pozzetto, in piastre da 96 pozzetti. Dopo 24 ore si sostituisce il terreno di coltura e solo dopo 48 ore è possibile iniziare i trattamenti. Le cellule sono state trattate con sorafenib (inibitore delle chinasi Raf), SC66 (inibitore della chinasi AKT), IWR-1 endo (inibitore delle tanchirasi), NVP-AUY922 (inibitore della proteina HSP90), ixazomib (inibitore del proteasoma), oleocanthal (una molecola naturale isolata dagli olii extravergine di oliva). Sono stati eseguiti esperimenti di dose- e tempo-risposta fino a 72 ore di trattamento con i diversi inibitori/composti. In particolare, dopo 24, 48 e 72 ore è stata valutata la vitalità degli epatociti, utilizzando un saggio luminescente di vitalità cellulare (CellTiter-Glo®, Promega) che determina il numero di cellule vitali basandosi sulla quantificazione della ATP intracellulare, un indicatore di cellule metabolicamente attive. I valori di luminescenza ottenuti sono stati normalizzati sul numero di cellule presenti, il cui valore è dato come quantità di DNA. In ultimo, infatti, viene eseguito il saggio in fluorescenza del PicoGreen per la misurazione del DNA. I dati ottenuti dopo 24 ore di trattamento sono mostrati negli istogrammi di Figura 1. Come è possibile osservare i farmaci usati non influenzano la vitalità degli epatociti, se non in alcuni casi alle concentrazioni più alte. Fa eccezione il sorafenib che invece risulta molto tossico alle concentrazioni superiori a  $5 \mu\text{M}$ .

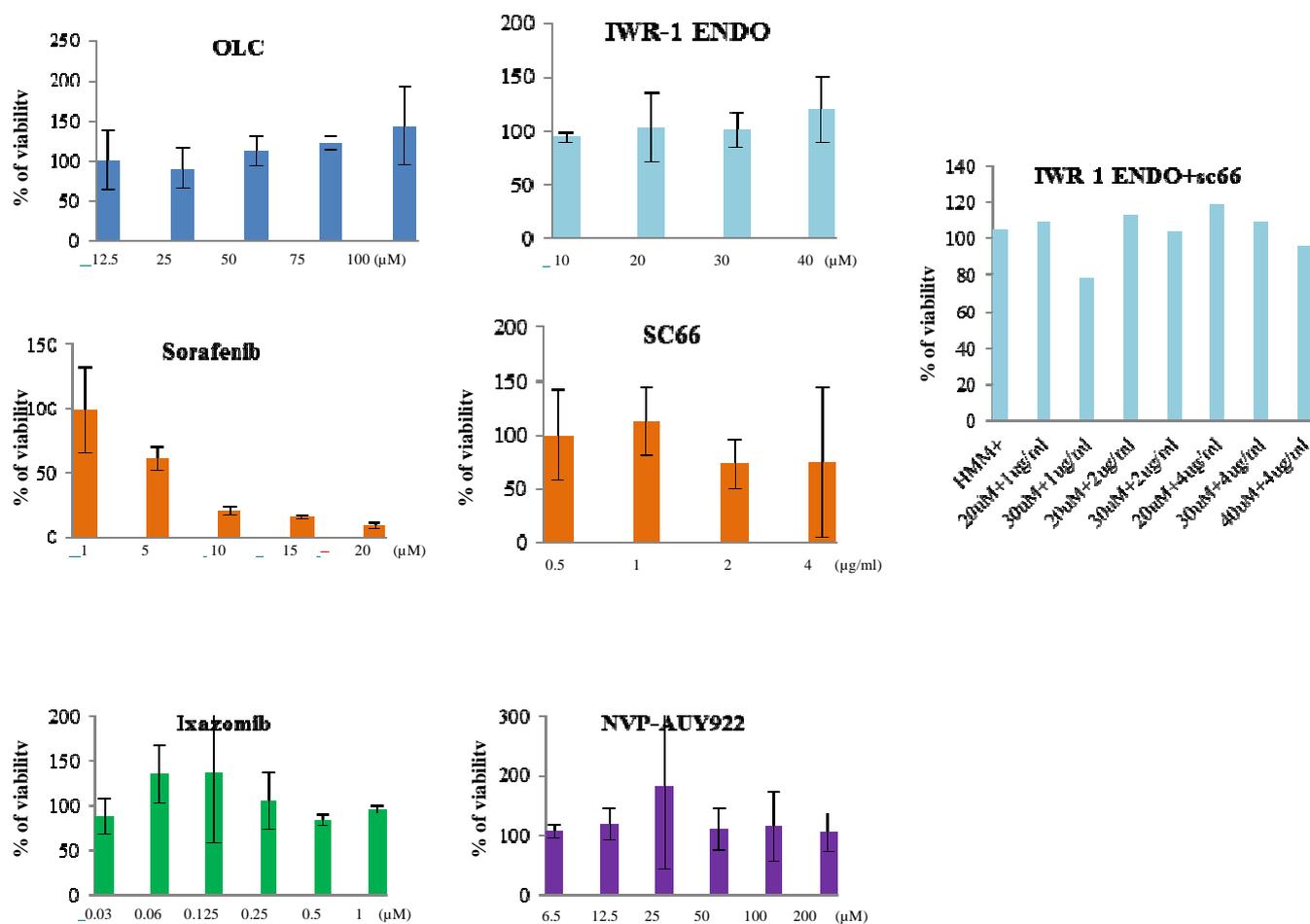


Figura 1. Saggi di vitalità-Istogrammi della vitalità degli epatociti primari valutata mediante saggio Cell Titer dopo 24 ore di trattamento con Oleocantale (OLC), IWR-1 ENDO, Sorafenib, SC66, Ixazomib ed NVP-AUY922 I dati mostrati sono espressi come percentuale di vitalità cellulare rispetto al controllo non trattato.

Oltre alla vitalità cellulare è stata anche valutata la funzionalità degli epatociti, misurando l'attività dei citocromi CYP1A1/1A2 e CYP450.

Gli epatociti vengono incubati con i farmaci sopraindicati e con degli induttori specifici dei citocromi, usati come controllo positivo (25 mM b-naphthoflavone (BNF) per i citocromi P450 CYP1A1 e 1A2; 10 mM rifampicin (Rif) o 1 mM phenobarbital (PB) per CYP3A4. La misurazione dell'attività dei citocromi CYP1A1/1A2 viene eseguita mediante saggio EROD, saggio fluorescente che si basa sulla conversione microsomale della ethoxyresorufin in resorufin. L'attività del citocromo CYP3A4 viene misurata attraverso il saggio luminescente CYP450-glo (Promega). Le attività dei citocromi sono state misurate dopo 48 ore di trattamento. I risultati ottenuti sono mostrati nella Figura 2

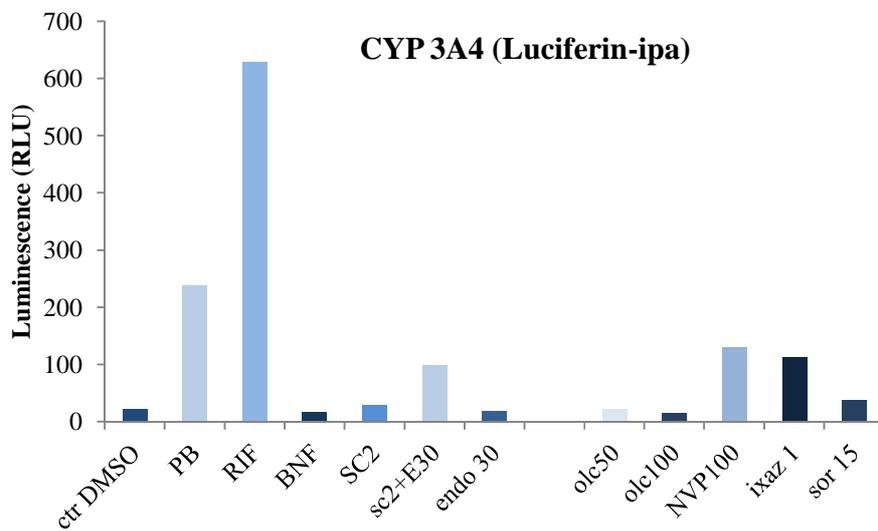
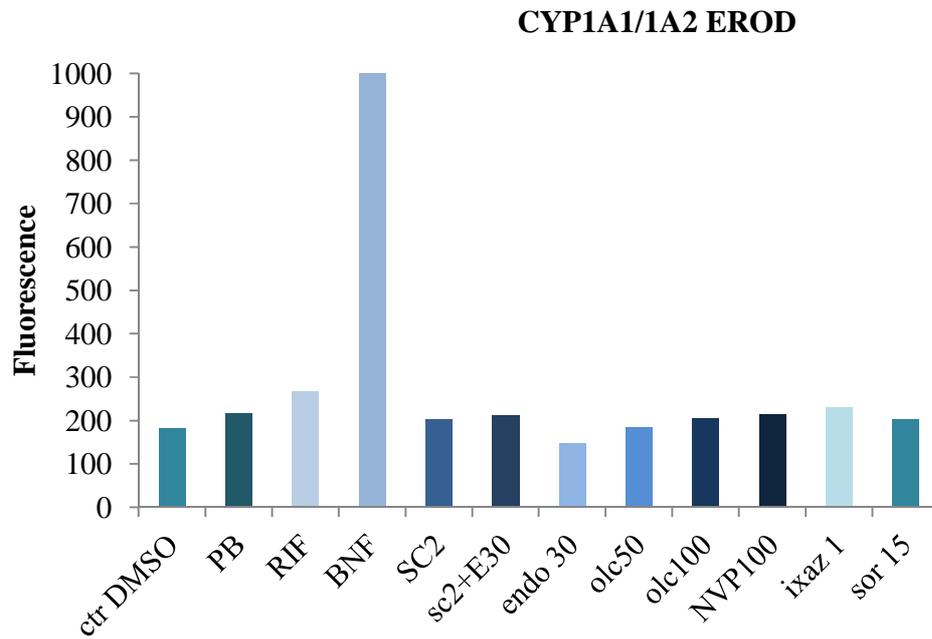


Figura 2. Funzioni metaboliche di epatociti in coltura. Istogrammi della funzionalità metabolica degli epatociti primari dopo trattamento con i farmaci indicati, valutata attraverso la funzionalità dei citocromi CYP1A1/1A2 (EROD) e del citocromo CYP3A4 (CYP 3A4 (Luciferin-ipa)).

Come è possibile osservare gli epatociti rispondono bene all'induzione con BNF incrementando l'attività dei citocromi CYP1A1/1A2, e all'induzione con PB e RIF incrementando l'attività dei citocromi CYP3A4. La capacità di indurre l'espressione di questi CYP è una prova robusta della capacità delle cellule in coltura di essere pienamente funzionali e di rispondere agli stimoli, con substrati CYP specifici, aumento il loro metabolismo . Il trattamento con i vari farmaci non sembra alterare il metabolismo dei CYP1A1 e 1A2, mentre il CYP3A4 risulta stimolato da NVP-AUY922, ixazomib e dalla combinazione di SC66 con ENDO, facendo ipotizzare che questi farmaci siano substrati del citocromo CYP3A4.

In conclusione, sebbene i dati siano preliminari, i saggi condotti durante questo periodo di attività svolta nell'ambito del programma "Short term mobility" ci portano ad affermare che i farmaci e i composti naturali studiati e in uso come antitumorali non risultano essere tossici per gli epatociti primari isolati da fegato sano. Come già concordato con il gruppo di Stoccolma altri saggi saranno condotti per aumentare la casistica ed ovviare alla variabilità genetica di popolazione dei campioni analizzati.