

Facoltà di Medicina e Chirurgia  
Dottorato di Ricerca in Fisiologia Applicata e Fisiopatologia  
XIX ciclo  
Area 06- MED09



**EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI SR141716A SULLA  
RISPOSTA INFIAMMATORIA ASSOCIATA AL DANNO DA  
ISCHEMIA-RIPERFUSIONE NEL FEGATO DI RATTO**

**Tesi dottorale**

**Relatore:**

**Chiar.mo Prof. Mauro Bernardi**

**Presentata dalla**

**Dott.ssa Anna Maria Pertosa**

**Correlatore:**

**Dr. Paolo Caraceni**

**Coordinatore:**

**Chiar.mo Prof. Carlo Franzini**

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	pag. 2
- I cannabinoidi	pag. 2
1. <i>gli endocannabinoidi</i>	pag. 3
2. <i>i recettori degli endocannabinoidi</i>	pag. 5
3. <i>le azioni degli endocannabinoidi</i>	pag. 9
- Basi razionali per l'uso di SR141716A	pag.11
1. <i>inquadramento clinico</i>	pag.12
2. <i>inquadramento sperimentale</i>	pag.13
<b>SCOPO DELLO STUDIO</b>	pag.16
<b>MATERIALI E METODI</b>	pag.17
- <i>Animali</i>	pag.17
- <i>Procedura chirurgica di ischemia-riperfusion</i>	pag.17
- <i>Disegno sperimentale</i>	pag.19
- <i>Parametri biochimici e morfologici</i>	pag.21
- <i>Parametri emodinamici</i>	pag.24
- <i>Parametri infiammatori</i>	pag.24
- <i>Determinazioni biomolecolari</i>	pag.26
- <i>Analisi statistica</i>	pag.35
<b>RISULTATI</b>	pag.36
- <i>Conclusioni</i>	pag.51
<b>DISCUSSIONE</b>	pag.53
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag.60

## INTRODUZIONE

### I CANNABINOIDI

I cannabinoidi costituiscono i componenti attivi della *Cannabis Sativa* ed esercitano molteplici effetti a carico del SNC, dell'apparato cardiovascolare, respiratorio, digerente e del sistema immunitario in seguito al legame con specifici recettori, denominati CB1 e CB2, anche se non si può escludere il coinvolgimento di altri siti recettoriali non ancora identificati. (1)

Recentemente, possibili utilizzi della *Cannabis Sativa* sono stati soggetto di animate discussioni.

Utilizzati per millenni già dagli Indiani di America, in realtà la prima informazione scientifica sul possibile uso terapeutico di queste sostanze risale al 19-esimo secolo, ad opera di William B. O'Shaughnessy, quando a Calcutta i cannabinoidi venivano utilizzati per trattare colera, reumatismi, delirium tremens e convulsioni infantili.

Fu da questo momento che iniziò la ricerca sul sistema dei cannabinoidi che portò, a metà degli anni novanta, ad isolare il principale principio attivo della *Cannabis Sativa*, il (-)- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), responsabile degli effetti psicotropici dei cannabinodi.

La scoperta dei recettori invece è successiva: il CB1 è stato il primo e fu isolato e clonato da cDNA di cervello di ratto nel 1990 (2); per secondo, nel 1993, fu isolato e clonato il CB2 da cDNA di cellule umane HL-60. (3)

Quasi in contemporanea, furono scoperti anche alcuni ligandi endogeni di CB1 e CB2, primo fra tutti l'Anandamide, ai quali fu dato il nome di endocannabinoidi.

Da questo momento in poi si iniziò a parlare di "sistema endocannabinoide", intendendo con questo termine tutto il complesso di agonisti

endogeni, recettori, proteine ed enzimi che regolano la concentrazione dei ligandi. (4)

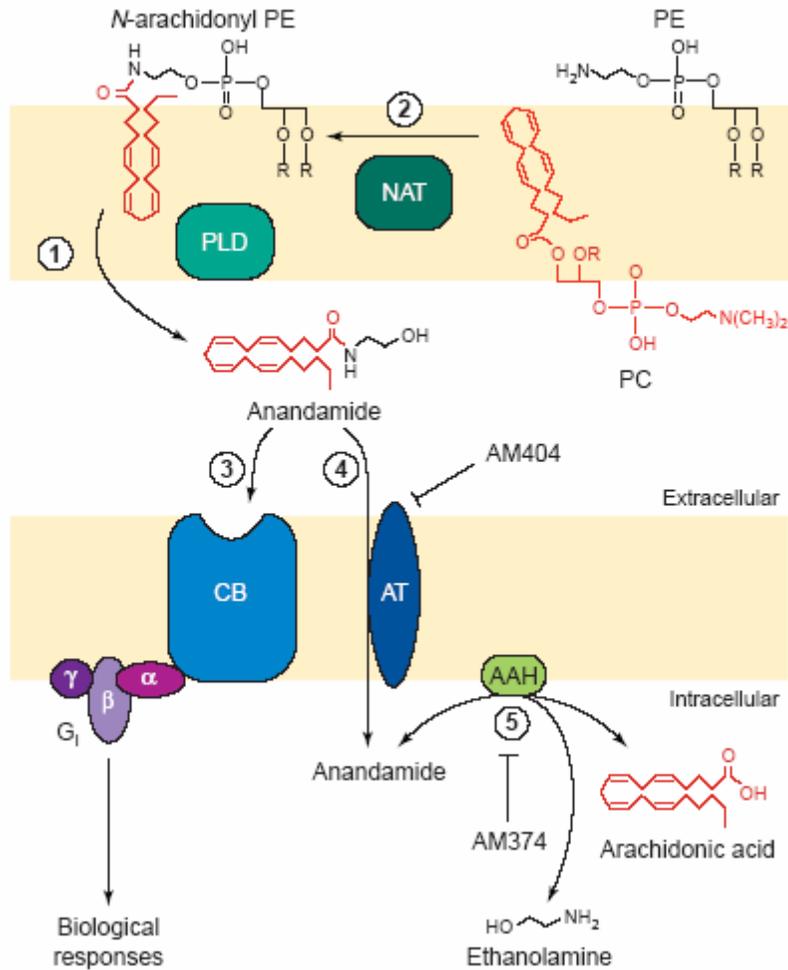
### **1) Gli endocannabinoidi**

Negli ultimi anni sono stati identificati i cosiddetti *Endocannabinoidi*, agonisti endogeni dei recettori CB1 e CB2. Si tratta di una famiglia di composti lipofili, quasi tutti eicosanoidi, derivati dagli acidi grassi polinsaturi e in particolare dal metabolismo dell'acido arachidonico.

Vengono sintetizzati su richiesta, rimossi dal loro sito di azione mediante un processo di uptake tissutale e metabolizzati da specifici enzimi.

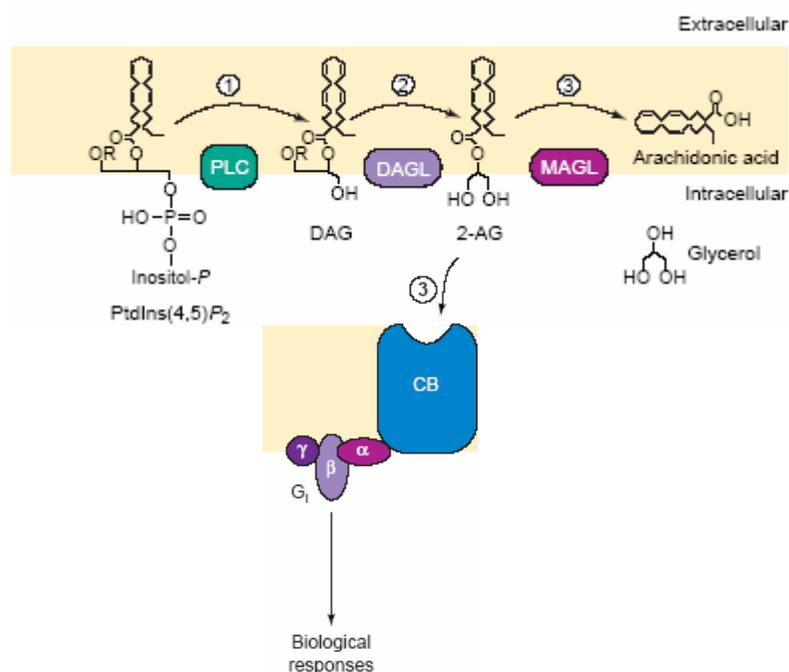
Fra i ligandi endogeni scoperti, i principali sono:

- l'*anandamide* (AEA), derivante dall'idrolisi dell'*N*-arachidonilPE catalizzata dalla fosfolipasi D (PLD). E' espressa soprattutto a livello dell'encefalo, della milza e delle cellule del sistema immunitario. Come si può vedere in *Figura 1*, l'AEA prodotta e liberata nello spazio extracellulare può andare incontro a due differenti destini: legarsi al suo recettore dei cannabinoidi e svolgere la sua funzione biologica, oppure essere riportata nella cellula mediante un trasportatore AT (Anandamide Transporter) e idrolizzata dall'enzima FAAH (fatty Acid Amino Hidrolase) per ridare Acido Arahidonico.



**Figura 1:** Processo di sintesi e metabolismo Anandamide

- il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG), derivante dal Phosphatidylinositol (4,5)-Biphosphate che, in una reazione catalizzata dall'enzima PLC (Phospholipase C) origina 1,2-diacilglicerolo (DAG), substrato per l'enzima DAGL (Diacilglicerolo Lipasi), che catalizza la produzione di 2-Arachidonoilglicerolo (2-AG) (5); Come si può vedere in *Figura 2*, il 2-AG prodotto e liberato nello spazio extracellulare può andare incontro a due differenti destini: legarsi al suo recettore dei cannabinoidi e svolgere la sua funzione biologica, oppure essere riportata nella cellula mediante un trasportatore AT-simile e idrolizzato dall'enzima MAGL (Monoacylglycerol Lipase) per ridare Acido Arachidonico.



**Figura 2:** Sintesi e metabolismo 2-AG

- il *palmitoiletanolamide* (PEA), prodotto nel corso di reazioni infiammatorie, nel contesto delle quali sembra svolgere un'attività antinfiammatoria riconducibile all'inattivazione funzionale dei mastociti (5).

L'azione di questi ligandi endogeni è stata associata a differenti quadri clinici, quali infiammazione, tremore e spasmi muscolari, tumore, nausea, dolore. Il loro effettivo ruolo ed il loro meccanismo d'azione rimane però ancora controverso: ad una letteratura spesso in contraddittorio riguardo le loro funzioni, si aggiunge l'ancora poco chiaro meccanismo d'azione.

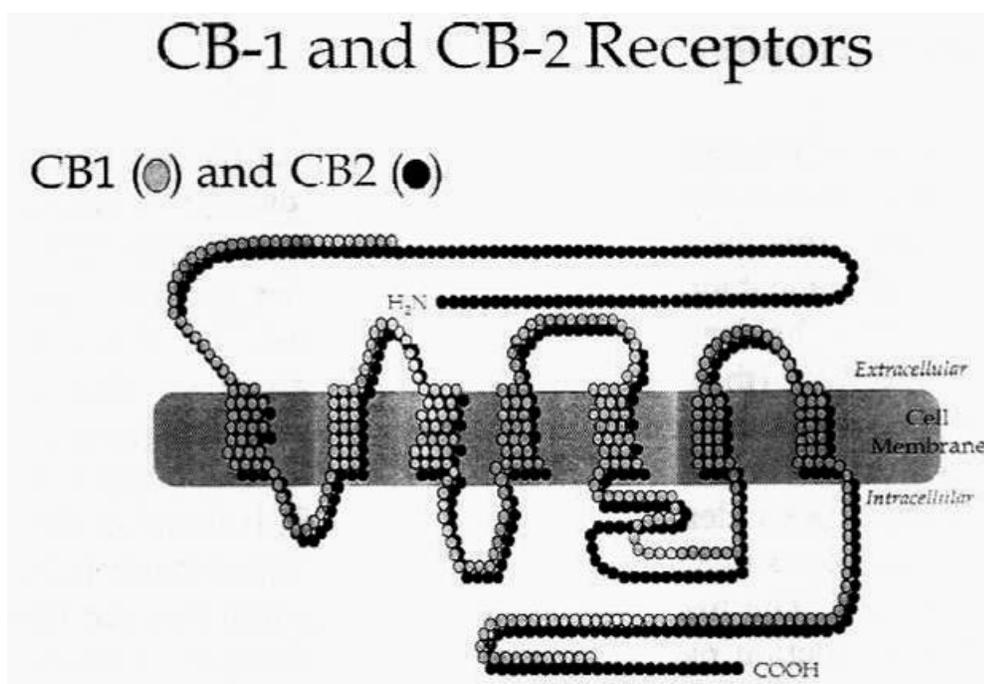
## 2) I recettori degli endocannabinoidi

I recettori CB1 e CB2 e, limitatamente all'AEA, i Vanilloidi (VR1) costituiscono i principali siti d'azione, sebbene alcuni effetti non sembrano essere

mediati esclusivamente da queste strutture recettoriali (azione analgesica e di vasodilatazione), facendo, quindi, supporre il coinvolgimento di altri recettori non ancora identificati (6) o anche la possibilità di un effetto recettore-indipendente, considerando la capacità di queste sostanze di attraversare facilmente le membrane biologiche in virtù della loro liposolubilità (5).

Strutturalmente (*Figura 3*), i CB1 e i CB2 sono costituiti da un dominio extracellulare, contenente l'estremità N-terminale, sette regioni transmembrana, caratterizzate da tre anse intracellulari e tre extracellulari ed un dominio intracellulare, contenente l'estremità C-terminale, sulla quale sono presenti i siti di legame di una proteina  $G_{i/o}$  di membrana a carattere inibitorio (5).

Derivano da i geni *Cnr1* e *Cnr2*, rispettivamente localizzati, nell'uomo, sul cromosoma 6 (6 q14-q15) e sul cromosoma 1 (1 p36).



**Figura 3:** recettore cannabinoidi (Mouse: CB1 473aa; CB2 347aa)

Funzionalmente, il legame degli agonisti ai CB1 e CB2 causa una inibizione dell'adenilato ciclasi di membrana, con diminuzione della concentrazione di

cAMP, ed una attivazione della MAPK (mitogen-activated protein kinase), oltre ad una modulazione dei flussi ionici transmembrana, che si traduce nell'inibizione dei canali del calcio voltaggio-dipendenti e nell'attivazione dei canali del potassio, risultante in una diminuzione dell'ingresso di calcio ed un aumento della fuoriuscita di potassio (7).

Il recettore CB1 sembra che possa anche agire mediante una proteina  $G_s$  in grado invece di attivare l'Adenilato Ciclasi. Inoltre sembrerebbe che tale recettore può esistere come omodimero ma può anche formare eterodimeri o oligodimeri con una o più classi di recettori-proteina G accoppiati, in modo da effettuare un cross-talk tra i diversi tipi di recettori. (8)

Il CB1 media soprattutto l'azione centrale dei cannabinoidi, pur essendo rappresentato, oltre che nel SNC, anche a livello delle terminazioni nervose periferiche, del sistema immunitario, dell'utero, dei testicoli, condotti urinari, del polmone (9), del tessuto adiposo, di alcuni muscoli, dell'intestino e del fegato. In particolare a livello intestinale il CB1 è stato identificato in corrispondenza del colon e dell'ileo di maiale, in prossimità delle placche del Peyer e dei vasi della sottomucosa, dove interviene nella regolazione della peristalsi e probabilmente anche nell'immunomodulazione e nella regolazione del tono vascolare (10). Il CB2 prevale a livello degli organi e delle cellule del sistema immunitario, come la milza, i linfociti B e le Natural Killer e più in generale nei tessuti periferici (6). E' stato riscontrato, però, che la somministrazione ripetuta dei cannabinoidi esita in una desensibilizzazione dei recettori, che potrebbe costituire un limite al loro impiego prolungato a scopo terapeutico (6), è per questo che si stanno studiando agonisti in grado di prolungare la risposta recettoriale, oppure sostanze in grado di agire a livello degli enzimi FAAH (fatty acid hydrolase) o DAGL per evitare l'idrolisi dei ligandi endogeni.

Come detto in precedenza, non tutti gli effetti degli endocannabinoidi sono mediati da questi due recettori. Per esempio l'azione ipotensiva-vasodilatante dell'anandamide, è mediata dai recettori VR1 (Vanilloid Receptor 1),

meccanocettori localizzati sulle terminazioni distali delle fibre perivascolari capsaicino-sensibili e la cui stimolazione induce il rilascio del CGRP (peptide vasoattivo correlato al gene della calcitonina) (6, 11).

Negli ultimi anni si è ipotizzata anche l'esistenza di un altro recettore CB1 degli endocannabinoidi detto CB<sub>1A</sub> ma meglio noto come CB<sub>1(b)</sub>. Tale recettore è stato individuato in cellule CHO (Chinese Hamster Ovarian Cells), sia nell'uomo che nel ratto. Presenta una delezione di 61 amminoacidi a livello della porzione Aminoterminale, ma la sua esistenza non è mai stata confermata in vivo. (12)

La complessità del sistema recettoriale, associata alla presenza di recettori non-cannabinoidi o cannabinoido-simili in grado di interagire con i ligandi, ed all'azione recettore-indipendente degli endocannabinoidi, lascia ancora moltissimi dubbi sugli effettivi siti e modalità d'azione di questo complesso sistema.

## ***2.1 Gli agonisti dei recettori***

Per permettere di studiare le caratteristiche funzionali di questo sistema si utilizzano diversi agonisti dei recettori dei cannabinoidi in grado di legarsi sia al CB1 che al CB2. Appartengono a quattro categorie ed i più conosciuti sono:

- I cannabinoidi "classici":  $\Delta^9$ -THC e (+)-HU-210.
- I cannabinoidi "non classici" : CP55940.
- I cannabinoidi Aminoalckylindole: R-(+)-WIN55212.
- AEA ed analoghi: R-(+)methanandamide, ACPA, O-1812

Gli agonisti appartenenti alle prime due classi hanno una buona affinità sia per il CB1 che per il CB2, mentre il WIN55212 e l'anandamide hanno una maggiore affinità per il CB1 rispetto al CB2 (5, 8).

## ***2.2 Gli antagonisti dei recettori***

L'esigenza di approfondire le conoscenze sul meccanismo d'azione e sugli effetti dei cannabinoidi ha condotto all'identificazione di sostanze dotate di

potere antagonista. Tra queste ricordiamo AM251 e AM281, ma soprattutto le molecole SR141716A (Rimonabant) e SR144528 che esercitano la loro azione rispettivamente sui recettori CB1 e CB2.

L'antagonismo recettoriale si traduce nell'inibizione funzionale di una serie di fenomeni indotti dagli agonisti e ciò ha consentito l'impiego di questi composti in diversi studi sperimentali, volti a determinare quale dei due recettori fosse maggiormente responsabile degli effetti osservati.

SR141716 sembrerebbe essere un "antagonista neutro" a basse concentrazioni, competendo con gli agonisti endogeni al sito recettoriale; a più alte concentrazioni invece funzionerebbe come un "agonista inverso", facendo shiftare il recettore CB1 dalla forma ON costitutiva alla OFF, inattivandolo. (5, 8)

Purtroppo al contrario di altri sistemi, allo stato attuale mancano agonisti o antagonisti puri; molte di queste sostanze infatti, presentano attività simili a quelle di agonisti parziali o agonisti/antagonisti

### **3) Le azioni degli endocannabinoidi**

#### ***3.1 Effetto anticachettico e analgesico***

Numerosi studi hanno messo in evidenza il coinvolgimento degli endocannabinoidi in diversi processi fisiopatologici, quali, ad esempio la regolazione dell'assunzione di alimenti e la modulazione del dolore.

Stimolano, infatti, l'appetito e contrastano la cachessia nei malati di AIDS e nei pazienti neoplastici, probabilmente mediante un'azione diretta a livello dell'ipotalamo (11).

Presentano, inoltre, un effetto analgesico mediato dai CB1 (espressi nell'encefalo, nel midollo spinale e nelle terminazioni periferiche del primo neurone sensitivo), che si esplica in un controllo sia del dolore neuropatico che periferico (6). Queste osservazioni potrebbero costituire il razionale per un eventuale impiego terapeutico degli endocannabinoidi o di inibitori della loro

inattivazione, se effettivamente sarà dimostrato che nel contesto di sindromi dolorose si verifica un aumentato rilascio di queste sostanze a scopo antalgico.

### ***3.2 Effetti antiproliferativi***

Molto promettenti sembrano essere le evidenze sperimentali riguardanti gli effetti antiproliferativi, che l'AEA ha dimostrato di possedere, in vitro, nei confronti di molteplici linee cellulari tumorali, comprese le cellule umane del carcinoma mammario e prostatico (11). La stimolazione del recettore CB1 causa, attraverso una cascata di eventi che prevedono l'inibizione dell'adenilato ciclasi e l'attivazione della proteina kinasi MAPK, l'inibizione dell'espressione del recettore della prolattina e del recettore *trk* dell'NGF (nerve growth factor), che si traduce nell'arresto della fase G1-S del ciclo cellulare e dell'incorporazione di timidina nel DNA (11).

### ***3.3 Effetto ipotensivo***

L'AEA e il 2-AG hanno dimostrato di costituire importanti mediatori dell'ipotensione indotta dall'LPS nello shock settico nel ratto (13). Effettivamente l'AEA determina vasodilatazione sia agendo sui CB1 presinaptici, presenti sulle terminazioni periferiche simpatiche, sia agendo direttamente sulla muscolatura liscia dei vasi. Inoltre, l'AEA è in grado di modulare il rilascio di neuropeptidi vasodilatatori, come il CGRP, che è anche dotato di un effetto analgesico e antinfiammatorio, legandosi come agonista parziale ai recettori VR1 (11).

### ***3.4 Effetto pro/antinfiammatorio***

Molteplici studi si sono proposti di verificare la capacità degli endocannabinoidi di influenzare il decorso di processi flogistici nell'ambito di vari modelli sperimentali, tra cui uno dei più rappresentativi è un modello di peritonite nel ratto (14), in cui la somministrazione di agonisti si è rivelata in

grado di inibire il rilascio di citochine infiammatorie (IL-12, TNF-alfa) e di aumentare IL-10, ad azione antinfiammatoria, attraverso l'attivazione centrale dei CB1. In realtà, non è possibile attribuire agli endocannabinoidi un'attività esclusivamente antinfiammatoria; infatti, numerose evidenze sembrano deporre più a favore di un effetto proinfiammatorio, sebbene sia più corretto fare riferimento ad un'azione di immunomodulazione (15), dipendente anche dalla concentrazione con cui questi composti sono presenti a livello dei siti attivi e dalla tipologia di cellule con cui interagiscono. Ad esempio, il tetraidrocannabinolo (THC), agonista esogeno dei recettori dei cannabinoidi, riduce nel ratto i livelli di citochine prodotte dai linfociti Th1, come l'INF-gamma, inibendo la sintesi sia dell'IL-12 che del suo recettore, mentre aumenta la produzione di citochine della serie Th2, come l'IL-4 e l'IL-10 (5). Studi in vitro su linee cellulari umane hanno, inoltre, posto in evidenza la coesistenza di effetti antinfiammatori, riconducibili all'inibizione del TNF-alfa, GM-CSF e dell'INF-gamma, e di effetti proinfiammatori, dovuti all'aumento dell'IL-8 e alla diminuzione dell'IL-10 (5). Anche dagli studi condotti sull'AEA sono emersi risultati contrastanti, in quanto sebbene sia stato riportato nel 1997 un effetto inibitorio sulla sintesi LPS-indotta dell'IL-6, IL-8 e TNF-alfa, studi successivi hanno smentito questo dato (11).

## **BASI RAZIONALI PER L'USO DI UN'ANTAGONISTA DEI RECETTORI CB1 DEI CANNABINOIDI IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI DANNO EPATICO**

Da un recente studio sperimentale è emersa la capacità dell'antagonista SR141716A di contrastare l'evoluzione del processo flogistico, prevenendo la comparsa di lesioni ulcerative lungo il tratto intestinale provocate dall'indometacina (16). Questo effetto si associa a una significativa diminuzione

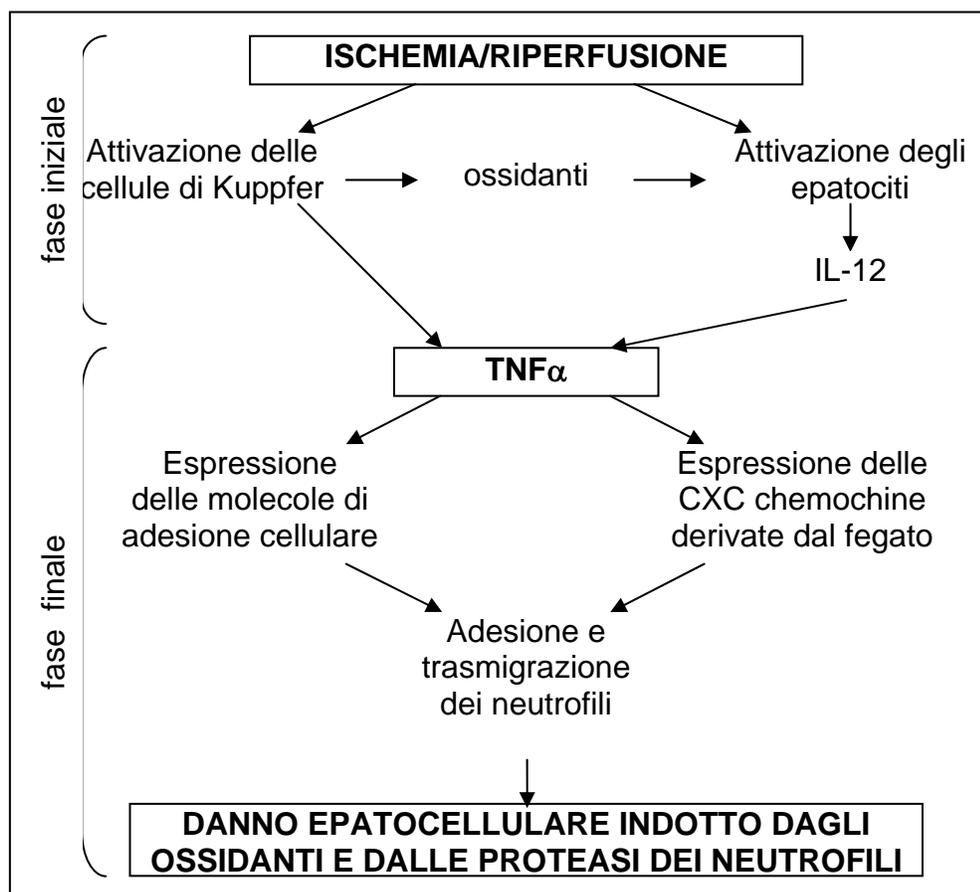
dei livelli di TNF-alfa e dell'attività della mieloperossidasi (MPO). Inoltre, ad alte dosi, SR141716A ha dimostrato di possedere, a livello dei CB1, un'attività di agonista parziale, che potrebbe contribuire all'effetto finale (16). Tale riscontro ripropone il problema di una più corretta definizione dello spettro di attività degli endocannabinoidi ed a questo proposito, un importante modello di flogosi, che ben si presta a questo tipo di valutazione nell'ambito della patologia epatica, è rappresentato dal danno da ischemia-riperfusion associato alla somministrazione di lipopolisaccaride di membrana dei batteri Gram-negativi (LPS).

### **1) Inquadramento del problema clinico**

Nel corso delle procedure chirurgiche di trapianto di fegato e di resezione epatica si realizza inevitabilmente un danno da ischemia-riperfusion dovuto alla conservazione dell'organo nelle soluzioni di preservazione (ischemia fredda) nel caso del trapianto ed al clampaggio temporaneo del peduncolo vascolare epatico (ischemia calda) nel caso delle resezioni epatiche. In entrambe queste condizioni, molteplici fattori (traumi, significative perdite emorragiche o una transitoria ischemia intestinale) possono favorire fenomeni di traslocazione batterica dal lume intestinale nella circolazione entero-epatica (17). Tale evento, associato alla compromissione della funzione di detossificazione, che il fegato svolge nei confronti delle endotossine, per il danno da ischemia-reperfusion, esita nella comparsa di endotossinemia. La complessa reazione infiammatoria che ne consegue può assumere le caratteristiche della cosiddetta SIRS (sindrome da risposta infiammatoria sistemica), nel contesto della quale si verificano una serie di modificazioni fisiopatologiche responsabili di febbre, tachicardia, ipotensione, tachipnea con ipocapnia e leucocitosi (18). Contemporaneamente, si verifica l'attuazione di una serie di meccanismi di compenso, finalizzati ad arginare l'entità della risposta infiammatoria, che, tuttavia, possono risultare deficitari, contribuendo all'evoluzione verso l'insufficienza multiorgano (MOF) (19).

## 2) Inquadramento del problema sperimentale.

Dal punto di vista patogenetico, il danno da ischemia-riperfusion si articola in due fasi distinte (20) (*Figura 4*).



*Figura 4.* Schema semplificato della risposta infiammatoria nel danno da ischemia-riperfusion nel fegato.

La prima (< 2 ore di riperfusion) si caratterizza per lo stress ossidativo dovuto alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte delle cellule di Kupffer (19), le quali elaborano, inoltre, una serie di citochine, come TNF-alfa, IL-1, IL-6, eicosanoidi e NO, responsabili dell'induzione della sintesi da parte degli epatociti di altri mediatori di flogosi, come l'IL-12. Ne consegue un significativo incremento della concentrazione di TNF-alfa, cruciale per

l'innesco della seconda fase, che prevede soprattutto il coinvolgimento dei PMN. Il TNF-alfa, infatti, incrementa l'espressione cellulare di molecole di adesione e il rilascio di chemochine da parte degli epatociti (ad esempio IL-8, MIP-2), consentendo la tras migrazione dei PMN dal lume capillare al parenchima epatico, nel contesto del quale si verifica un'ulteriore produzione di ROS, responsabili di un danno cellulare sia diretto che mediato dall'inibizione delle antiproteasi endogene (21). Nonostante i PMN contribuiscano significativamente all'amplificazione del danno epatocitario le cellule di Kupffer costituiscono le principali sorgenti dei ROS durante la riperfusione (22). Oltre al TNF-alfa un altro importante mediatore della seconda fase del danno da ischemia-riperfusione è rappresentato dal PAF (Platelet Activating Factor), i cui livelli sono notevolmente aumentati nel fagato esposto a questo tipo di lesione (23). Alla necrosi epatocitaria contribuisce anche la liberazione nell'ambiente extracellulare di proteasi ed enzimi idrolitici. A ciò si aggiunge la persistenza dell'ischemia anche durante la riperfusione, come conseguenza della sofferenza delle cellule endoteliali, esposte al burst ossidativo che inevitabilmente avviene in questa fase, e dell'occlusione meccanica dei capillari esercitata dai leucociti e dalle piastrine che aderiscono all'endotelio (24).

Il modello di flogosi a cui fa riferimento il nostro studio prevede, oltre al danno da ischemia-riperfusione, anche la somministrazione dell'LPS a dosi non letali e non in grado di indurre uno shock settico. La contemporanea presenza di LPS amplifica la reazione infiammatoria indotta dall'ischemia-riperfusione (17). L'effetto proinfiammatorio dell'LPS è potenziato dal legame con una proteina specifica, LPB, a cui fa seguito l'interazione con il CD14, espresso sulla superficie dei macrofagi, monociti ed epatociti e associato a un co-recettore transmembrana appartenente alla famiglia dei TLR (toll-like receptor). La cascata di eventi che ne deriva si traduce nell'attivazione di fattori di trascrizione (NF-kB, AP-1) che inducono l'espressione di adesine, citochine e l'NO-sintasi inducibile (25). Oltre al danno cellulare derivante dall'esposizione ai ROS e agli

enzimi litici liberati dalle cellule infiammatorie, occorre prendere in considerazione anche le potenziali modificazioni emodinamiche provocate dall'LPS. Tali fenomeni consistono nella riduzione della perfusione epatica a causa di una vasocostrizione che interessa sia l'arteria epatica che la vena porta, che si traduce in uno stato di ipossia tissutale derivante anche dalla compromissione dell'estrazione di ossigeno da parte degli epatociti (26). Inoltre l'LPS modifica la permeabilità intestinale, promuovendo la traslocazione batterica dal lume ai linfonodi mesenterici (27). Ne consegue un'ulteriore amplificazione della reazione infiammatoria.

Allo stato attuale delle conoscenze, non esistono dati sull'effetto della somministrazione di un'antagonista dei recettori CB1 dei cannabinoidi endogeni in un modello sperimentale di danno epatico nella cui patogenesi la risposta infiammatoria esercita un ruolo rilevante.

## SCOPO DELLO STUDIO

L'obiettivo di questo studio è stato determinare se il trattamento con SR141716A, antagonista dei recettori CB1 dei cannabinoidi (SANOFI-SYNTHELABO, Milano, Italia), è in grado di ridurre il danno epatico in un modello sperimentale di sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS).

Tale obiettivo è stato perseguito determinando, in un modello animale di ischemia-riperfusion del fegato seguita da somministrazione intraperitoneale di LPS, i seguenti parametri di danno epatico:

### Parametri biochimici e morfologici

- transaminasi sieriche
- istologia descrittiva
- analisi quantitativa assistita dal computer della percentuale di necrosi nel tessuto
- mortalità.

### Parametri emodinamici

- valutazione della pressione sistolica arteriosa
- valutazione del flusso parenchimatico epatico

### Parametri infiammatori

- analisi quantitativa assistita dal computer del numero di cellule PMN/campo su sezioni istologiche
- valutazione della concentrazione tissutale di CINC-1.

### Parametri biomolecolari

- Western Blotting per CB1 receptor
- PCR per CB1 receptor.

## **MATERIALI E METODI**

### **Animali**

Nello studio sono stati utilizzati ratti maschi di razza Sprague-Dawley (Charles-River, Calco, LC, Italia). Gli animali hanno avuto libero accesso ad una dieta standard e ad acqua per una settimana. Al momento del sacrificio, il peso dei ratti variava tra 230 e 260 grammi. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati secondo le direttive EEC 86/609 riguardanti la cura e l'uso degli animali da esperimento (D.L.vo 116/92).

Gli animali sono alloggiati nello stabulario del Centro Unificato Ricerca Biomedica Applicata del Policlinico S.Orsola-Malpighi in un ambiente controllato per l'intera durata dello studio.

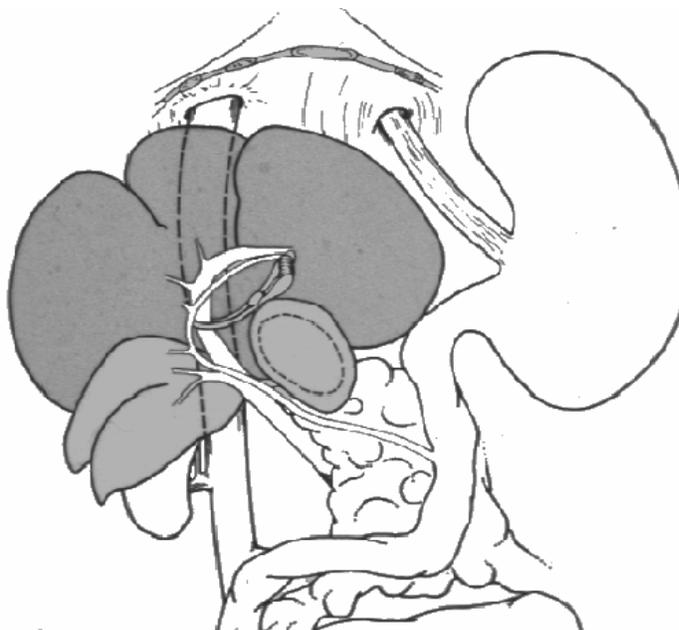
### **Procedura chirurgica di ischemia-riperfusion**

Al fine di una migliore comprensione del modello chirurgico utilizzato, è opportuno descrivere brevemente l'anatomia del fegato di ratto (26). Il fegato è formato da quattro lobi: mediano, laterale destro, laterale sinistro e caudato. Il più grande è il lobo mediano che, essendo posizionato lateralmente, ricopre gli altri tre. Il fegato è fissato al diaframma da legamenti molto sottili che sono il falciforme, il triangolare di sinistra e di destra.

I ratti vengono sottoposti ad anestesia generale attraverso la somministrazione intraperitoneale di Zoletil 50 (0.1 ml/100 gr di peso) (una miscela di Ketamina e Benzodiazepina).

L'addome è aperto mediante laparotomia sottocostale bilaterale, si seziona il legamento digiuno-colico e l'intestino tenue ed il colon vengono ribaltati verso il lato sinistro del ratto e ricoperti con una garza inumidita con soluzione fisiologica, per mantenere i visceri umidificati.

A questo punto (*Figura 5*), viene posizionato un microclamp vascolare atraumatico in modo tale da occludere il tronco vascolare comune, portale ed arterioso, per il lobo sinistro e mediano del fegato. Tale clampaggio determina un'ischemia parziale dell'organo (circa il 70% del volume totale) e garantisce la persistenza del flusso ematico attraverso il lobo destro e caudato.



**Figura 5.** *Clampaggio con microclamp atraumatica del tronco vascolare comune per il lobo sinistro e mediano del fegato.*

Alla fine del periodo di ischemia normotermica, si rimuove il clamp vascolare per consentire la ri-perfusione dei lobi precedentemente ischemizzati. Prima di procedere alla sutura della parete addominale è importante assicurarsi di aver controllato perfettamente l'emostasi dei monconi di resezione epatica. A tale scopo può essere utile il lavaggio con soluzione fisiologica della cavità addominale. Eventuali modici sanguinamenti possono essere facilmente controllati con l'applicazione di emostatico assorbibile (surgicel) sui monconi di resezione; perdite di maggior entità richiedono, invece, un'ulteriore legatura.

Infine l'addome è richiuso con suture a strati e l'animale lasciato recuperare spontaneamente con libero accesso ad acqua e dieta standard.

Il principale vantaggio di questo modello chirurgico di ischemia-riperfusion è quello di prevenire la congestione intestinale così come avviene in caso di ischemia epatica totale, che determina un blocco completo del flusso ematico proveniente dalla regione portale. La congestione del sistema portale comporta il sequestro di notevoli quantità di liquidi corporei a livello addominale e l'instaurarsi di una situazione di ischemia dell'intestino, che, se prolungata, può provocare un infarto dei tessuti interessati. Le alterazioni emodinamiche che si associano al sequestro di liquidi in territorio splancnico e la liberazione in circolo di prodotti tossici dall'intestino danneggiato rappresenterebbero un elemento confondente nella valutazione delle modificazioni indotte dall'ischemia-riperfusion del fegato. Questo problema è particolarmente importante nel ratto che, al contrario di altre specie e dell'uomo, non presenta circoli collaterali spontanei tra il sistema portale ed il sistema cavale, quindi tale situazione si instaura dopo pochi minuti dal clampaggio totale del peduncolo vascolare diretto al fegato (27).

### **Disegno sperimentale**

I ratti sono stati randomizzati nei seguenti gruppi (*Figura 6*):

- Trattati (SR+IR+LPS) : gruppo costituito da ratti in cui è stato somministrato per gavage 2 ore prima dell'inizio dell'ischemia l'SR141716A (Sanofi-Sinthelabo, France) alla dose di 3 mg/kg o 10 mg/kg disciolto in 2ml/kg di acqua sterile con una goccia di tween 80 (Sigma Co, Milano, Italia);
- Controlli (IR+LPS): gruppo costituito da ratti in cui è stato somministrato per gavage 2 ore prima dell'inizio dell'ischemia il solo veicolo (2ml/kg di ml acqua sterile con una goccia di tween 80);



## **Campionamento e stoccaggio dei prelievi**

Al momento del sacrificio, effettuato in anestesia generale, in tutti i tempi sperimentali sono stati effettuati i seguenti prelievi:

- a) Sangue periferico: dalla vena cava inferiore sono stati prelevati 2ml di sangue per determinare l'attività sierica dell'Alanina Aminotransferasi (ALT); per il prelievo è stato utilizzato un ago 16 GA per evitare l'emolisi.
- b) Lobi epatici : sono stati prelevati campioni dei lobi sinistro e mediano. Una parte di questi campioni è stata fissata in formalina tamponata 10% per l'istologia tradizionale; l'altra parte è stata congelata in Azoto liquido e successivamente conservata a -80°C per la quantificazione delle citochine tissutali.

## **Parametri biochimici e morfologici.**

### ***Determinazione del livello sierico di AlaninaAminoTranferasi (ALT)***

I campioni di sangue sono stati centrifugati per 10 minuti a 3500rpm. Sul siero ottenuto è stato effettuato il dosaggio del livello di ALT mediante metodo spettrofotometrico utilizzando un kit disponibile in commercio (Sigma Co, St. Louis, USA).

### ***Istologia Tradizionale***

*Fissazione.* I pezzi raccolti sono stati raccolti in apposite bottigliette di vetro, precedentemente siglate, in modo da poter distinguere l'animale di provenienza, contenenti formalina tamponata al 10% e conservati a temperatura ambiente per 24 ore, a seguito delle quali, cambiata la formalina, si sono conservati per altre 24 ore.

*Processazione.* Prima della processazione, i campioni, tolti dalla formalina, sono stati adagiati nelle apposite griglie, poste in un becker e tenute sotto acqua corrente per almeno 30 minuti. E' stata effettuata una processazione rapida al

microonde (Milestone Microwave Laboratori System), che utilizza specifici programmi per i processi di disidratazione e di chiarificazione. I campioni sono stati quindi disidratati per passaggi successivi rispettivamente in alcool 70%, alcool 90% ed alcool 100%; ed infine sottoposti a chiarificazione in toluolo, allo scopo di sostituire i residui tissutali di formalina con toluolo e renderlo più facilmente accessibile alla paraffina nella fase successiva.

*Inclusione.* Si è proceduto sgocciolando le grigliette dal toluolo (tamponandole bene in modo che non rimangano residui) per poi immergerle in paraffina liquida a 60 °C per circa 2 ore. Passate le 2 ore è stata accesa la piastra refrigerata, sono state riempite le apposite formelle (uni-cassette per l'istologia Bio-ottica) fino ad un certo livello con formalina liquida. Tolti i campioni dalle gabbiette, sono stati trasferiti nelle formelle e fissati al fondo di queste, tenendo le formelle sulla piastra refrigerante per qualche secondo. A questo punto la griglietta in plastica è stata adagiata sulla formella contenente i campioni, è stata ancora aggiunta formalina liquida ed il tutto è stato lasciato sulla piastra refrigerante, finché la formalina non si è solidificata. Quando la formalina si è completamente solidificata, il blocchetto viene staccato dalla formella, ed è pronto per essere tagliato al microtomo (Leica RM 2125RT)

### ***Colorazione Ematossilina-Eosina***

I campioni inclusi in paraffina sono stati tagliati in sezioni di 4µm e posti su vetri per immunohistochimica. Le sezioni sono state sparaffinate mediante passaggi successivi in toluolo (2 passaggi da 3 minuti ciascuno), in alcool 100% (2 passaggi da 3 minuti ciascuno), in alcool 95% (3 minuti) ed in alcool 70% (3 minuti). Le sezioni sono poi state lavate con acqua distillata ed immerse per 8 minuti in ematossilina, precedentemente filtrata onde evitare la formazione di precipitati. Successivamente, sono state lavate in acqua distillata e poste sotto acqua corrente per circa 10 minuti (al fine di lavare via l'eccesso di ematossilina e soprattutto di permettere il viraggio e l'intensificazione della colorazione).

Dopo un breve passaggio in acqua distillata, le sezioni sono state poste in eosina per 5 minuti, dunque lavate rapidamente in acqua distillata e sottoposte a disidratazione mediante passaggi successivi in alcool 70%, alcool 90%, alcool 100% e toluolo al fine di disidratare le sezioni prima di procedere al montaggio del vetro copri oggetto con l'apposita resina (DPX mountant for microscopy BDH Laboratory Supplies).

### ***Stima delle necrosi***

I campioni fissati in formalina sono stati regolarmente processati ed inclusi in paraffina. Su sezioni istologiche (4mm) colorate con ematossilina-eosina sono state contate le aree necrotiche, mediante la citometria per immagini, usando la randomizzazione automatica.

Il cimometro ad immagine consiste in un'unica videocamera CCD a colori di 2/3" (JVC Professional Europe, Londra, Gran Bretagna), montata su un microscopio ottico DMLB (Leica Microsystem, Wetzlar, Germania), dotato di un piano di scansione motorizzato Multicontrol 2000 (Marzhauser, Wetzlar, Germania). Sia la videocamera che il piano di scansione sono controllati dal software Citometrica (C&V, Bologna, Italia). Le misurazioni sono state compiute ad un ingrandimento di 40x. Le sezioni sono state completamente suddivise in piani di scansione che misurano 200  $\mu\text{m}$  (H) per 157  $\mu\text{m}$  (V) e che definiscono campi rettangolari contenenti il campo di visione di un obiettivo 40x. Il calcolo della percentuale della necrosi epatica è stata eseguito in base alla metodica descritta da Chieco et al. (28) su 100 sezioni random di preparati istologici del gegato di ciascun ratto.

Per ogni sezione, corrispondente ad un singolo campione, sono stati analizzati circa 160 campi random. Sulla base del numero di campi analizzati, è stata calcolata l'area corrispondente di tessuto analizzata. Sia nei ratti trattati col farmaco, sia nei controlli, è stata raggiunta un'area di 5,024  $\text{mm}^2$ . I dati sono stati espressi come percentuale di aree necrotiche.

## **Parametri emodinamici**

### ***Valutazione della pressione sistolica arteriosa***

Tale parametro è stato valutato con il metodo classico Tail-cuff, utilizzando un apposito apparato (2 Biological Instruments) costituito da una camera cilindrica riscaldata a 37°C che funge da alloggiamento per il ratto e da un anello di gomma, da posizionare attorno alla coda del ratto, con la funzione di effettuare una iniziale compressione dei vasi seguita da lento rilascio (simulando il bracciale dello sfigmomanometro). L'anello è dotato di sensore ed è collegato ad un registratore in grado di tradurre il segnale in valori di pressione sistolica. Questo parametro è stato valutato in tutti i gruppi ed in tutti i tempi sperimentali.

### ***Valutazione del flusso epatico parenchimatico***

Questo parametro è stato valutato monitorando i ratti, per i diversi gruppi sperimentali, fino ad un massimo di 2 ore di riperfusione. È stato utilizzato un flussimetro laser-doppler (2 Biological Instruments).

Gli animali sono stati anestetizzati, sottoposti a laparotomia addominale e, posizionando il sensore a livello della superficie del fegato, è stata fatta partire la registrazione. Durante le fasi di registrazione l'addome è stato provvisoriamente chiuso utilizzando un mosquito, per evitare che ipotermia e dispersione di liquidi potessero influenzare il parametro. Il parametro è stato valutato in tutti i gruppi sperimentali prima dell'ischemia (Basali), durante ischemia (30-60-90 minuti) e durante riperfusione (30-60-90-120 minuti).

## **Parametri infiammatori**

### ***Valutazione del numero di PMN/campo su sezioni istologiche di parenchima epatico***

I campioni fissati in formalina sono stati regolarmente processati ed inclusi in paraffina. I blocchetti sono stati tagliati al microtomo in sezioni di 4 µm e posti su vetri per immunohistochimica (vetri molati portaoggetto con banda

colorata Forlab Carlo Erba) precedentemente gelatinati per permettere una migliore adesione delle sezioni ed evitarne il distacco. Le sezioni tagliate sono state lasciate a 37 °C per tutta la notte e alla mattina successiva sono state sottoposti alla procedura. Le sezioni sono state sparaffinate nel seguente modo: immersione per 16 minuti in xilolo (2 passaggi), per 3 minuti in alcool 100% (3 passaggi), per 2 minuti in alcool 95% e per 2 minuti in alcool 70%. Successivamente sono stati fatti 2 lavaggi di 5 minuti ciascuno in acqua distillata. E' stata quindi effettuata una colorazione con Naphthol AS\_Dichloroacetato, in grado di evidenziare l'attività esterasica dei PMN, immergendo le sezioni nel colorante per 30 minuti.

Successivamente, le sezioni sono state lavate in acqua distillata e poste sotto acqua corrente per circa 10 minuti (al fine di lavare via l'eccesso di colorante). Dopo un breve passaggio in acqua distillata, le sezioni sono state contrastate in ematossilina per 5 min, lavate sotto acqua corrente per eliminare l'eccesso di colorante e permettere il viraggio e l'intensificazione del colore, quindi, dopo un passaggio in acqua distillata, sono state montate utilizzando una soluzione acquosa a base di glicerina; il vetro coprioggetto è stato bloccato applicando uno smalto trasparente sui margini.

Le cellule positive (rosse) alla colorazione sono state contate in 20 campi random non consecutivi, utilizzando un ingrandimento 40X. I dati sono stati espressi come numero di PMN/campo.

### ***Determinazione della concentrazione epatica di CINC-1***

Campioni di fegato sono stati omogeneizzati in un Buffer (20%w/v) contenente Tris-HCl 25 mM pH 7.5, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 50 mM, cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma Co, Milan, Italy) e successivamente centrifugati a 14000 rpm per 15 minuti a +4°C.

Il sovranatante è stato raccolto ed utilizzato per la valutazione della concentrazione tissutale di CINC-1 mediante tecnica ELISA, utilizzando un kit commerciale (Rat GRO/CINC-1 Assay Kit, IBL-Hamburg, Germany).

## **Determinazioni Biomolecolari**

### ***PCR per CBI receptor***

#### *Estrazione RNA*

L'RNA è stato estratto da circa 20mg di tessuto epatico congelato utilizzando un Kit commerciale (MicroTomidi, Invitrogen) basato su un sistema di colonnine con anello in resina per intrappolare gli acidi nucleici.

Il tessuto è stato posto in un buffer di lisi ed omogeneizzato con omogeneizzatore ad immersione (Ultraturax); è stato quindi centrifugato a 14.000rpm per 1 minuto ed il sovrinatante raccolto e trasferito in provette dotate di colonnine. Dopo averle centrifugate a 14.000rpm per 1 minuto, l'RNA rimasto intrappolato nell'anello di resina è stato eluito in acqua DEPC.

Tutte le fasi sono state eseguite tenendo il campione in ghiaccio.

#### *Trattamento con DNA-se*

Per eliminare residui di DNA genomico erroneamente intrappolati dalle resine, il campione è stato sottoposto ad un trattamento con DNA-se, enzima in grado di degradare il DNA lasciando integro l'RNA. E' stato utilizzato un Kit commerciale (DNaseI, Invitrogen). I campioni sono stati posti in una provetta eppendorf da 1,5ml con DNase I e DNase-Buffer e lasciati a temperatura ambiente per 10 minuti per permettere all'enzima di digerire il DNA. La reazione è stata bloccata mediante aggiunta di EDTA 25mM e ponendo i campioni nel termomixer a 65°C per 10 minuti.

#### *Determinazione concentrazione dell'RNA*

La concentrazione dell'RNA è stata effettuata mediante letture spettrofotometriche in cuvette di quarzo, utilizzando acqua come bianco. Le

letture sono state effettuate ad una lunghezza d'onda di 260nm . La purezza del campione è stata valutata calcolando il rapporto delle letture a 260/280nm.

#### *Retrotrascrizione*

1µg di RNA è stato retrotrascritto a cDNA utilizzando un Kit commerciale (Termoscript, Invitrogen) contenente Trascrittasi inversa.

In 10µl di volume, sono stati posti 1µg di RNA, oligoDT e dNTPs in provette eppendorf da 1,5ml. Le provette sono state poste a 65°C per 5 minuti nel termomixer, dopo di che sono stati aggiunti cDNA Synthesis Buffer, DTT, RNase OUT, Mix Enzima Termoscript ed acqua DEPC. I campioni sono stati quindi posti ad 85°C per 5 minuti nel termomixer, per far avvenire la reazione di retrotrascrizione, al termine dei quali è stata aggiunta RNase H (per eliminare residui di RNA non retrotrascritto). Infine i campioni sono stati posti nel termomixer a 37°C per 20 minuti per disattivare l'enzima trascrittasi inversa.

#### *Amplificazione PCR*

La tecnica della reazione a catena della DNA polimerasi (PCR) permette di amplificare un frammento di DNA utilizzando specifici “primers”, sfruttando le proprietà di sintesi della Taq-polimerasi.

I “primers” sono oligonucleotidi sintetici lunghi alcune decine di deossinucleotidi trifosfato (dNTP) complementari alle estremità del frammento di DNA da amplificare, legandosi al quale permettono alla Taq polimerasi di sintetizzare stampi complementari.

Questa tecnica prevede un numero variabile di cicli di amplificazione (25-35), ciascuno dei quali composto da più fasi a temperature diverse, dipendenti dalla composizione nucleotidica dei primers e dal tipo di Taq polimerasi utilizzata.

Il passaggio da una temperatura all'altra è permesso dall'uso di un “cycler” termico Bio-Rad iCycler.

Durante ogni ciclo i due filamenti di DNA vengono denaturati per permettere il successivo appaiamento dei primers (“annealing”), necessario per

la fase di allungamento catalizzata dalla Taq polimerasi (“elongation”). Terminati i cicli di amplificazione si ha un ultimo “step” di circa 7-10’ per consentire alla Taq polimerasi di allungare i filamenti di DNA rimasti incompleti.

I “primers” utilizzati sono stati progettati per amplificare selettivamente la sequenza di interesse del gene codificante per il recettore.

- FORWARD: 5’- ggTTCTgATCCTggTggTgTTgAT

- REVERSE: 5’- CCgATgAgACAACAgaACTTCT

Le reazioni di PCR sono state allestite come segue:

- Taq polimerase 50µM
- Taq buffer 10x
- dNTP mix (10 mM ciascuno)
- cDNA stampo 1 µg
- “Primer forward”
- “Primer reverse”
- H2O fino a un volume totale di 25 µl.

Per ogni reazione sono stati assemblati corrispondenti controlli negativi (eliminando il DNA stampo) e positivi (usando un DNA stampo già usato in precedenza).

Aliquote dei prodotti di reazione sono state sottoposte a elettroforesi su gel d’agarosio 1% con EtBr insieme a un marcatore di lunghezza per stimare la dimensione del frammento amplificato e valutarne la purezza, oltre che per valutare la specificità delle condizioni di reazione o eventuali contaminazioni dei reagenti.

### ***Western Blotting per CB1 receptor***

L’espressione del recettore CB1 degli endocannabinoidi e del recettore della  $\beta$ -actina nel parenchima epatico è stata valutata mediante metodica del Western Blotting.

Il Western blotting è un metodo utilizzato per verificare la presenza di una proteina specifica in una miscela complessa usando un anticorpo specifico diretto contro un dominio della proteina o una sequenza particolare inserita nella proteina stessa.

Le cellule sono state lisate mediante l'utilizzo di un opportuno buffer di lisi (TRIS-HCl 10mM, NaCl 50mM, EDTA pH 7.5 5mM, Triton X-100 1%, SDS 0,05%, NaF 50 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10mM, DTT ) arricchito di un cocktail di inibitori delle proteasi (Fenilmetansolfonilfluoruro , PMSF 1mM; Ortovanadato di Sodio 1mM; E-64 3μM; Bestatina 26 μM, Leupeptina 200 μM; Aprotinina 1μM).

I campioni sono stati omogeneizzati mediante omogenizzatore ad immersione, incubati per 30 minuti in ghiaccio e successivamente centrifugati a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C. Il sovrantante è stato raccolto, ne è stato quantificato il contenuto proteico totale ed aliquote da 100 μg di proteina sono state conservate a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

#### *Determinazione delle proteine totali*

La determinazione del contenuto proteico è stata effettuata mediante la metodica di Lorwy e prevede la preparazione di una retta di taratura costituita da 3 punti. Il primo punto [0 mg/ml] contiene solo acqua distillata, il secondo e il terzo punto contengono rispettivamente 0,75 mg/ml e 1,5 mg/ml di BSA (Albumina Sierica Bovina) in acqua distillata. Sia per le soluzioni che andranno a costituire la retta di taratura sia per i campioni precedentemente estratti verranno aggiunte la soluzione A e la soluzione B fornite dalla Bio-Rad (reagente A e reagente B Bio-Rad Dc Protein Assay, Bio-Rad Laboratories).

Dopo aver agitato al vortex, si lasciano le provette a temperatura ambiente per 15 minuti per permettere che si completi la reazione colorimetrica. Il saggio infatti si basa sull'azione del reattivo di Folin-Ciocalteu, il quale, ossidando gli anelli benzenici dei residui amminoacidici aromatici delle proteine,

conferisce una colorazione blu ai campioni, proporzionale alla quantità dei residui aromatici e quindi di proteina.

La lettura del campione allo spettrofotometro è effettuato ad una lunghezza d'onda di 750 nm contro il bianco (acqua distillata). Costruita la retta di taratura, la concentrazione proteica dei campioni è stata ricavata mediante interpolazione sulla retta dei rispettivi valori di assorbanza .

### *Elettroforesi*

Un'aliquota di lisato tissutale contenente 50µg di proteine per campione, è stata denaturata mediante aggiunta di Sample Buffer (TRIS-HCl 100mM ph 6.8, SDS 4%, bromofenoloblu 0,2%, glicerolo 20%, 2mercaptoetanololo 550µl) e riscaldamento a 95°C per 10 minuti.

I campioni così allestiti sono stati caricati su gel di poliacrilamide al 10%(acrilamide/ bisacrilamide 29/1) posizionato in una camera elettroforetica ed immerso in un tampone di corsa (25mM Tris base, 0.1% SDS, 0,2 M glicina, pH 8.3). Per controllare lo stato della corsa elettroforetica, oltre i campioni, è stato caricato anche un marker di pesi molecolari (kaleidoscope, Bio-Rad).

Il gel ha lo spessore di 1mm ed è costituito da due differenti porzioni che sono: lo stacking in cui vengono caricati i campioni ed il resolving dove avviene la separazione delle proteine durante la corsa.

### **RESOLVING (10%)      (per un tot. di 20 ml)**

H2O	7,900 ml
TRISb 1,5M(ph 8,8)	5,000 ml
SDS (10%)	0,200 ml
30% acrylamide mix	6,700 ml
APS (10%)	0,200 ml
TEMED	0,008 ml

**STACKING (5%) (per un tot. di 6 ml)**

H <sub>2</sub> O	4,100 ml
TRISb 1,0M(ph 6,8)	0,750 ml
SDS (10%)	0,060 ml
30% acrylamide mix	1,000 ml
APS (10%)	0,060 ml
TEMED	0,006 ml

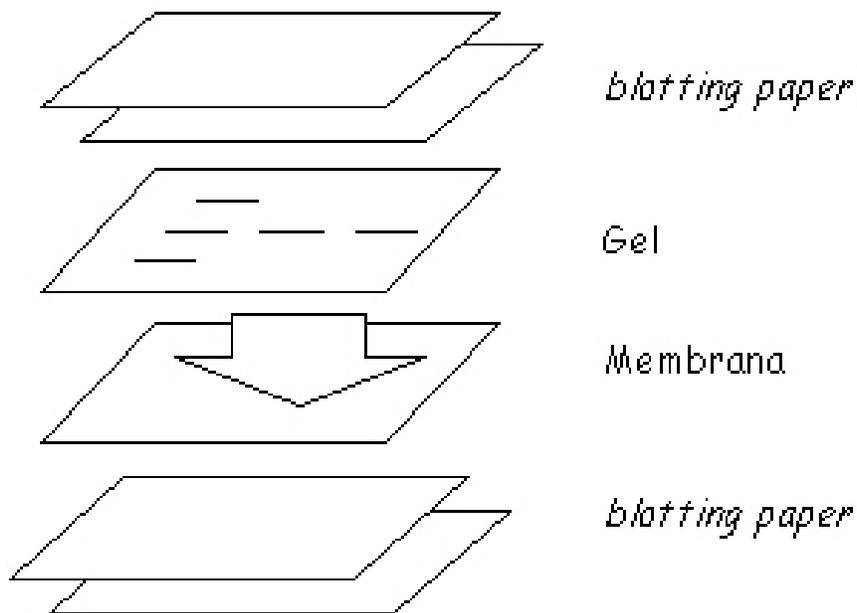
Catalizzatori APS al 10% e TEMED.

La separazione è stata ottenuta mediante applicazione alla camera elettroforetica di un campo elettrico di 20 mA prima (fino all'allineamento dei campioni) e 40 mA dopo.

*Elettrotrasferimento*

Le proteine separate mediante elettroforesi sono state trasferite dal gel su un foglio di nitrocellulosa tramite elettrotrasferimento con camera trans-blot in tampone di trasferimento (0,2M glicina, 25mM Bis-Tris, Metanolo 20%).

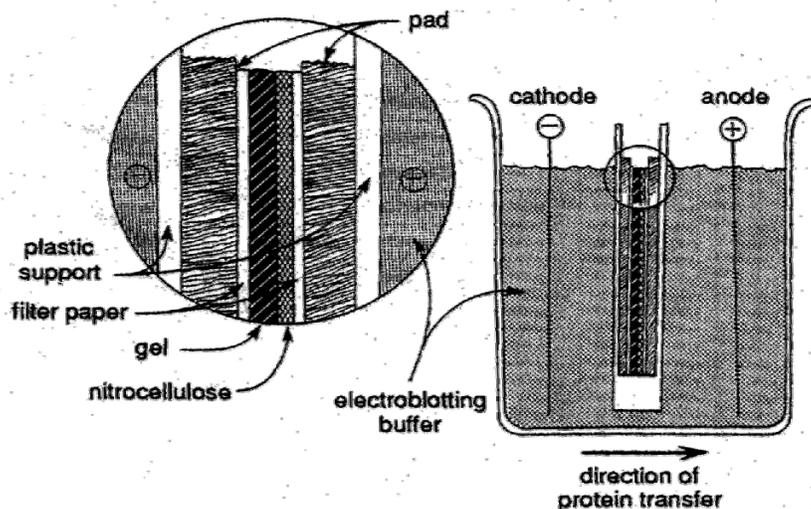
Il gel, la nitrocellulosa e i fogli di blotting paper (questi ultimi due sono stati lasciati previamente stabilizzare in tampone di trasferimento) sono stati disposti in modo da formare un "sandwich", all'interno della camera trans-blot (*Figura 7*).



**Figura 7.** La figura rappresenta il “sandwich” all’interno della camera trans-blot.

Il trans-blot consta di 2 elettrodi paralleli (*Figura 8*); il foglio di nitrocellulosa è stato posizionato tra l’anodo e il gel per la presenza delle cariche negative sulle proteine. Il trasferimento delle proteine è stato ottenuto mediante applicazione alla camera di un campo elettrico costante di 300 mA per 2 h .

L’efficienza del trasferimento su nitrocellulosa è stata valutata mediante colorazione con Rosso Ponceau. Verificato ciò ed eliminato il colorante le proteine di interesse sono state successivamente visualizzate tramite immunorivelazione.



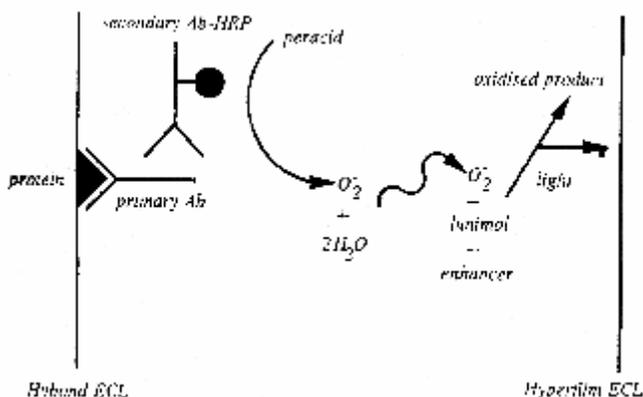
**Figura 8.** Rappresentazione schematica della camera trans-blot.

### *Immunorivelazione*

La membrana di nitrocellulosa è stata posta in “blocking solution” (TBS-TWEEN (TBST) e latte al 5%; il TBST è costituito da 50mM Bis-Tris, NaCl 150mM, Tween 20 all’0,05% e H<sub>2</sub>O distillata ) per 60 minuti a temperatura ambiente, al fine di bloccare tutti i siti aspecifici di interazione idrofobica. Trascorsi i 60 minuti di incubazione la membrana è stata sottoposta a lavaggio con tampone TBST per pochi minuti ed esposta per tutta la notte ad una soluzione contenente l’anticorpo primario anti-CB1 (diluizione 1:200 in TBST, concentrazione: 1µg/ml) a 4°C in agitazione continua.

Successivamente la membrana è stata sottoposta a 3 lavaggi di 10 minuti ciascuno con TBST, al fine di eliminare ogni residuo di anticorpo non legato. La nitrocellulosa è stata poi incubata per 60 minuti con una soluzione contenente l’anticorpo secondario alla diluizione di 1:200 (policlonale goat-anti-rabbit) coniugato con perossidasi di rafano (horseradish peroxidase; HRP) ed in grado di riconoscere la porzione costante della IgG utilizzata come anticorpo primario.

Trascorsi i 60 minuti, la nitrocellulosa è stata sottoposta ad ulteriori lavaggi in TBST per eliminare l'anticorpo secondario in eccesso ed è stata poi esposta per un minuto al sistema di rivelazione ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Biosciences UK), costituito da  $H_2O_2$  e luminolo (substrato chemiluminescente). La perossidasi riduce l' $H_2O_2$  liberando  $2O^-$  che, andando ad ossidare il luminolo, determinano produzione di luce (Figura 9).



**Figura 9.** La figura rappresenta la reazione che avviene tra la perossidasi ed i componenti dell'ECL Western Blotting Analysis System.

La luce è in grado di impressionare una lastra radiografica che, una volta sviluppata, dà un'indicazione della quantità di proteina di interesse presente nel campione.

Come proteina di riferimento è stata utilizzata la  $\beta$ -actina; la nitrocellulosa precedentemente usata per individuare il recettore CB1 è stata incubata con anticorpo primario anti- $\beta$ -actina monoclonale anti-mouse con diluizione 1:2500 e anticorpo secondario rabbit anti-mouse (Envision) con diluizione 1:200, mediante la metodica precedentemente descritta.

## **Analisi statistica**

La distribuzione dei dati riguardanti i parametri ossidativi è risultata non essere normale, come dimostrato dal test di Kolmogorov-Smirnov (29). I gruppi sono stati confrontati usando il Wilcoxon rank sum test considerando significativi i valori di  $p \leq 0.05$ . I dati sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard. Per l'analisi statistica si è utilizzato il software SPSS 8.0 installato su un pc con windows NT 4.0 (30,31).

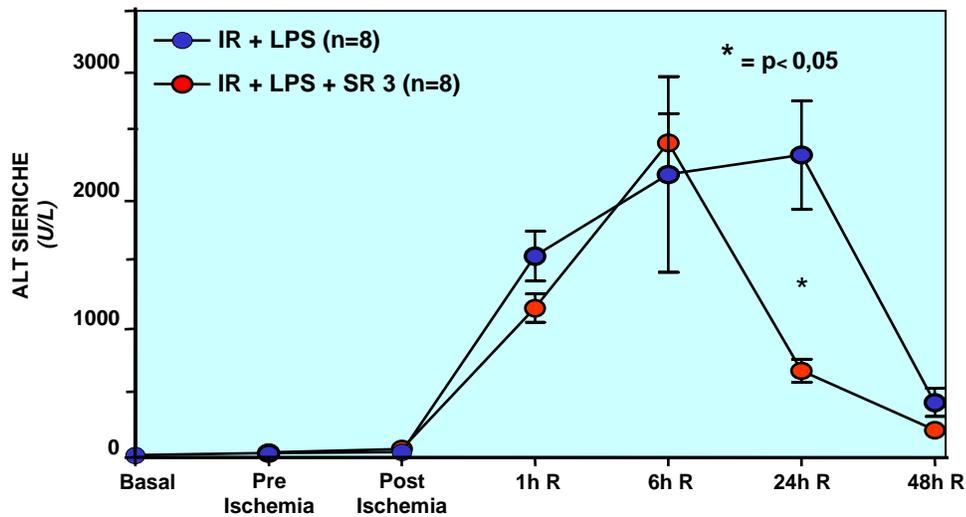
## RISULTATI

### Parametri Biochimici e morfologici

#### *Transaminasi sieriche (Figura 10 e 11).*

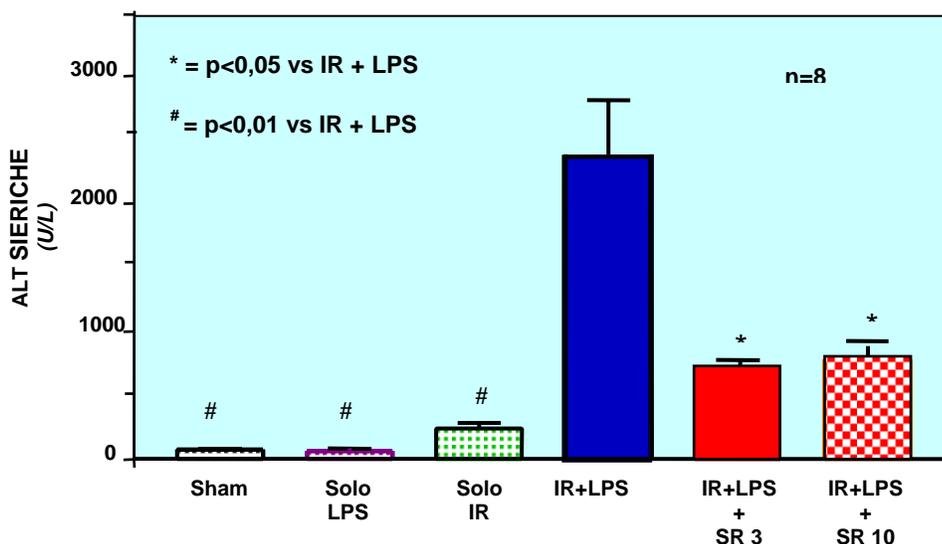
Il livello di alanina aminotransferasi nei ratti trattati con IR+LPS, prima della somministrazione dell'SR141716A 3mg/kg o del veicolo e prima del inizio dell'ischemia era nei limiti della normalità in entrambi i gruppi. Al termine dell'ischemia, il livello di ALT era leggermente aumentato in entrambi senza differenze significative.

Come atteso, con la riperfusione si assisteva ad un significativo aumento della concentrazione sierica di ALT, che raggiungeva un massimo dopo 6-24 ore per poi declinare rapidamente dopo 48 ore in entrambi i gruppi. E' interessante notare che a 24 ore di riperfusione, quando la risposta infiammatoria dovrebbe raggiungere la massima intensità, il livello di ALT era significativamente inferiore nei ratti trattati con SR141716A rispetto ai ratti di controllo ( $2360 \pm 424$  vs  $674 \pm 77$  U/L;  $p < 0,001$ ).



**Figura 10:** Livelli sierici di alanina aminotransferasi (ALT) nel modello di ischemia-riperfusione associata a somministrazione di LPS in ratti di controllo (IR+LPS) e ratti trattati con SR141716A (IR+LPS+SR3) nei diversi tempi sperimentali.

In *Figura 11* vengono confrontati i livelli sierici di ALT a 24h di ri-perfusione (tempo sperimentale in cui sono state osservate le maggiori differenze) nei diversi gruppi sperimentali: come atteso, il livello delle transaminasi rimane vicino ai valori basali nei ratti Sham ( $72 \pm 6$  U/L) e nei ratti trattati col solo LPS ( $60 \pm 16$  U/L). La procedura di I-R produce un netto aumento delle ALT ( $229 \pm 37$  U/L) ma, è interessante osservare come IR ed LPS presentino un effetto sinergico producendo un danno significativamente maggiore rispetto a quello osservato in tutte le altre condizioni sperimentali. La somministrazione di SR 141716A, sia nella dose di 3mg/kg ( $674 \pm 77$  U/L) che di 10mg/kg ( $775 \pm 138$  U/L), determina una significativa riduzione del danno prodotto da I-R+LPS, senza che si osservino differenze tra i due dosaggi del farmaco.



**Figura 11:** Livelli sierici di alanina aminotransferasi (ALT) a 24 ore di ri-perfusione nei diversi gruppi sperimentali.

### ***Istologia tradizionale (Figure 12 e 13).***

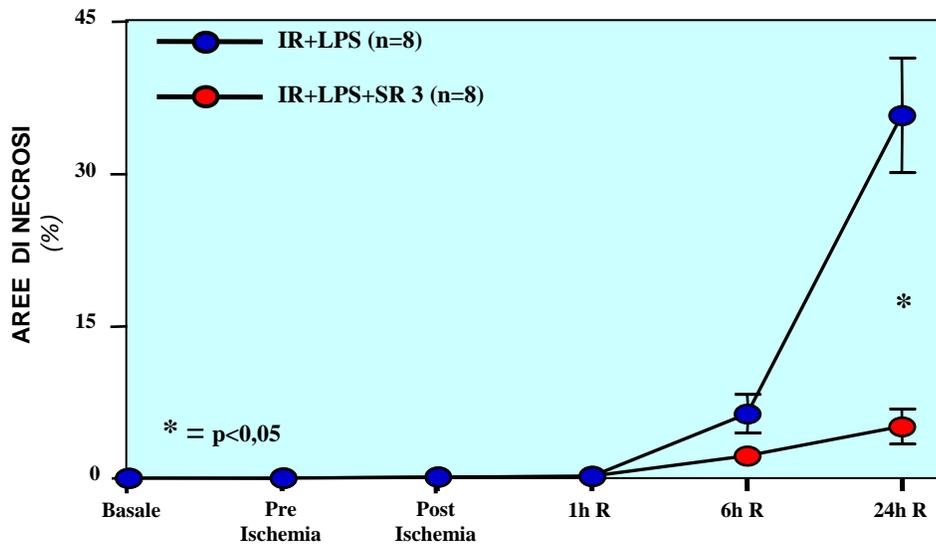
Il tessuto epatico nei ratti sottoposti ad IR+LPS, prima della somministrazione dell'SR141716A o del veicolo e prima del'inizio dell'ischemia presentava un'istologia normale in entrambi i gruppi. Al termine dell'ischemia, minime alterazioni citoplasmatiche espressione di sofferenza epatocitaria erano riscontrabili in entrambi i gruppi.

Nelle prime ore di ri-perfusione, si assisteva allo sviluppo di un danno epatico rappresentato da un progressivo aumento delle cellule necrotiche e da segni di congestione ematica a livello dei sinusoidi. Dopo 6 ore di ri-perfusione, piccoli focolai di necrosi erano identificabili nel lobulo epatico senza sostanziali differenze tra i due gruppi (*Figura 12*).

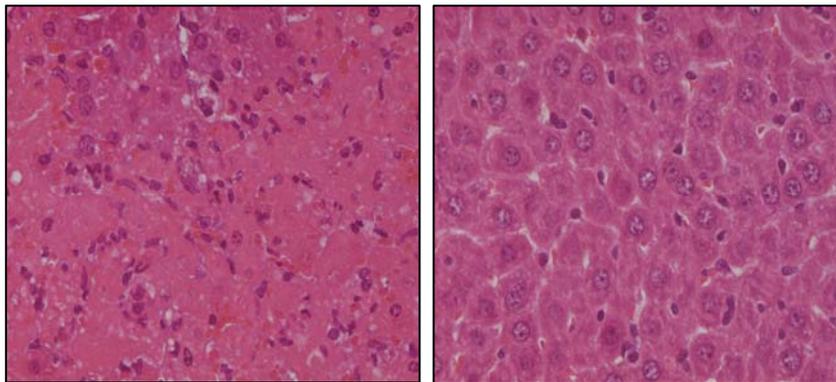
Al contrario a 24 ore di ri-perfusione, si rilevavano significative differenze tra i due gruppi sperimentali: in particolare, gli animali di controllo presentavano estese aree di necrosi coagulativa che interessava le varie zone del lobulo epatico ed un importante infiltrato infiammatorio costituito prevalentemente da polimorfonucleati. Tali reperti, seppur presenti, erano di estensione significativamente inferiore nei ratti trattati con SR141716A (*Figura 12*). Infatti, la percentuale di epatociti necrotici è risultata significativamente inferiore nei ratti trattati con SR141716A rispetto ai ratti di controllo ( $5 \pm 2$  vs  $36 \pm 6$  %;  $p < 0,05$ ).

Dopo 48 ore di ri-perfusione, l'estensione della necrosi era ridotta in entrambi in gruppi pur rimanendo maggiore nei ratti di controllo.

In *Figura 12a* si possono vedere due immagini rappresentative dei livelli di necrosi nei due gruppi IR+LPS ed IR+LPS+SR.



**Figura 12:** Percentuale di aree necrotiche nel modello di ischemia-riperfusione associata a somministrazione di LPS in ratti di controllo (IR+LPS) e ratti trattati con SR141716A (IR+LPS+SR3) nei diversi tempi sperimentali.

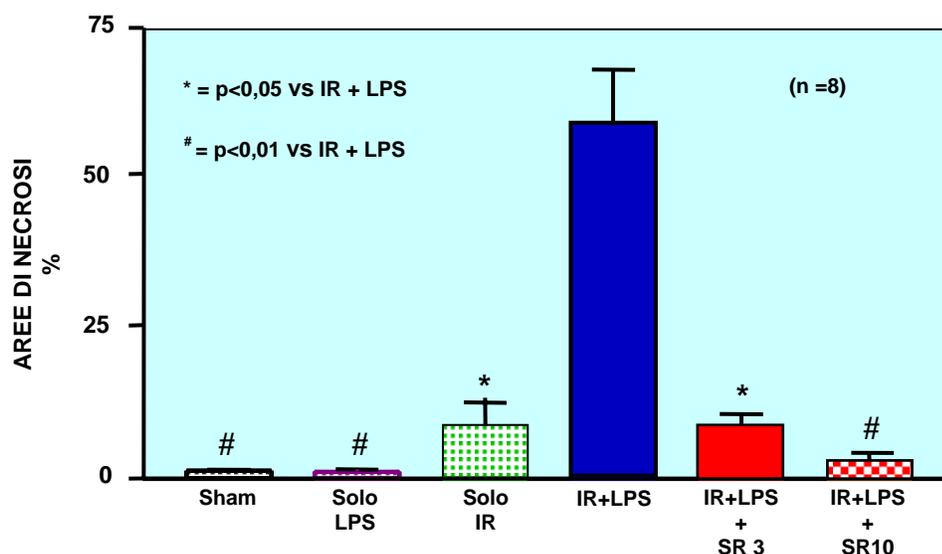


**Figura 12a:** Immagini rappresentative di preparati istologici in ematossilina-eosina (ingrandimento 40x) a 24 ore di riperfusione nel modello di ischemia-riperfusione associata a somministrazione di LPS in ratti di controllo (IR+LPS: sinistra) e ratti trattati con SR141716A (IR+LPS+SR:destra).

In *Figura 13* vengono confrontate le percentuali di area occupata da tessuto necrotico nei preparati istologici ottenuti a 24h di riperfusione nei diversi gruppi sperimentali. I risultati confermano quanto già indicato dalle transaminasi

sieriche: i ratti Sham e quelli trattati solo con LPS presentano un quadro istologico praticamente normale ( $0 \pm 0$  e  $0,5 \pm 0$  %).

La procedura di I-R produce un netto aumento della necrosi ma, anche in questo caso si osserva come l'associazione di I-R ed LPS produca un danno significativamente maggiore rispetto a quello osservato in tutte le altre condizioni sperimentali. La somministrazione di SR 141716A, sia nella dose di 3mg/kg che di 10mg/kg ( $3 \pm 1$ %), determina una significativa riduzione della necrosi prodotta da I-R+LPS, senza che si osservino differenze tra i due dosaggi del farmaco.



**Figura 13:** Percentuale di tessuto necrotico a 24 ore di ri-perfusione nei diversi gruppi sperimentali.

### Mortalità

La mortalità nei ratti sottoposti ad IR e LPS che hanno ricevuto SR141716 o veicolo, è stata del 10-15% in ognuno dei tre gruppi. Come atteso, non si è registrata mortalità invece nei gruppi Sham, sola IR e solo LPS.

## **Parametri emodinamici**

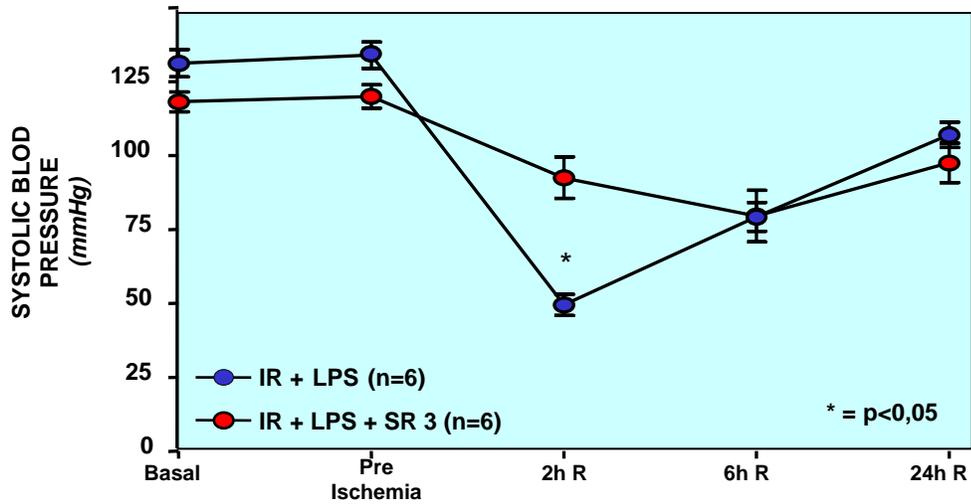
### ***Valutazione della pressione sistolica arteriosa***

In *Figura 14* è graficato l'andamento della pressione sistolica nei gruppi di ratti sottoposti ad IR+LPS ed SR(3mg)+IR+LPS nei diversi tempi sperimentali.

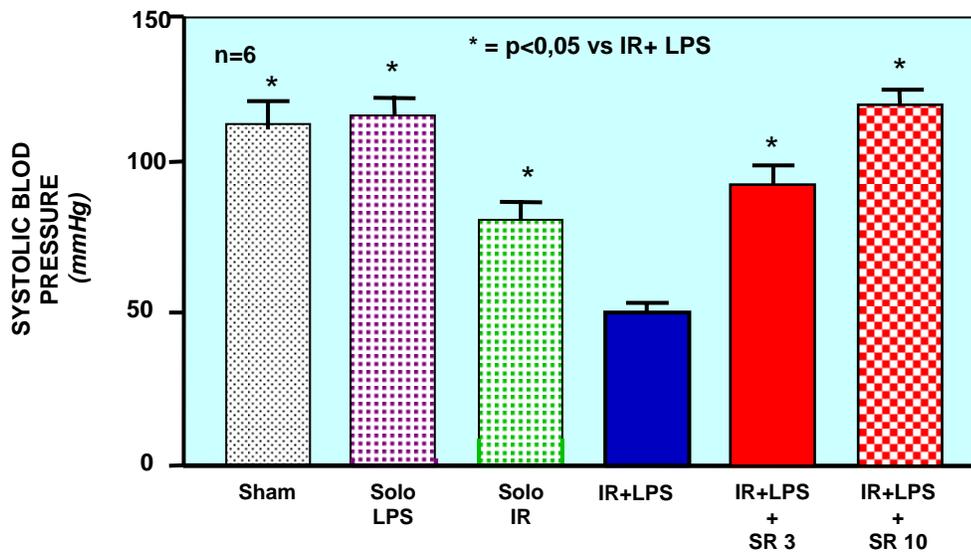
L'andamento della pressione sistolica nei ratti trattati con IR+LPS, prima della somministrazione dell'SR141716A 3mg/kg o del veicolo ed al termine dell'ischemia era nei limiti della normalità in entrambi i gruppi.

Con la ri-perfusione, si assisteva ad una caduta della pressione sistolica, con un picco massimo a 2 ore, significativamente maggiore nel gruppo IR+LPS rispetto al gruppo trattato con SR141716 ( $50 \pm 3$  vs  $93 \pm 6$  mmHg;  $p < 0,05$ ). Nei tempi sperimentali successivi si assisteva ad un lento recupero dei valori pressori, senza differenze rilevabili fra i due gruppi sperimentali.

In *Figura 15* vengono confrontate le pressioni sistoliche a 2 ore di ri-perfusione nei diversi gruppi sperimentali. Come atteso, i ratti Sham ( $113 \pm 5$ ) e quelli trattati solo con LPS ( $113 \pm 7$ ) presentano valori pressori vicini a quelli basali; la procedura di I-R produce un calo della pressione ( $86 \pm 12$ ) ma è interessante osservare come IR ed LPS presentino un effetto sinergico producendo un calo significativamente maggiore rispetto a quello osservato in tutte le altre condizioni sperimentali. La somministrazione di SR 141716A, sia nella dose di 3mg/kg ( $93 \pm 6$ ) che di 10mg/kg ( $116 \pm 7$ ) determina un significativo aumento dei valori di pressione rispetto ai ratti sottoposti alla sola I-R+LPS senza che si osservino differenze tra i due dosaggi del farmaco.



**Figura 14 :** Valori di pressione sistolica nel modello di ischemia-riperfusion associata a somministrazione di LPS in ratti di controllo (IR+LPS) e ratti trattati con SR141716A (IR+LPS+SR3) nei diversi tempi sperimentali.

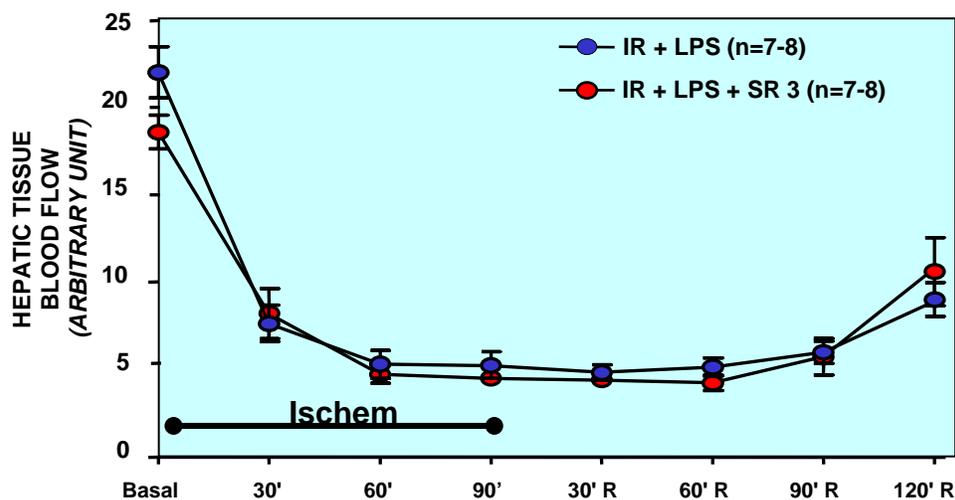


**Figura 15 :** Valori di pressione sistolica a 2h di riperfusione nei diversi gruppi sperimentali.

### ***Valutazione del flusso epatico parenchimatico***

In *Figura 16* è graficato l'andamento della flusso ematico parenchimatico nei gruppi di ratti IR+LPS ed SR(3mg)+IR+LPS nei diversi tempi sperimentali.

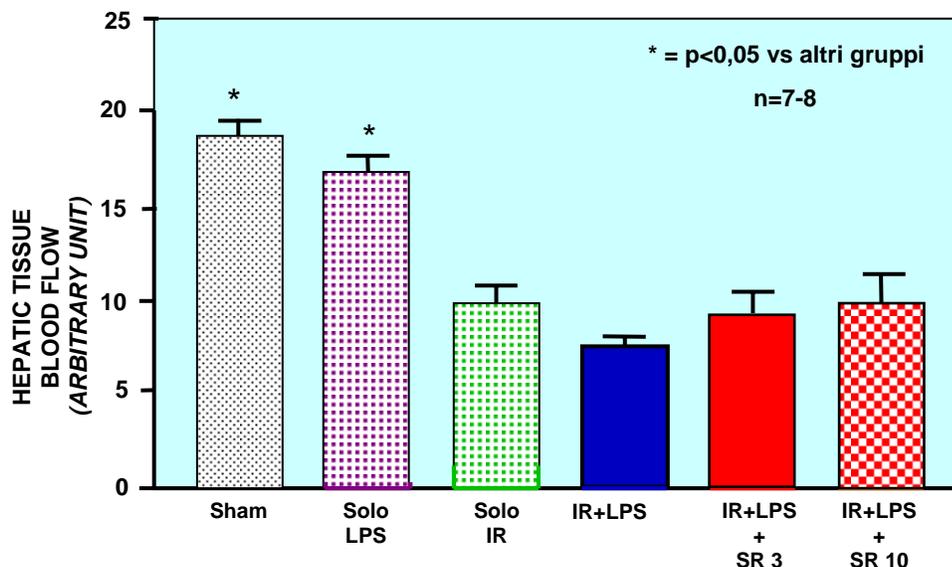
Come atteso, ed ad attestare un'efficace procedura, durante l'ischemia si verificava un progressivo calo del flusso parenchimatico rispetto ai valori basali in entrambi i gruppi sperimentali. Durante la riperfusione si verificava un progressivo e lento ripristino del flusso ematico parenchimatico che tuttavia, nell'arco di due ore, non riusciva a recuperare fino a tornare a valori basali. Non si sono registrate differenze nei due gruppi sperimentali in nessuno dei tempi presi in considerazione.



***Figura 16*** : Valori di flusso ematico tissutale nel modello di ischemia-riperfusione associata a somministrazione di LPS in ratti di controllo (IR+LPS) e ratti trattati con SR141716A (IR+LPS+SR3) nei diversi tempi sperimentali.

In *Figura 17* vengono confrontati i valori di flusso parenchimatico a 2 ore di riperfusione nei diversi gruppi sperimentali. Come atteso, i ratti Sham ( $16 \pm 1$ ) e quelli trattati solo con LPS ( $17 \pm 1$ ) presentano valori di flusso vicini a quelli basali ( $22 \pm 2$ ) la procedura di I-R con o senza associazione di LPS, determina

un significativo calo del flusso parenchimatico (IR+LPS:  $8 \pm 1$  e IR:  $10 \pm 1$  vs  $22 \pm 2$ ;  $p < 0,05$ ). Valori analoghi di flusso sono stati registrati anche nei ratti trattati con SR141716 sia nella dose di 3mg/kg ( $9 \pm 2$ ) che di 10mg/kg ( $10 \pm 2$ ) senza differenze tra le due posologie del farmaco.



**Figura 17** : Valori di flusso ematico tissutale a 2h di riperfusione nei diversi gruppi sperimentali.

## Parametri Infiammatori

### *Valutazione del numero di PMN/campo su sezioni istologiche di parenchima epatico*

In *Figura 18* vengono confrontati il numero di PMN/campo nei preparati istologici ottenuti dai gruppi IR+LPS ed IR+LPS+SR, nei diversi tempi sperimentali.

Il tessuto epatico nei ratti trattati con IR+LPS, prima della somministrazione dell'SR141716A o del veicolo, prima dell'inizio dell'ischemia

e fino al termine della stessa, presentava un'istologia normale in entrambi i gruppi, privo di infiltrato neutrofilico.

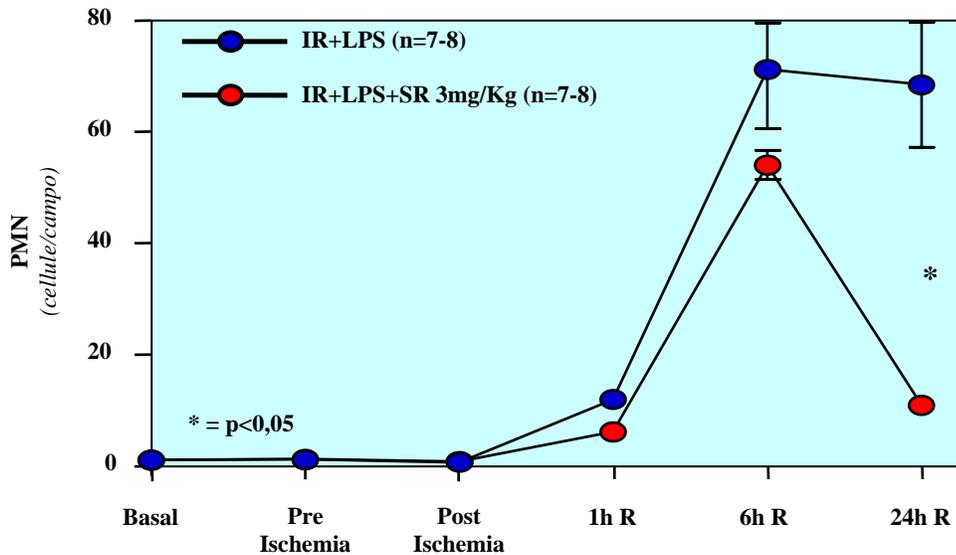
Nelle prime ore di ri-perfusione, si assisteva allo sviluppo di un danno epatico maggiore, rappresentato da un progressivo aumento dei polimorfonucleati e da segni di congestione ematica a livello dei sinusoidi, senza differenze sostanziali fra i due gruppi.

Dopo 6 ore di ri-perfusione, focolai infiammatori erano identificabili nel lobulo epatico con differenze significative tra i ratti trattati col veicolo e quelli trattati con SR141716 3mg/Kg ( $54 \pm 3$  vs  $71 \pm 10$  PMN/campo;  $p < 0,05$ ) (*Figura 18*).

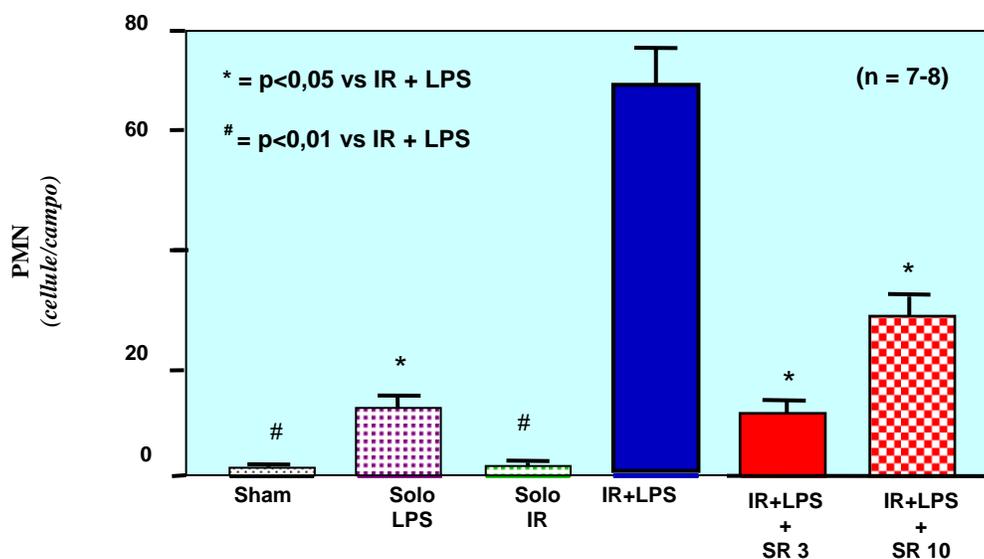
A 24 ore di ri-perfusione, seppure il quadro evolveva verso una normalizzazione, si continuavano a rilevare significative differenze tra i due gruppi sperimentali: in particolare, gli animali di controllo presentavano importanti aree di infiammazione caratterizzate da un consistente infiltrato neutrofilico che interessava la varie zone del lobulo epatico, associato a necrosi coagulativa. Tali reperti, seppur presenti, erano di estensione significativamente inferiore nei ratti trattati con SR141716A (*Figura 18*). Infatti, il numero di polimorfonucleati è risultato significativamente inferiore nei ratti trattati con SR141716A rispetto ai ratti di controllo ( $11 \pm 1$  vs  $69 \pm 12$  PMN/campo;  $p < 0,05$ ) Dopo 48 ore di ri-perfusione, l'estensione dell'infiammazione era ridotta in entrambi in gruppi, pur rimanendo maggiore nei ratti di controllo (dati non graficati).

In *Figura 19* vengono confrontati i valori di PMN/campo in tutti i gruppi sperimentali a 6h di ri-perfusione: come atteso, i ratti Sham ( $2 \pm 0$ ) e quelli trattati solo con LPS ( $13 \pm 1$ ) presentano un quadro istologico praticamente normale con un numero di PMN vicino ai valori basali. La procedura di I-R produce un aumento dei PMN ma, è interessante osservare come l'associazione di IR ed LPS abbia un effetto sinergico producendo un danno significativamente maggiore di quello osservato in tutte le altre condizioni sperimentali ( $69 \pm 11$ ).

La somministrazione di SR 141716A, sia nella dose di 3mg/kg ( $11 \pm 1$ ) che di 10mg/kg ( $28 \pm 4$ ) determina una significativa riduzione del numero dei PMN rispetto ai ratti sottoposti alla sola I-R+LPS, senza che si osservino differenze tra i due dosaggi del farmaco.



**Figura 18:** Numero di PMN/campo nel modello di ischemia-riperfusion associata a somministrazione di LPS in ratti di controllo (IR+LPS) e ratti trattati con SR141716A (IR+LPS+SR3) nei diversi tempi sperimentali.



**Figura 19** :Numero di PMN/campo a 6h nei diversi gruppi sperimentali.

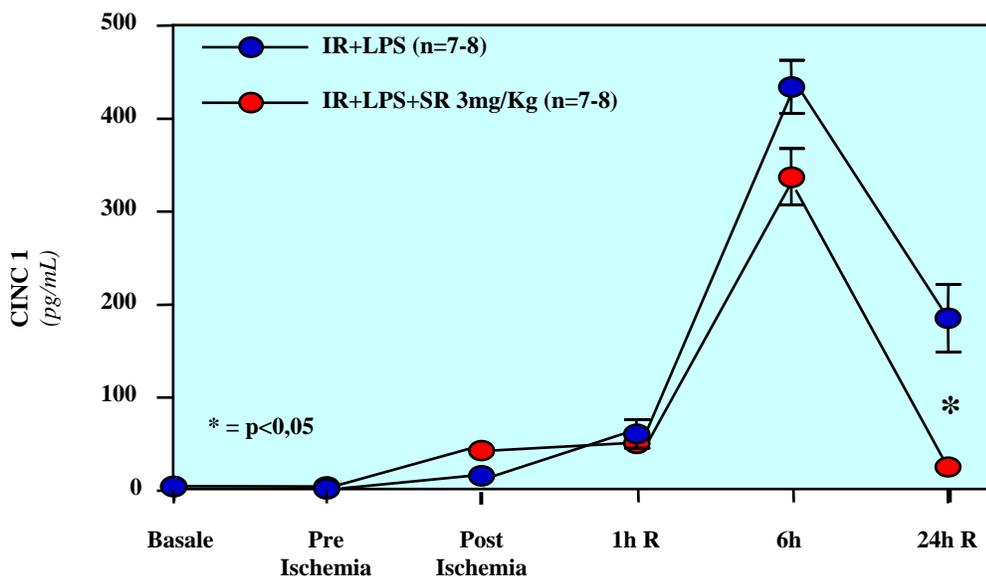
### **Valutazione della concentrazione epatica di CINC-1**

In *Figura 20* viene confrontata la concentrazione tissutale di CINC-1 nei gruppi IR+LPS ed IR+LPS+SR, nei diversi tempi sperimentali.

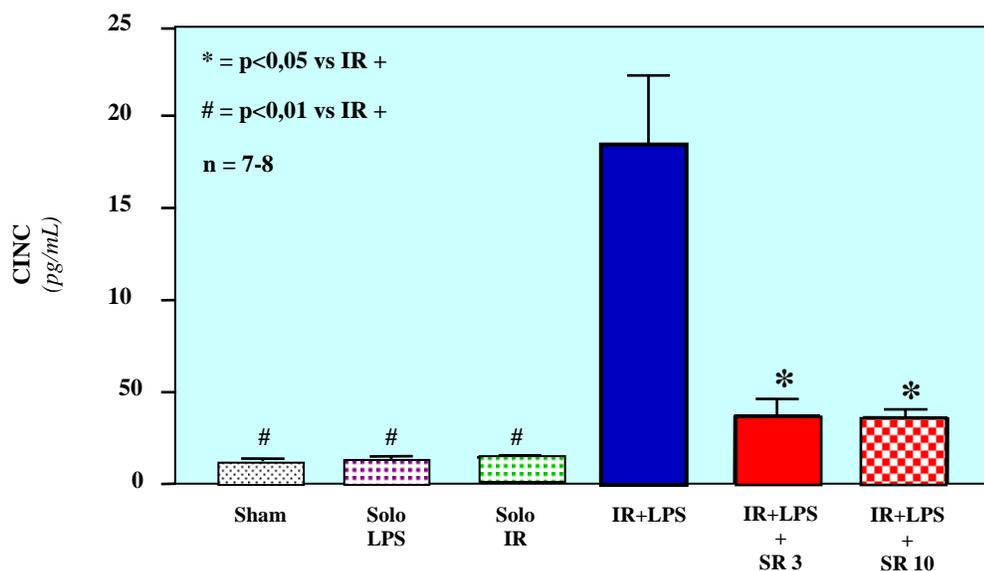
La concentrazione tissutale di questa citochina nei ratti trattati con IR+LPS, prima della somministrazione dell'SR141716A 3mg/kg o del veicolo e prima del'inizio dell'ischemia era nei limiti della normalità in entrambi i gruppi. Al termine dell'ischemia, la concentrazione era leggermente aumentata in entrambi senza differenze significative.

Come atteso invece, con la riperfusione si assisteva ad un aumento dei valori di CINC-1 in entrambi i gruppi, con un massimo a 6 ore, ma minore nei ratti trattati con SR141716 rispetto ad i ratti trattati con IR+LPS ( $343 \pm 39$  vs  $425 \pm 18$ ). A 24 ore i valori tendono a rientrare verso la normalità seppure mantenendo una differenza significativa fra i due gruppi (SR+IR+LPS:  $37 \pm 9$  vs IR+LPS:  $186 \pm 37$ ;  $p<0,05$ ).

In *Figura 21* vengono confrontati i valori di concentrazione tissutale di CINC-1 in tutti i gruppi sperimentali a 6h di riperfusione. Come atteso, il contenuto di citochina rimane vicino ai valori basali nei ratti Sham ( $13 \pm 2$ ) e nei ratti trattati col solo LPS ( $12 \pm 3$ ). La procedura di I-R produce solo un lievissimo aumento dei valori di CINC-1 ( $14 \pm 2$ ) ma, è interessante osservare come IR ed LPS abbiano un effetto sinergico facendo registrare valori significativamente maggiori ( $186 \pm 37$ ) rispetto a quelli osservati in tutte le altre condizioni sperimentali. La somministrazione di SR 141716A, sia nella dose di 3mg/kg ( $37 \pm 9$ ) che di 10mg/kg ( $36 \pm 4$ ) determina una significativa riduzione del contenuto tissutale di CINC-1 rispetto ai ratti sottoposti alla sola I-R+LPS, senza che si osservino differenze tra i due dosaggi del farmaco.



**Figura 20:** Concentrazione tissutale della chemochina CINC-1 nel modello di ischemia-riperfusione associata a somministrazione di LPS in ratti di controllo (IR+LPS) e ratti trattati con SR141716A (IR+LPS+SR3) nei diversi tempi sperimentali.



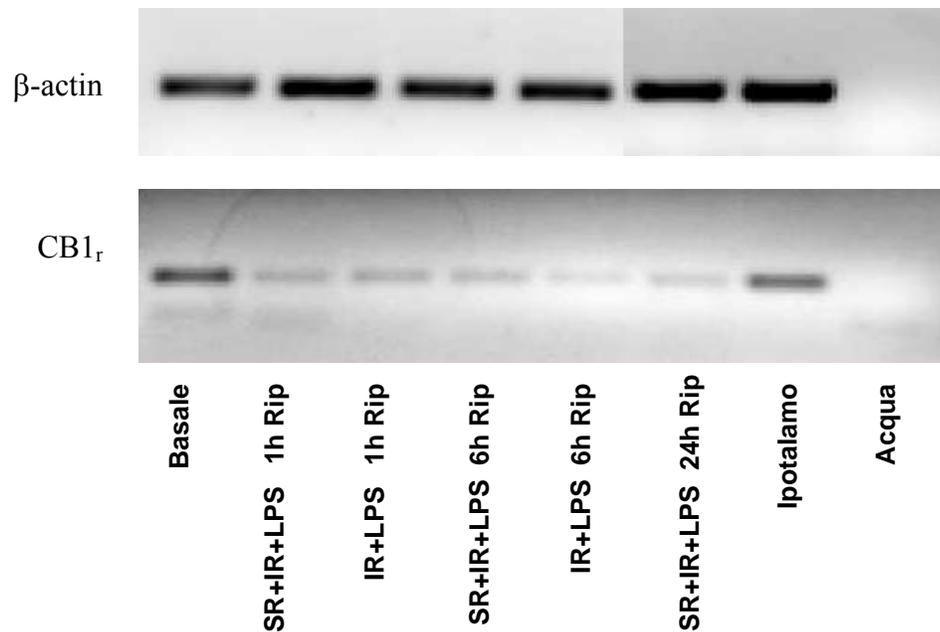
**Figura 21** :Concentrazione tissutale della chemochina CINC-1 a 6h di ri-perfusione nei diversi gruppi sperimentali.

### **PCR per CB1 receptor**

La PCR è stata effettuata su cDNA per confermare la presenza del recettore CB1 e valutarne l'espressione nel parenchima epatico. Come controllo positivo interno è stato utilizzato cDNA di ipotalamo. I risultati ottenuti sono ancora preliminari e non permettono di esprimere un parere sulle differenze di espressione di tale recettore nei differenti gruppi sperimentali.

E' stata individuata una debole banda in tutti i gruppi e nei differenti tempi sperimentali (*Figura 22*).

Come gene di riferimento è stata utilizzata la  $\beta$ -Actina.

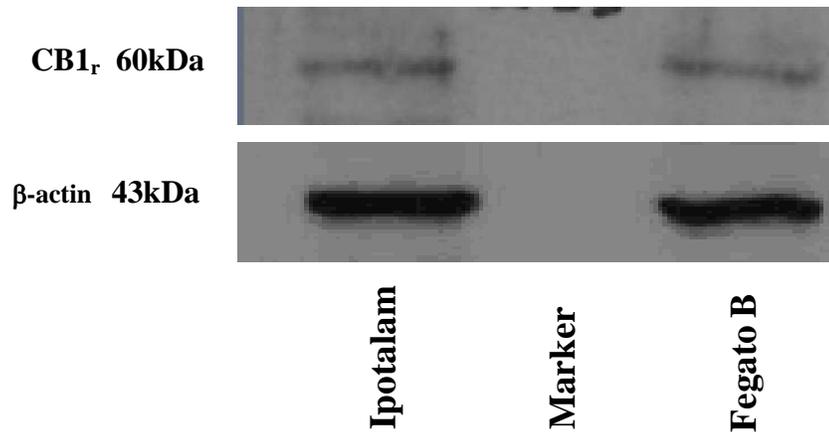


**Figura 22.** PCR per il recettore CB1 e per la  $\beta$ -actina in fegato ed in ipotalamo di ratto nel modello di ischemia-riperfusion associata a somministrazione di LPS in ratti di controllo (IR+LPS) e ratti trattati con SR141716A (IR+LPS+SR3) a diversi tempi sperimentali.

### **Western Blotting per CB1 receptor**

Il Western Blotting è stato effettuato per l'individuazione dell'espressione del recettore CB1 su omogenati di fegato. Come controllo positivo interno è stato utilizzato omogenato di ipotalamo. I risultati ottenuti sono ancora preliminari non essendo stata ancora del tutto messa a punto la metodica. E' stata individuata una debole banda di circa 60 kD che, con ogni probabilità, corrisponde a quella del recettore CB1 (Figura 23).

Come proteina di riferimento è stata utilizzata la  $\beta$ -actina.



**Figura 23.** Western Blotting per il recettore CB1 e per la  $\beta$ -actina in fegato di ratti ed in ipotalamo nel modello di ischemia-riperfusion associata a somministrazione di LPS in ratti di controllo basali (B).

## Conclusioni

Dall'analisi dei dati si è potuto osservare che la somministrazione di LPS nel gruppo IR-LPS, rispetto al gruppo di ratti trattato con la sola ischemia-riperfusion, genera un quadro caratterizzato, oltre che da un maggior danno tissutale (ALT, Necrosi), anche da un processo infiammatorio più importante (PMN, CINC-1) accompagnato da una maggiore pressione sistemica che però non si traduce in un diverso flusso enteroepatico.

La somministrazione di SR141716 riporta tutti questi parametri verso valori significativamente minori e spesso vicini a quelli fisiologici (pressione sistolica), svolgendo un ruolo importantissimo nella riduzione del processo infiammatorio associato al danno da ischemia-riperfusion.

L'analisi di questi dunque ci permette di concludere questo studio dicendo che l'effetto protettivo del farmaco SR141716 nel danno da Ischemia-

Riperfusione è molto probabilmente mediato da un'azione anti-infiammatoria piuttosto che emodinamica.

## DISCUSSIONE

Questo studio dimostra che un antagonista del recettore CB1 dei cannabinoidi, l'SR141716A, riduce significativamente l'entità del danno epatico, in un modello di ischemia riperfusione associata a somministrazione di LPS.

I modelli animali di ischemia riperfusione epatica combinati a somministrazione di LPS servono per riprodurre la sepsi che si può verificare dopo una procedura chirurgica epatica. Infatti durante l'ischemia il clampaggio della vena porta può favorire la traslocazione batterica dal lume intestinale al circolo ematico. Al momento del declampaggio quindi una certa quantità di endotossine può passare nel circolo portale e arrivare al fegato, contribuendo ad amplificare il danno infiammatorio indotto dall'ischemia riperfusione.

L'endotossemia potrebbe quindi svolgere un ruolo importante nella genesi dell'insufficienza epatica o addirittura di insufficienza multi organo. (25)

E' stato dimostrato infatti che la somministrazione di anticorpi monoclonali anti-LPS è in grado di ridurre il danno in fegati esposti ad ischemia-riperfusione. (28)

Nel nostro modello sperimentale la somministrazione di SR 141716A ha ridotto il danno epatico. Infatti, sia la concentrazione sierica delle transaminasi che la percentuale dell'area di necrosi, valutata utilizzando la citometria per immagini, presentano valori significativamente inferiori nei ratti trattati con l'antagonista rispetto ai controlli.

Questa protezione potrebbe essere dovuta a due differenti meccanismi. Infatti gli andocannabinoidi sono sia potenti vasodilatatori che mediatori dell'infiammazione.

La vasodilatazione sistemica indotta dall'LPS potrebbe avere un importante ruolo nella amplificazione del danno da ischemia riperfusione. Infatti durante le prime fasi di riperfusione, l'LPS vasodilatando il circolo sistemico potrebbe ridurre la quantità di sangue che giunge al fegato proprio in un momento in cui l'apporto di ossigeno è importante per attivare i meccanismi di riparazione del

danno; tale effetto potrebbe essere aumentato dal fatto che LPS, secondo alcuni autori, potrebbe vasocostringere l'arteria epatica riducendo ulteriormente la quantità di sangue arterioso che giunge al fegato. (29)

Inoltre, in letteratura vi sono numerose evidenze che indicano che gli endocannabinoidi sono importanti mediatori dell'azione vasodilatante del LPS. E' stato dimostrato che l'endotossina stimola la produzione di anandamide e di 2-arachidonoilglicerolo, rispettivamente, da parte dei macrofagi e dalle piastrine circolanti (13). Entrambe queste sostanze, mediante un'azione paracrina, contribuiscono all'ipotensione indotta da LPS attraverso una vasodilatazione provocata, almeno per buona parte, dal loro legame con il recettore CB1 (13).

L'azione del SR141716 è piuttosto complessa e probabilmente contrasta l'azione vasodilatante degli endocannabinoidi a più livelli.

Infatti l'SR 141716 potrebbe impedire il legame tra endocannabinoidi e CB1 a livello endoteliale (30), potrebbe avere un'azione cardio stimolante indipendente dai recettori CB1 e CB2 (31) oppure potrebbe anche interagire con i neuroni che regolano il tono vascolare (32). Estendendo questa osservazione al nostro modello sperimentale, il mantenimento delle pressione arteriosa su valori più elevati attraverso la somministrazione di SR141716A potrebbe garantire una pressione di perfusione epatica tale da ridurre il grado di necrosi garantendo un adeguato apporto di ossigeno e substrati metabolici al parenchima.

Nel nostro modello si osserva solamente a 2 ore di riperfusione una pressione arteriosa significativamente aumentata nei ratti trattati con SR 141716 rispetto a quelli trattati con veicolo. Ma se si osserva il flusso ematico parenchimale epatico continuativamente nelle prime 2 ore di riperfusione non si trovano differenze significative. Questo dato dimostra che meccanismi di compensazione locale riescono a garantire un flusso ematico costante nonostante la vasodilatazione prodotta dall'endotossina.

Nel nostro studio comunque la somministrazione di LPS ha prodotto cambiamenti emodinamici ridotti rispetto a quelli descritti negli altri studi che

hanno investigato l'efficacia del SR141716 nel contrastare l'ipotensione che si verifica in corso di shock settico. Infatti la dose di LPS usata in questo studio (1 mg/kg) è molto inferiore a quella utilizzata nei modelli di shock endotossico (15mg/kg) (13).

Questa differenza di dose può spiegare il fatto che in questo studio gli animali trattati con veicolo avevano comunque delle alterazioni emodinamiche ridotte.

La scelta di utilizzare questo dosaggio è dovuta all'esigenza di voler simulare, nell'animale, una sepsi post-operatoria e non uno shock settico vero e proprio. (33)

Avendo escluso che l'effetto protettivo del SR141716, nel nostro modello, fosse derivante dal mantenimento di un adeguato assetto emodinamico nelle fasi precoci della riperfusione, ci siamo concentrati ad indagare l'azione antinfiammatoria di questo composto nel nostro modello.

L'azione antinfiammatoria dell'SR141716A è stata molto recentemente dimostrata in un modello sperimentale di colite, in cui tale sostanza è stata in grado di prevenire la comparsa di ulcere indotte dall'indometacina nell'intestino di ratto (16). Il meccanismo patogenetico responsabile di questo tipo di lesioni è rappresentato dall'induzione e dal rilascio di mediatori di flogosi e la somministrazione dell' SR141716A si è rivelata efficace nel diminuire i livelli tissutali di TNF-alfa e l'attività della mieloperossidasi, che apparivano, invece, significativamente aumentati negli animali trattati solo con l'indometacina (16).

Per confermare l'ipotesi che anche l'effetto da noi riscontrato a livello epatico possa costituire l'espressione di un'interferenza con l'attivazione del processo flogistico, nel nostro studio è stata valutata l'efficacia di questa sostanza nell'inibire il reclutamento di neutrofili polimorfonucleati (PMN) nel parenchima epatico.

I PMN, infatti, insieme alle cellule di Kupffer, sono tra gli attori principali del danno da ischemia-riperfusione e, con la produzione ed il rilascio di ROS e

proteasi, costituiscono i principali effettori della necrosi epatocitaria in corso di SIRS. (18,34).

In questo studio è stato verificato che la somministrazione di SR141716 riduce in maniera significativa l'infiltrato neutrofilico parenchimatico, e l'effetto, anche se già importante a 6 ore, è maggiormente evidente a 24 ore dall'inizio della riperfusione e dalla somministrazione dell'LPS.

Questo dato è fortemente supportato dai risultati ottenuti dall'indagine di una chemochina infiammatoria: il CINC-1

Il CINC-1 infatti fa parte della cascata di eventi (citochine, chemochine, molecole di adesione..) che porta al reclutamento, all'attivazione ed alla traslocazione dei PMN. (35-37) Come per i PMN, la somministrazione di SR141716 riduce in maniera significativa i livelli tissutali di questa citochina in maniera già rilevante a 6 ore, ma maggiormente evidente a 24 ore dall'inizio della riperfusione e dalla somministrazione dell'LPS.

Questo studio dimostra che l'SR141716 è efficace nel ridurre il danno epatico dovuto da una ischemia riperfusione seguita dalla somministrazione di endotossina, ma non dimostra che l'effetto sia attribuibile ad una azione CB1 dipendente. Infatti sono state descritte azioni del SR 141716 non CB1 dipendenti. (31, 35)

Per chiarire definitivamente se l'effetto del SR141716 è CB1 dipendente sarebbe utile ripetere gli esperimenti topi knock-out per il recettore CB1.

Infatti quando si è testato l'azione antinfiammatoria dell' SR141716A nella prevenzione delle ulcere intestinali da indometacina in topi knockout per il CB1 si è visto che tale azione rimaneva nonostante fosse assente il recettore CB1; dimostrando che questo tipo di azione non è attribuibile al blocco dei recettori CB1 (16). Tale osservazione potrebbe essere valida anche nel nostro modello sperimentale di danno epatico.

Inoltre, bisogna segnalare che l'identificazione dei recettori CB1 nel fegato è ancora alquanto controversa. Infatti, mentre è sufficientemente dimostrata la

loro espressione a livello delle cellule sinusoidali (39) ed è dubbia quella sulle cellule di Kupffer, i dati disponibili non permettono di confermare la loro presenza sugli epatociti.

Nel nostro studio abbiamo confermato la presenza del recettore CB1 nel parenchima epatico sia con PCR che con Western Blotting. Queste tecniche però non permettono di distinguere fra le varie popolazioni cellulari e quindi di localizzare esattamente il recettore; non è escluso che le bande rilevate siano da attribuire al recettore espresso sulle cellule endoteliali.

Ulteriori analisi si rendono quindi necessarie per approfondire l'indagine, utilizzando tecniche specifiche come l'immunoistochimica su sezioni di tessuto eseguita con tecniche di colocalizzazione per localizzare fisicamente il recettore nel fegato.

Nel nostro studio sono state inoltre testate due posologie dell'SR141716A: 3mg/kg e 10mg/kg. Nel lavoro di Croci et al (16) sulle ulcere da indometacina venivano testati differenti dosaggi del farmaco, da 0,5mg/kg fino a 10mg/kg per verificarne l'efficacia in una curva dose-risposta. Si è dimostrato che la protezione aumentava con l'aumentare del dosaggio di antagonista somministrato, fino ad individuare nei 3mg/kg la posologia ottimale con cui si raggiungeva il massimo risultato. La cosa interessante è che la somministrazione di 10mg/kg garantiva circa la stessa protezione dei 3mg/kg, riducendo le ulcere intestinali.

Il nostro studio ha confermato questi risultati, dimostrando un effetto protettivo nel fegato ad entrambe le posologie, senza differenze significative.

E' quindi sufficiente un dosaggio di 3mg/kg per proteggere il fegato dal danno da ischemia riperfusione ed LPS. I 10mg/kg garantiscono la medesima protezione senza alterare, nonostante il dosaggio maggiore, l'emodinamica, o la proliferazione o manifestare effetti secondari.

Questo potrebbe essere soggetto a più interpretazioni.

Per esempio, è noto che i recettori dei cannabinoidi possono andare incontro a desensibilizzazione; infatti il recettore può venire inattivato mediante fosforilazione, oppure può essere (9) impedendone il legame con molecole agoniste. Questo potrebbe essere valido anche per gli antagonisti e spiegherebbe il motivo per cui non c'è quasi differenza fra gli effetti dei due dosaggi: il recettore lega l'SR141716A fino ad un certo punto, dopo di che viene bloccato.

Un'altra ipotesi ci viene suggerita da alcuni lavori in cui si suppone un'azione di agonista parziale dell'SR141716A nei confronti del recettore CB1.

La realtà è che si sa ancora poco sulla modulazione del sistema dei cannabinoidi e del recettore CB1 in particolare.

Per esempio, Smith et al (14) dimostrarono in un modello di peritonite nel topo, indotta per somministrazione intraperitoneale di Tioglicolato o di Enterotossina A di Stafilococco, che i due agonisti sintetici del CB1, (+)-WIN 55,212-2 ed HU 210 riducevano la sintesi di chemochine e bloccavano l'infiltrato neutrofilico e linfocitario a livello della cavità addominale. La somministrazione di SR141716A revertava questo effetto, suggerendo un'azione CB1 mediata. Nello stesso studio si dimostrava però che tale effetto era mediato esclusivamente da un'azione centrale del CB1.

Lo stesso gruppo (40) in un altro studio dimostrava l'effetto di questi due stessi agonisti anche nel prevenire l'aumento dei livelli sierici di TNF-alpha ed IL-12 in un modello di infezione da LPS nel topo, per un'azione CB1 mediata. Anche in questo caso, si dimostrava che la somministrazione dell'antagonista revertava l'esito, ma sorprendentemente, si dimostrava anche un'azione agonista-simile dell'SR141716A quando utilizzato ad alti dosaggi. Questo risultato suggerisce che, a posologie elevate, l'SR141716A manifesta un agonismo parziale nei confronti del recettore CB1, che potrebbe contribuire a mediare l'effetto antinfiammatorio agendo, per esempio, a livello centrale.

Esiste un altro studio del gruppo di Lavon et al (41) in cui, in un modello di epatite virale autoimmune indotta nel topo mediante somministrazione di

Concanavallina A (ConA), si è dimostrato che la somministrazione dell'agonista PRS211,092 (ad effetto non psicotropo e derivato chimico di HU211) riduce il danno epatico abbassando l'espressione e la concentrazione plasmatica di citochine proinfiammatorie (TNF-alpha, IL-2, INF-gamma) ed aumentando quella di citochine antinfiammatorie (IL-6, IL-10) e delle proteine SOCS 1 e 3 (Soppressori del Signaling delle Citochine), proponendo un effetto antinfiammatorio di tipo immunocellulo-mediato.

Il sistema degli endocannabinoidi, è quindi protagonista importante dei processi di modulazione della risposta immune e dell'infiammazione. Questa apparente incongruenza di risultati è giustificabile dal fatto che purtroppo, per valutare l'attività di questo sistema si utilizzano dei farmaci che molto spesso non sono agonisti o antagonisti puri.

Inoltre, le conoscenze attuali non ci permettono ancora di chiarire il vero ruolo del recettore CB1 in quadri patologici a carattere infiammatorio: sembrerebbe comunque che l'effetto antinfiammatorio della maggiorparte degli agonisti sia mediato principalmente da recettori del SNC, mentre l'effetto degli antagonisti maggiormente da recettori periferici.

Concludendo, possiamo dire che il dato più significativo di questo studio è rappresentato dal fatto che un antagonista dei recettori CB1 dei cannabinoidi, l'SR141716A, ha dimostrato di ridurre significativamente l'entità della necrosi e del processo flogistico in un modello di danno epatico da ischemia-riperfusionione complicato da endotossemia. Che tale protezione non è mediata da effetti emodinamici dell'SR141716 a livello del circolo enteroepatico, ma piuttosto a capacità antinfiammatorie di questa molecola, come indicato dalla riduzione dell'infiltrato neutrofilico e dei livelli tissutali di CINC-1.

Tale nuova osservazione apre, tuttavia, uno scenario estremamente complesso, per la cui interpretazione saranno necessari ulteriori approfondimenti finalizzati a determinare i meccanismi d'azione dell'effetto protettivo di questa sostanza.

## BIBLIOGRAFIA

1. Pacher P, Bátkai S and Kunos G, The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharm Rev*, 2006.
2. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA, *Nature* 1990; 346:561-564.
3. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365: 61-65.
4. Di Marzo V. A brief History of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of british scientist. *Trends in Pharmac Sc.* 2006; 27:134-140.
5. Klein TW, Lane B, Newton CA. The Cannabinoid system and cytokine network, *P.S.E.B.M.* 2000; 225:1-8.
6. Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, Rodriguez de Fonseca F. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs, *T.i.P.S.* 2000; 21:218-224.
7. Guzmán M, Sánchez C, Galve-Roperh I. Cannabinoids and cell fate, *Pharmacol Therap* 2002;95:175-184.
8. Pertwee RG, The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview; *Int J Obesity* 2006; 30: S13-S18.

9. Lutz B. Molecular Biology of cannabinoid receptors, Prostaglandin Leukotrien Essential Fatty Liver 2002; 66: 123-142.
10. Pinto L, Capasso R, Di Carlo G. Endocannabinoids and the gut. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 2002;66: 333-341.
11. De Petrocellis L, Melck D, Bisogno T.. Endocannabinoids and fatty amides in cancer, inflammation and related disorder, Chemistry and Physics of Lipids 2000;108:191-206.
12. Shire D, Calandra B, Bouaboula M. Cannabinoid Receptor interactions with the antagonists SR141716A and SR144528; Life Sciences 1999; 65: 627-635.
13. Varga K, Wagner JA, Troy Bridgen D. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension, FASEB J 1998;12:1035-1044.
14. Smith SR, Denhardt G, Terminelli C. The anti-inflammatory activities of cannabinoid receptor ligands in mouse peritonitis models, Eur J Pharmacol 2001;432:107-119.
15. Guzman M, Sanchez C. Effects of cannabinoids on energy metabolism, Life Sci 1999;65:657-664.
16. Croci T, Landi M, Galzin AM. Role of cannabinoid CB1 receptors and tumor necrosis factor-alpha in the gut and systemic anti-inflammatory activity of SR141716 (Rimonabant) in rodents, Br J Pharmacol 2003; 140: 115-122.

17. Vajdová K, Smreková R, Kukan M. Endotoxin-induced aggravation of preservation-reperfusion injury of rat liver and its modulation”, J Hepatol 2000;32:112-120.
18. Szabo G, Romics L, Frenzl G. Liver in sepsis and systemic inflammatory response syndrome, Clin Liv Dis 2002; 6:1045-1066.
19. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury, J Gastroenterol Hepatol 2000;15:718-724.
20. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury, Hepatology 2000;32:169-173.
21. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury, Transplantation 1993;55:1265-1272.
22. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver, Am J Physiol 1991; 260:G355-G362.
23. Zhou W, McCollum M, Levine BA. Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia-reperfusion, Hepatology 1992;16:1236-1240.

24. Koo A, Komatsu H, Tao G. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion, *Hepatology* 1992;15:507-514.
25. Tsoulfas G, Takahashi Y, Ganster RW. Activation of lipopolysaccharide signaling pathway in hepatic transplantation preservation injury, *Transplantation* 2002;74:7-13.
26. Tadros T, Traber DL, Herndon DN. Trauma- and sepsis-induced hepatic ischemia and reperfusion injury, *Arch Surg* 2000;135:766-772.
27. Turnage RH, Guice KS, Oldham KT. Endotoxemia and remote organ injury following intestinal reperfusion, *J Surg Res* 1994;56:571-578.
28. Fiorini RN, Shafizadeh SF, Polito C. Anti-endotoxin monoclonal antibodies are protective against hepatic ischemia/reperfusion injury in steatotic mice. *Am J Transplant*. 2004;4:1567-73.
29. Taman Tadros, MD, Daniel L. Traber. Hepatic Blood Flow and Oxygen Consumption after Burn and Sepsis *J Trauma*. 2000;49:101–108.
30. Wagner JA; Varga K; J arai Z. Mesenteric Vasodilation Mediated by Endothelial Anandamide Receptors *Hypertension*. 1999;33:429-434.
31. Batkai S, Pacher P, J arai Z. Cannabinoid antagonist SR-141716 inhibits endotoxic hypotension by a cardiac mechanism not involving CB1 or CB2 receptors *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H595–H600.

32. Godlewski G, Malinowska B, Schlicker E. Presynaptic cannabinoid CB1 receptors are involved in the inhibition of the neurogenic vasopressor response during septic shock in pithed rats. *British Journal of Pharmacology*:2004; 142, 701–708.
33. Wanner GA, Ertel W, Muller P, Hofer Y, Leiderer R, Menger MD, Messmer K. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock* 1996; 5: 34-40.
34. Omar B, McCord J, Downey J. Ischemia-reperfusion. In: Sies H. Ed., *Oxidative stress: oxidant and antioxidants*. London, Academic Press; 1991: 493-527.
35. Cutrin JC, Perelli MG, Cavalieri B. Microvascular Dysfunction Induced by reperfusion Injury and Protective Effect of Ischemic Preconditioning; *Free Rad Biol Med* 2002; 33: 1200-1208.
36. H Jaeschke; *Molecular Mechanisms of Hepatic Ischemia-Reperfusion injury and Preconditioning*; *Am J Gastrointest Liv Phys* 2003; 284: G15-G26.
37. Teoh NC, Farrell GC; *Hepatic Ischemia reperfusion injury: Pathogenic Mechanisms and Basis for Hepatoprotection*; *J Gastroent Hpatol* 2003; 18: 891-902.
38. Jarai Z, Wagner JA, Varga K. Cannabinoid induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors; *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96:14136-14141.

39. Liu DL, Jeppsson B, Hakansson CH. Multiple-system organ damage resulting from prolonged hepatic inflow interruption. *Arch Surg* 1996; 131: 442-447.
  
40. Smith SR, Terminelli C, Denhardt G, Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2000), 293, 136 – 150.
  
41. Lavon I, Sheinin T, Meilin S. *Mol Pharm* 2003; 64:1334-1341.