



AISF

ASSOCIAZIONE ITALIANA PER LO STUDIO DEL FEGATO

(Associazione riconosciuta con D.M. del 7.5.1998, G.U. del 20.6.1998)

RELAZIONI BORSE DI STUDIO FINALIZZATE

A.I.S.F. 2009

(con il supporto della Monotematica 2008 - Firenze)

Certificata UNI EN ISO 9001:2008



Segreteria A.I.S.F.: Via Alfredo Catalani, 39 • 00199 ROMA • Tel. e Fax: (++39) 06.86399303

E-mail: info@webaisf.org • <http://www.webaisf.org>

Sede legale: Via G. Nicotera, 29 • 00195 ROMA • Cod. Fisc.: 97088670589

“Ruolo della traslocazione batterica nella progressione delle epatopatie”

(Dott. Marco Brogi, Firenze)

Nel corso di questo primo anno è stato valutato quantitativamente e qualitativamente il grado di coinvolgimento del fegato in corso di ileite terminale nel modello sperimentale SAMP1/YitFc e l'evoluzione della patologia in relazione all'età (4, 10, 20, 40 e 60 settimane) ed al sesso degli animali. Sono state preparate sezioni istologiche colorate con ematossilina-eosina per l'analisi morfologica delle sezioni (4 µm). Lo score è stato fatto classificando le sezioni istologiche secondo due indici rappresentanti la severità e l'estensione delle lesioni infiammatorie: Indice Portale (coinvolgimento portale e biliare) e Indice Lobulare (coinvolgimento lobulare e steatosi). Per ogni categoria i campioni di tessuto sono stati classificati con un punteggio da zero (normale) a 4 (severo); il grado di severità è stato poi moltiplicato per un indice rappresentante l'estensione della malattia, da 1 (sino al 25% dell'area coinvolta) a 4 (>75% dell'area coinvolta). Lo score infiammatorio totale è stato quindi calcolato dalla somma di questi due indici. I risultati hanno dimostrato un quadro infiammatorio dinamico, tempo dipendente, con insorgenza epatica precoce (4 settimane) rispetto all'infiammazione intestinale (10 settimane) (Figura 1). Nel corso dell'evoluzione temporale del coinvolgimento epatico sono state osservate variazioni nella localizzazione delle lesioni: a 4 settimane si osserva un maggiore coinvolgimento della zona portale rispetto alla zona lobulare; a 10 settimane l'interessamento delle 2 aree è analogo, ma dalla 20 settimana ed ancora di più alla 40 settimana, si ha una tendenza alla remissione dell'infiammazione lobulare ed un peggioramento di quella portale, con maggiore interessamento dei dotti biliari. In alcuni topi di 60 settimane è stata osservata la presenza di un esteso infiltrato infiammatorio, accompagnato da una notevole distruzione/neo-generazione di dotti biliari, tale da stravolgere completamente la normale architettura del lobulo epatico. Per valutarne l'incidenza di questa manifestazione sono stati sacrificati 98 topi di 60 settimane, riscontrando il quadro infiammatorio appena descritto in 28 animali (Figura 2). Successivamente sono stati isolati linfociti da fegato (previa perfusione della vena cava con HBSS) e da MLN (mesenteric lymphnode), incubati con anticorpi marcati con fluorocromi e analizzati in citofluorimetria (FACS analisi). Sono stati utilizzati topi SAMP1/YitFc e topi di controllo (AKR) appaiati per età (4, 10, 20 e 40 settimane). I dati ottenuti mostrano che la percentuale di linfociti T intraepatici CD8⁺ dei topi SAMP1/YitFc di età più avanzata, dove sia l'ileite che le lesioni epatiche sono conclamate, sono significativamente aumentate rispetto ai linfociti CD8⁺ misurati nell'MLN degli stessi topi (21.5 ± 0.7% vs. 7.7 ± 0.5%, $p < 0.05$) (Tabella 1). Comunque la percentuale di linfociti T CD8⁺ intraepatici non cambia significativamente nel tempo, con il progredire della patologia (4 – 40 settimane) (Tabella 1) e non

è risultata significativamente diversa da quella dei topi di controllo AKR, appaiati per età (Tabella 2). Inoltre abbiamo osservato che i linfociti T CD4⁺ sono cruciali per l'innescò e la progressione sia del fenotipo infiammatorio epatico, che per lo sviluppo di ileite nei topi SAMP1/YitFc. Infatti nei topi giovani (4 settimane) la percentuale di linfociti T CD4⁺ è maggiore (28,9% + 1,4%) rispetto a quella misurata nell'MLN (2,5 + 0,4%) (Tabella 1). Questa tendenza continua sino alla quarantesima settimana di età nei topi con patologia epatica (49,9 + 2,5%) ed intestinale (20,0 + 0,8%) (Tabella 1). Questa espansione precoce (4 settimane) di linfociti T CD4⁺ intraepatici coincide con le osservazioni istologiche dei fegati di questi topi, in cui l'infiammazione epatica precede quella intestinale (10 settimane). Comunque, dato che la severità dell'infiammazione aumenta col progredire della malattia, la popolazione di linfociti T CD4⁺ continua ad espandersi, sia nel fegato che nell'ileo. Infatti la FACS analisi dei linfociti T CD4⁺ isolati da fegato di topi SAMP1/YitFc esprimono un profilo consistente di attivazione cellulare, con un significativo incremento, nei topi di giovane età, di CD25, CD69, CD44 e CD62L in confronto con i topi di controllo AKR della stessa età; eccezione fatta per il CD69, il sopracitato marker di attivazione dei linfociti T CD4⁺, che si mantiene costante durante la progressione dell'infiammazione (fino alla 40a settimana) (Tabella 2).

In generale, i linfociti T CD4⁺ CD44^{hi} ed i linfociti T CD4⁺ CD62L^{lo} erano significativamente aumentati nei SAMP1/YitFc rispetto agli AKR di controllo, indicando che tali linfociti non solo hanno un fenotipo attivato, ma che fungono anche da linfociti memoria. E' interessante notare che i linfociti CD4⁺ del fegato dei topi SAMP1/YitFc, ma non quelli dell'MLN, esprimono bassi livelli di CD49d (integrina α_4) e β_7 rispetto agli AKR, durante il corso della malattia, nonostante che un significativo incremento in CD49d si osservi nel fegato di topi di 40 settimane. Queste informazioni indicano che differenti pattern di homing linfocitario (es. VCAM-1 e β_7 mediato) possono caratterizzare e differenziare il fenotipo dell'ileite e dell'infiammazione del fegato osservate nei topi SAMP1/YitFc.

Infine è interessante osservare come nella totalità dei linfociti isolati dal fegato dei topi SAMP1/YitFc, la percentuale di cellule CD19⁺ (linfociti B) sia minore rispetto a quella dei topi di controllo AKR, sia negli animali di 4 settimane (23,3 + 0,6% vs. 39,3 + 5,0%, $p < 0.033$) che durante il decorso della malattia, sino alla 40a settimana (20,2 + 1,6% vs. 43,9 + 5,3%) (Tabella 2). Questo dato è in contrapposizione con quello osservato nell'MLN dei topi SAMP1/YitFc, in cui un si ha una significativa espansione di linfociti B e correla con la severità dell'ileite⁴⁰. Infatti la percentuale di linfociti B nell'MLN di topi SAMP1/YitFc durante la fase conclamata della malattia (40 settimane), sono simili a quelle osservate nei fegati dei topi AKR della stessa età (42,0 + 4% vs. 43,9 + 5,3%) (Tabella 1 e 2).

Da fegati di topi SAMP1/YitFc e AKR di 4 e 10 settimane e' stato isolato e retrotrascritto RNA. Il cDNA ottenuto e' stato utilizzato per valutare l'espressione di vari geni mediante qRT-PCR. Abbiamo studiato l'espressione di un pannello di citochine (IFN, TNF, IL2, IL4, IL5, IL10, IL13, IL18) e delle proteine dell'immunità innata (TLR2, TLR4, TLR5, TLR9),. I risultati mostrati come 'fold increase' di 10 settimane rispetto ai 4 settimane sono riassunti nel grafico 2. E' emerso che a 10 settimane vi è una notevole overespressione del TLR9 e dei TLR2 e 4, seppur in misura minore (Figura 3).

Per quanto riguarda l'espressione delle citochine, sempre a 10 settimane vi è un importante aumento dei livelli di IFN γ e TNF tipico della risposta infiammatoria di tipo Th1.

Figura 1. Grafici rappresentanti gli score di ileo e fegato a diversi time point: 4, 10, 20, 40 e 60 settimane. Nel grafico **A** sono mostrati lo score dell'ileo, della zona portale e lobulare in maschi e femmine, mentre nel grafico **B** e' mostrata la media complessiva tra tutti gli animale della stessa età. Il grafico **C** mostra l'andamento temporale dell'infiammazione nell'ileo e nel fegato (media dell'area portale e della zona lobulare) in maschi e femmine. Nel grafico **D** si ha la media complessiva degli animali nell'ileo e nel fegato.

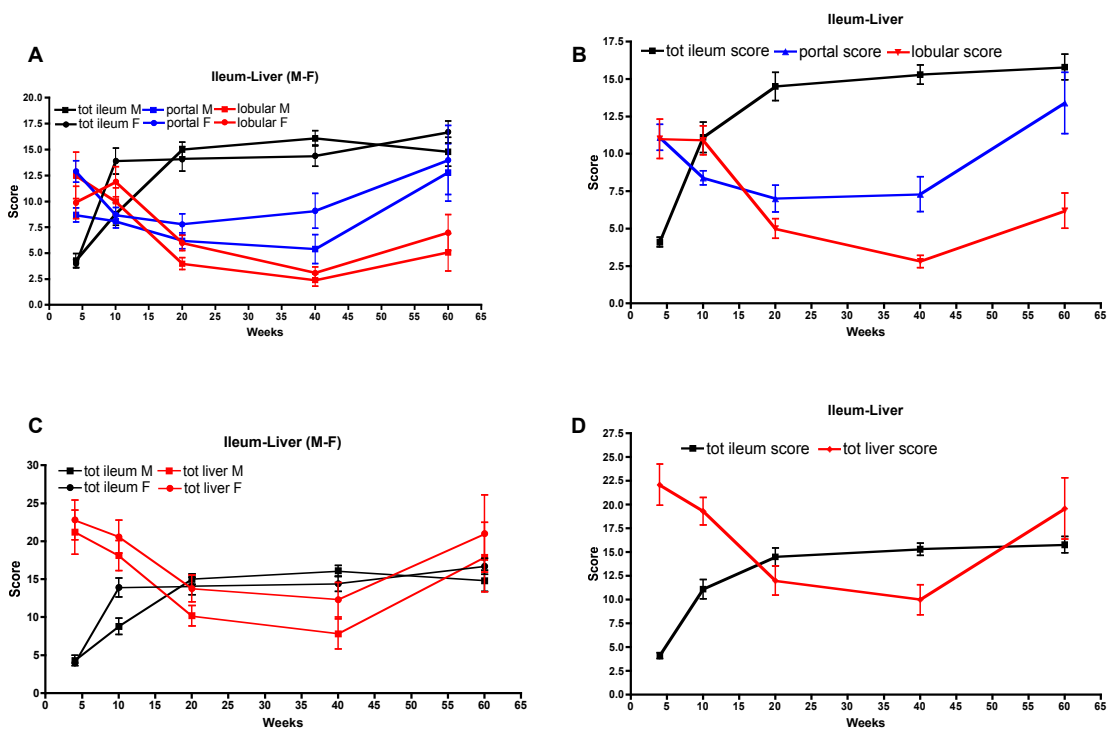


Figura 2. Immagini istologiche di fegati di topi SAMP1/YitFc di 60 settimane: A) Infiltrato infiammatorio emorragico; B) Infiltrato infiammatorio con reazione duttulare; C) Servera extravasazione linfocitaria con aspetti linfomatosi (D).

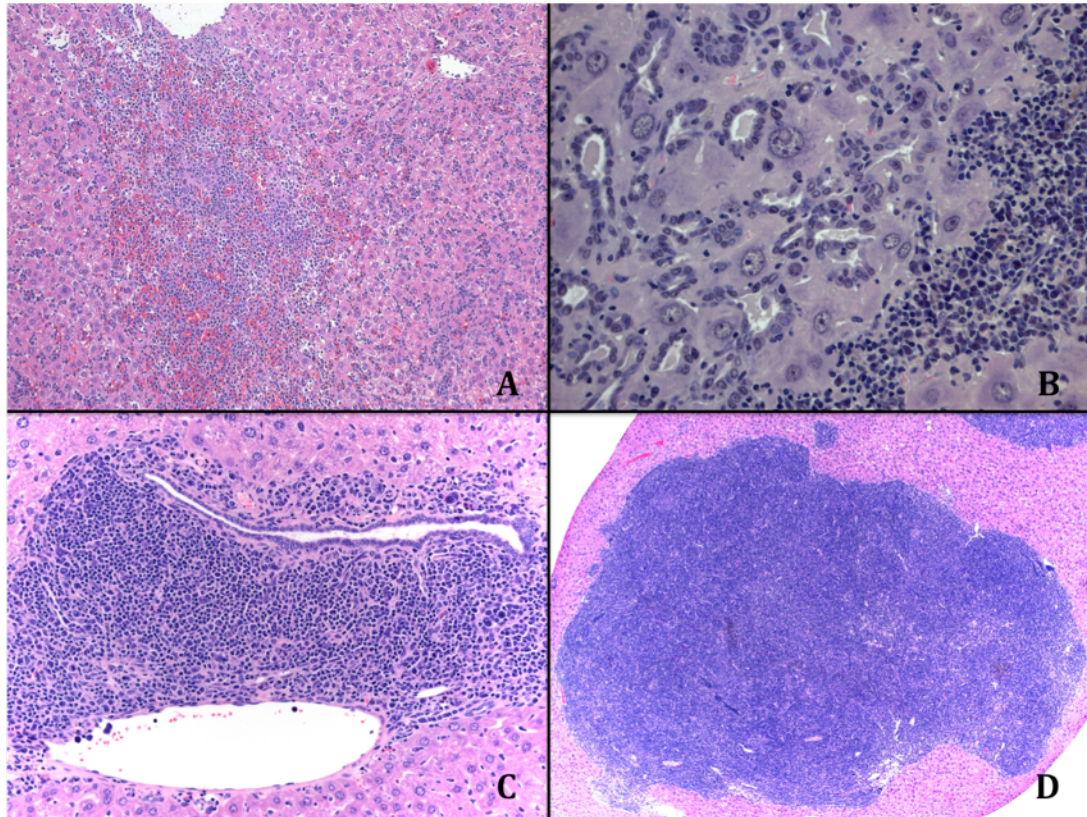


Figura 3. Il grafico mostra in fold increase l'espressione delle citochine e dei TLRs studiati mediante Real-Time PCR

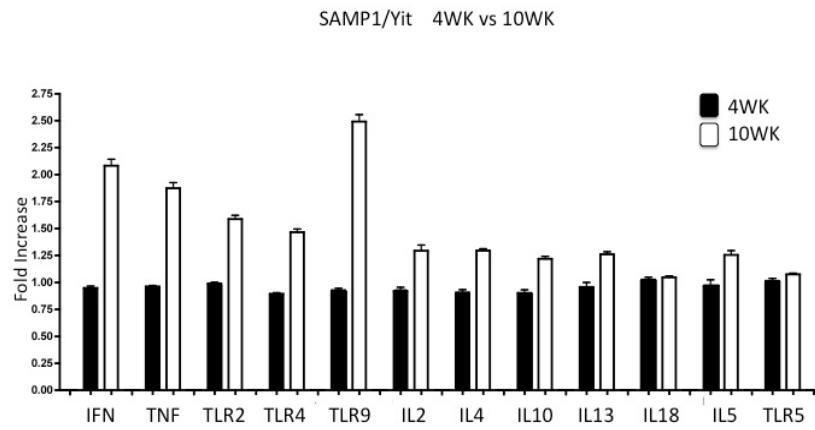


Tabella 1. Risultati della FACS analisi eseguita su linfociti isolati da fegato ed MLN di topi SAMP1/YitFC di 4 settimane (giovani) e di oltre 20 settimane (vecchi). A) L'espressione dei marker di superficie e' maggiore nella popolazione di linfociti epatici rispetto a quella dell'MLN. B) L'espressione dei marker di superficie e' minore nella popolazione di linfociti epatici rispetto a quella dell'MLN. C) non vi e' differenza di espressione tra i marker di superficie nella popolazione di linfociti epatici e quella dell'MLN.

Marker cellulari di superficie	Topi giovani (4 settimane)			Topi vecchi (>20 settimane)		
	Fegato	MLN	Trend	Fegato	MLN	Trend
CD8	18.3% $\pm$ 1.3 %	ND	-	21.5% $\pm$ 0.69%	7.7% $\pm$ 0.5%	
CD19	23.3 % $\pm$ 0.5%	ND	-	20.59 $\pm$ 1.58%	42% $\pm$ 4%	↓
CD4	28.9% $\pm$ 1.4%	2.5% $\pm$ 0.4%	↑ ^A	28.9% $\pm$ 1.45%	20 $\pm$ 0.8%	- _C
CD4CD25	6.86 $\pm$ 1.6 %	2.3% $\pm$ 0.25%	↑	6.87% $\pm$ 1.63%	15.1 $\pm$ 1.1%	↓
CD4CD69	5.28 $\pm$ 0.09%	29% $\pm$ 2%	↓ ^B	10.1% $\pm$ 0.65%	10% $\pm$ 3%	-
CD4CD62L	23.9% $\pm$ 1.73%	47 % $\pm$ 14%	↓	27.2% $\pm$ 1.06%	26% $\pm$ 4%	-
CD4CD44	10.08% $\pm$ 2%	22%	↓	11.6 % $\pm$ 0.48%	12% $\pm$ 3%	-
CD49 β 7	26.65 $\pm$ 5.13%	13%	↑	17.6% $\pm$ 0.63%	ND	-

Tabella 2. Risultati della FACS analisi eseguita su linfociti isolati da fegato di topi SAMP1/YitFC ed AKR di 4, 10, 20 e 40 settimane

Cell surface marker	4 weeks		P value	10 weeks		P value	20 weeks		P value	40 weeks		P value
	SAMP	AKR		SAMP	AKR		SAMP	AKR		SAMP	AKR	
CD8	18.3±1.4	12.9±2.6	ns	18.4±1.6	12.6±0.7	0.009	21.0±3.6	11.2±0.5	ns	21.5±0.7	18.7±2.1	ns
CD19	23.3±0.6	39.3±5.0	0.033*	15.9±1.7	44.2±2.4	0.03*	19.3±5.3	45.6±1.4	0.008*	20.2±1.6	43.9±5.3	0.012*
CD4	28.9±1.5	18.5±0.8	0.003*	42.7±2.6	25.5±2.6	0.006*	39.3±1.8	24.3±1.6	0.004*	42.9±1.6	18.2±2.4	0.002*
CD4 CD25	6.8±1.6	0.8±0.1	0.021*	9.3±1.3	3.9±1.4	0.044*	8.5±1.3	1.3±0.4	0.007*	2.3±0.2	0.4±0.3	0.001*
CD4CD69	5.2±0.1	3.0±0.4	0.036*	ND	ND	ND	6.9±0.3	5.1±1.0	ns	10.1±0.6	9.5±0.8	ns
CD4CD44	29.9±2.0	18.0±0.5	0.029*	44.2±3.7	23.0±0.7	0.03*	41.1±0.3	21.0±1.4	0.005*	40.3±3.8	16.5±2.2	0.012*
CD4CD44hi	10.0±1.3	2.8±0.4	0.031*	11.0±1.0	4.5±0.4	0.02*	12.9±3.4	4.6±0.8	ns	11.6±0.5	6.8±0.4	0.004*
CD4CD44lo	19.8±3.3	15.2±0.9	ns	33.2±4.3	16.1±0.9	ns	28.2±3.1	16.3±1.4	ns	28.7±4.2	9.6±2.6	0.029
CD4CD62L	24.0±1.7	18.7±1.1	0.08*	34.6±3.7	21.0±0.7	0.06*	28.1±3.0	16.3±1.9	ns	27.3±1.1	5.4±0.9	0.0006*
CD4CD62Lhi	5.5±2.2	7.3 ±0.8	ns	8.7±3.8	8.3±2.0	ns	1.3±1.1	2.5±0.6	ns	7.2±2.8	0.2±0.1	ns
CD4CD62Llo	18.4±3.9	11.3±0.7	ns	25.8±1.1	12.6±1.6	0.006*	26.7±2.0	13.8±1.4	ns	20.0±2.6	5.1±0.9	0.03*
CD4CD49	22.9±1.6	24.3±1.2	ns	34.5±5.4	14.0±2.8	ns	27.2±3.6	16.5±1.6	ns	20.2±0.6	9.7±1.2	0.017*
CD49dβ7	26.6±5.1	53.7±3.5	0.02	25.9±2.1	20.0±2.7	ns	12.8±1.5	49.9±9.2	ns	17.6±2.3	28.1±3.1	ns

RUOLO DELLA TRASLOCAZIONE BATTERICA NELLA PROGRESSIONE DELLE EPATOPATIE.

(Dr.ssa Chiara Rychlicki, Ancona)

INTRODUZIONE

La Steatosi Epatica Non Alcolica (NAFLD) rappresenta una delle principali cause di epatopatia al mondo. La potenziale evoluzione verso la NASH, la fibrosi epatica e persino il cancro fanno della NAFLD una patologia di crescente interesse scientifico.

In aggiunta ai diversi fattori coinvolti nel processo della fibrogenesi epatica e della sua evoluzione, anche l'obesità, con la conseguente steatosi epatica, sembra essere un fattore responsabile della progressione del danno epatico.

Evidenze scientifiche hanno dimostrato la presenza di una differente composizione della flora batterica intestinale fra topi magri e topi obesi, mostrando che la flora batterica "tipica" dei topi obesi possiede una capacità elevata di ricavare energia dagli alimenti e quindi di accumulare tessuto adiposo in eccesso. Studi recenti hanno inoltre dimostrato il coinvolgimento diretto della flora batterica intestinale nella regolazione di alcuni meccanismi fisiopatologici dell'organismo, introducendo il concetto di traslocazione batterica. D'altro canto, è stato dimostrato che le endotossine batteriche, come il lipopolisaccaride (LPS) di origine intestinale, influenzano lo sviluppo della fibrosi epatica.

La diversa composizione della flora batterica potrebbe pertanto giustificare una aumentata produzione di endotossine, quali LPS, e promuovere il processo della traslocazione batterica.

Se da una parte la capacità di un'alterata flora batterica di indurre un aumento del peso corporeo è stata adeguatamente studiata, al contrario il ruolo di una modificata flora batterica nella risposta all'insulto epatico deve essere ancora valutato.

SCOPO DELLO STUDIO

Il nostro studio si propone di chiarire il ruolo della traslocazione batterica e l'importanza di una differente composizione della microflora intestinale nello sviluppo delle malattie del fegato. Abbiamo quindi cercato di determinare se l'alimentazione fosse in grado di modificare la composizione della flora batterica intestinale, portando a cambiamenti patofisiologici durante il processo di fibrogenesi del fegato.

I dati di questo studio potranno così dare l'avvio a nuove idee e fornire nuovi targets per lo sviluppo di terapie innovative nel trattamento delle patologie epatiche.

MATERIALI E METODI

Allo scopo di definire il ruolo svolto dalla flora microbica intestinale, abbiamo valutato la risposta al danno epatico in topi maschi Balb/c trattati per un mese con una dieta solida di controllo o una dieta solida ad alto contenuto di grassi (HFD, High Fat Diet) e successivamente sottoposti all'insulto fibrogenico determinato dalla legatura del dotto biliare (BDL, Bile Duct Ligation) per la durata di due settimane.

Allo scopo di valutare l'azione diretta della flora batterica intestinale nella progressione del danno epatico, gli animali sottoposti a HFD e BDL sono stati trattati con un cocktail di antibiotici intestinali in grado di debellare la microflora intestinale presente.

Infine, allo scopo di ridurre al minimo l'interazione con altri fattori, in particolare per escludere una possibile azione della dieta grassa direttamente sulla progressione dell'epatopatia, abbiamo eseguito un esperimento di trapianto di microflora intestinale. L'esperimento è consistito nel prelievo mediante brushing della mucosa dell'intestino cieco degli animali donatori, previa asportazione dall'intestino dei residui fecali, e successivo trasferimento della microflora intestinale mediante

tecnica di gavage dai vari gruppi di topi precedentemente descritti in topi riceventi trattati con antibiotici.

Alla fine del periodo di trattamento, i topi sono stati sacrificati ed il fegato è stato asportato per la valutazione del grado di fibrosi epatica mediante analisi di istochimica (colorazione Sirius Red per la deposizione di collagene) e biologia molecolare (Real time PCR per l'RNA messaggero del collagene).

Inoltre, i dati ottenuti sul grado di fibrosi sono stati confermati mediante misurazione della concentrazione dell'idrossiprolina come indice del contenuto di collagene nei campioni di tessuto epatico.

RISULTATI

Al termine del periodo di trattamento, gli animali trattati con HFD-BDL avevano sviluppato un grado di fibrosi maggiore rispetto agli animali trattati con BDL ma sottoposti alla dieta di controllo, suggerendo che la steatosi indotta dalla dieta grassa contribuisce alla progressione della fibrosi epatica.

Inoltre, nei topi trattati con HFD-BDL il trattamento antibiotico per la sterilizzazione dell'intestino aveva ridotto la deposizione di collagene ai livelli osservati nei topi trattati con BDL e dieta di controllo.

Infine, il trapianto di microflora intestinale prelevata da topi trattati con dieta grassa in topi trattati con dieta di controllo e sottoposti a sterilizzazione dell'intestino ha determinato, dopo BDL, un grado di deposizione di collagene e quindi un livello di fibrosi aumentato, simile a quello osservato nei topi trattati con HFD e sottoposti a BDL.

CONCLUSIONI

Il trattamento con una dieta ad alto contenuto di grassi aumenta la fibrosi epatica nei topi sottoposti all'insulto fibrogenico della BDL. Un mese di trattamento con dieta grassa dà origine ad una flora batterica intestinale modificata con conseguente aumento della traslocazione batterica.

La traslocazione batterica osservata nei topi trattati con dieta grassa aumenta il grado di fibrogenesi epatica, che risulta ridotto in seguito al trattamento con il cocktail di antibiotici.

In conclusione, la possibilità di modificare la composizione della flora batterica intestinale potrebbe fornire nuove conoscenze per chiarire i meccanismi della fibrogenesi e offrire quindi nuove opportunità nel trattamento della fibrosi epatica.