



**USO DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI COME
TERAPIA PER IL TRATTAMENTO DELL'INSULINO
RESISTENZA NEL DIABETE DI TIPO 2**

**USE OF MESENCHIMAL STEM CELLS AS A PROMISING
THERAPY FOR THE TREATMENT OF INSULIN RESISTANCE
IN TYPE 2 DIABETES**

Tesi di Laurea di:

Sara Trasatti

Docente referente Prof.ssa:

Francesca Maradonna

A.A. 2021/2022

INDICE

1. INTRODUZIONE

2. MATERIALI E METODI

2.1 Modello animale e disegno dello studio

2.2 Caratterizzazione e differenziazione di cellule stromali mesenchimali da placenta umana (P-MSCs)

2.3 Test di tolleranza orale al glucosio e all'insulina (GTT/ITT)

2.4 Test di trasporto del glucosio

2.5 Misurazione dell'attività dell'esochinasi e della piruvato chinasi

3. RISULTATI

3.1 La terapia con P-MSCs umane porta alla clearance del glucosio nel sangue periferico nei ratti WNIN/GR-Ob

3.2 Il trattamento con P-MSCs umane ripristina l'assorbimento del glucosio nei tessuti muscolari scheletrici dei ratti WNIN/GR-Ob in vivo

4. CONCLUSIONI

1. Introduzione

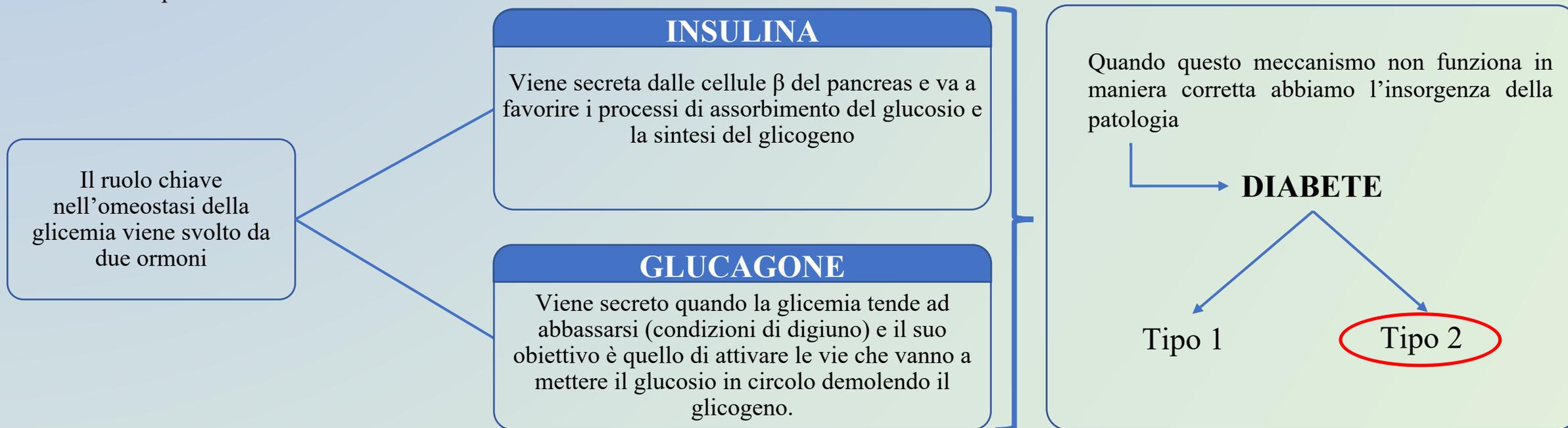
OBIETTIVO:

Esaminare gli effetti benefici delle P-MSCs sull'insulino resistenza associata all'obesità

La sindrome metabolica (obesità, diabete, malattie cardiovascolari) è la principale causa di morte a livello globale sia nei paesi sviluppati sia in quelli in via di sviluppo. Il soggetto dello studio è il modello di ratto WNIN/Gr-Ob che assomiglia molto a soggetti diabetici obesi clinici che presentano disfunzioni metaboliche quali:

- IR (Insulino resistenza);
- Diminuzione della massa magra;
- Osteoartrite;
- Ipertrigliceridemia;
- Ipercolesterolemia.

La terapia con P-MSC migliora la rigenerazione del pancreas, diminuisce IR e attiva i progenitori per convertirli in β -cellule



2.1 Modello animale e disegno dello studio

- ❑ Le P-MSCs sono state ottenute separando l'amnios dalla placca corionica della placenta, che è stata lavata con PBS e digerita con tripsina. Infine è stata fatta una differenziazione condrogenica e osteogenica.
- ❑ Per gli esperimenti sono stati utilizzati ratti WNIN/Controllo e WNIN/GR-Ob (Ob-T2D) femmina.

I ratti sono stati divisi
in **quattro** gruppi:

WNIN/Controllo (n = 6)

WNIN/Controllo iniettato con P- MSCs (n = 6)

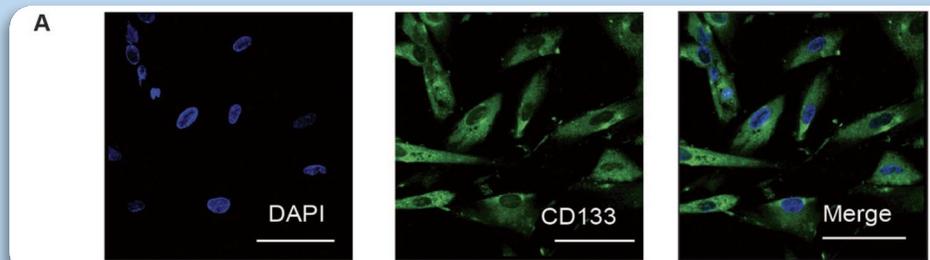
WNIN/GR-Ob (Ob-T2D) ratti (n = 6)

WNIN/GR-Ob (Ob-T2D) ratti iniettati con P-MSCs (n = 6)

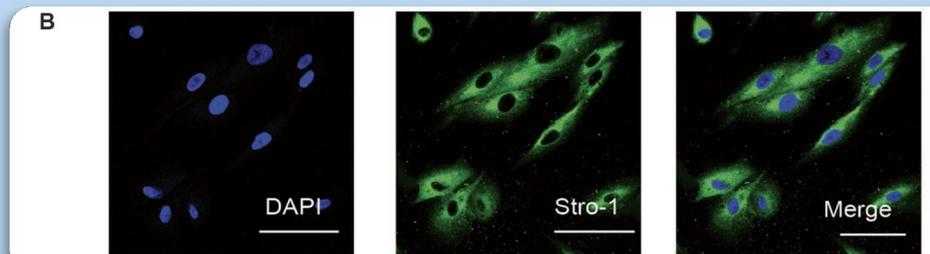
- ❑ Le P-MSCs sono state iniettate per via intramuscolare nella coscia destra dei ratti, una somministrazione alla settimana per 3 volte.
- ❑ I ratti di controllo hanno ricevuto lo stesso trattamento.
- ❑ Lo studio è stato condotto per 7 settimane.

2.2 Caratterizzazione e differenziazione di cellule stromali mesenchimali da placenta umana (P-MSCs)

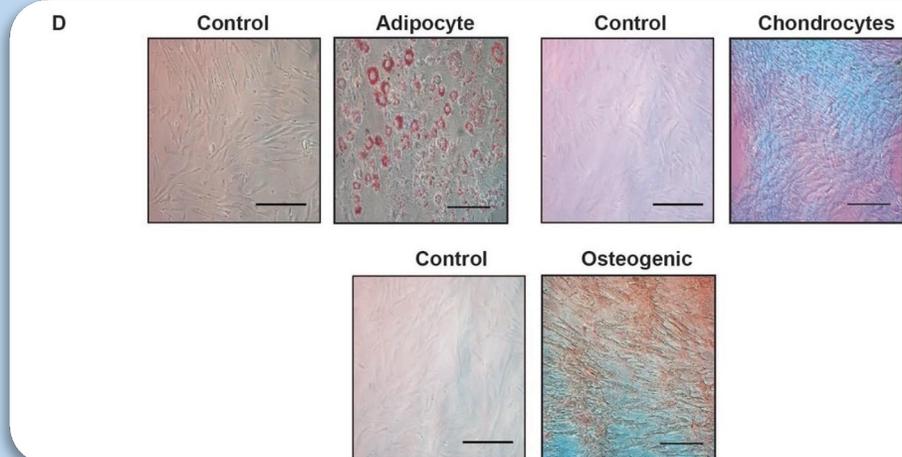
CD-133 è uno dei bio-marcatori chiave per l'isolamento e la caratterizzazione delle cellule staminali (Fig. A).



L'espressione di **Stro-1** (Fig. B) è una caratteristica delle cellule precursori ed è stata usata per l'isolamento e l'identificazione delle MSC dal cordone ombelicale e dal tessuto del midollo osseo. Si è dimostrato che le cellule Stro-1 espresse dal liquido sinoviale umano erano in grado di differenziarsi in diversi tipi di cellule, tra cui osteoblasti, condrociti e adipociti in vitro. Infine, è stata eseguita l'immunocolorazione CD-133 e Stro-1 delle P-MSC umane per confermare la loro capacità di discendenza multipotente.



Le P-MSC umane sono state in grado di differenziarsi in adipogeniche come indicato da Oil red, condrogeniche come indicato dalla colorazione positiva con Alcian blue, e osteogeniche da Alizarin Red, rispettivamente (Fig. D).



2.3 Test di tolleranza orale al glucosio e all'insulina (GTT/ITT)

- ❑ L'esame viene eseguito per la diagnosi e lo screening del diabete mellito e dell'intolleranza glucidica. Quest'ultima condizione è considerata uno stato pre-diabetico, con rischio di evoluzione in diabete conclamato negli anni a venire.
- ❑ Nello studio svolto, alla fine della 7a settimana post-iniezione è stato eseguito GTT e ITT dopo aver fatto digiunare gli animali per 8-10 h.
 - ❑ Per **GTT**, i ratti sono stati infusi con una soluzione di glucosio al 20% (2 g di glucosio/kg di massa corporea);
 - ❑ Per **ITT** è stato seguito il metodo di usare la formula volume di iniezione di glucosio
$$IP (\mu l) = 10 \times \text{peso corporeo (g)} \text{ e } 0.75 \text{ UI di insulina/g di massa corporea}$$
- ❑ I livelli di glucosio nel sangue sono stati misurati a **15, 30, 60 e 120 minuti dopo l'iniezione** di glucosio e insulina utilizzando un **glucometro**.

2.4 Test di trasporto del glucosio

- ❑ I **trasportatori** del glucosio (GLUT) sono una famiglia di proteine transmembrana presenti nella maggior parte delle cellule mammifere. La loro azione permette il trasferimento del glucosio attraverso le membrane plasmatiche.
- ❑ Il trasportatore del glucosio più conosciuto e studiato è il **GLUT-4**, grazie alla sua sensibilità diretta all'insulina, ed è presente soprattutto nel muscolo scheletrico, nel cuore e nel tessuto adiposo bianco e bruno, non a caso definiti tessuti insulino-dipendenti.
- ❑ Il trasporto del glucosio, nello studio, è stato valutato nel tessuto del muscolo scheletrico usando l'analogo del glucosio 2-deossiglucosio. Alla fine delle 7 settimane, il tessuto del muscolo scheletrico (muscolo soleo) è stato sezionato in condizioni sterili e **stimolato con insulina per 50 min** e poi incubato in KRB contenente 2-NBDG (**tracciante fluorescente**).
- ❑ Dopo l'incubazione, il test è stato terminato con un tampone e successivamente **l'assorbimento** è stato misurato con un **citometro a flusso**.
- ❑ Ogni esperimento è stato svolto in triplicato alla fine di 7 settimane dopo la terza iniezione di P-MSCs ed è stato calcolato come media per lo studio.

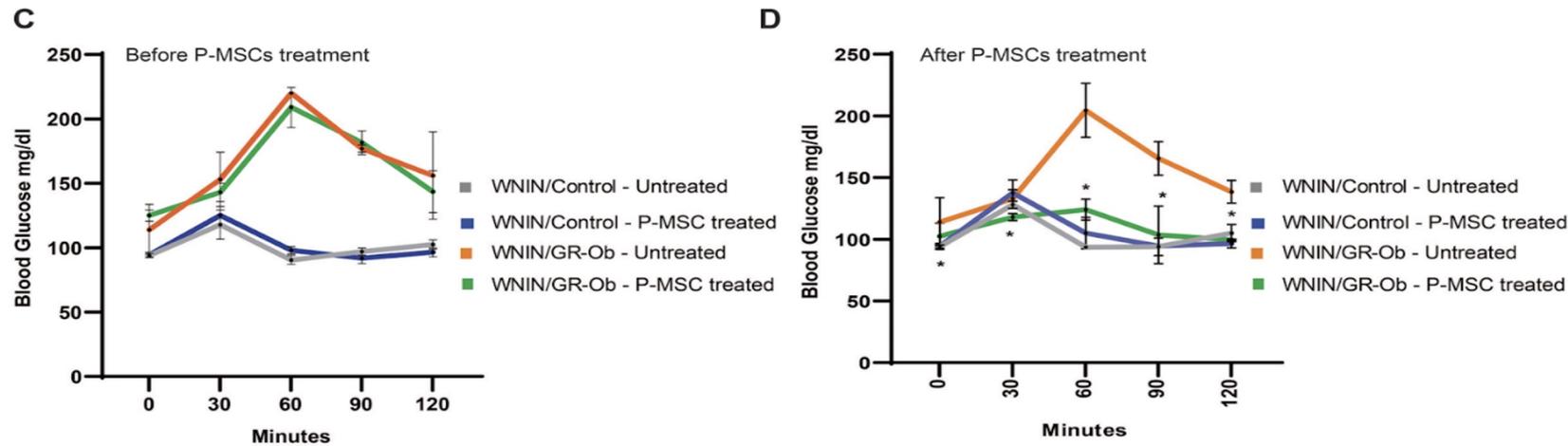
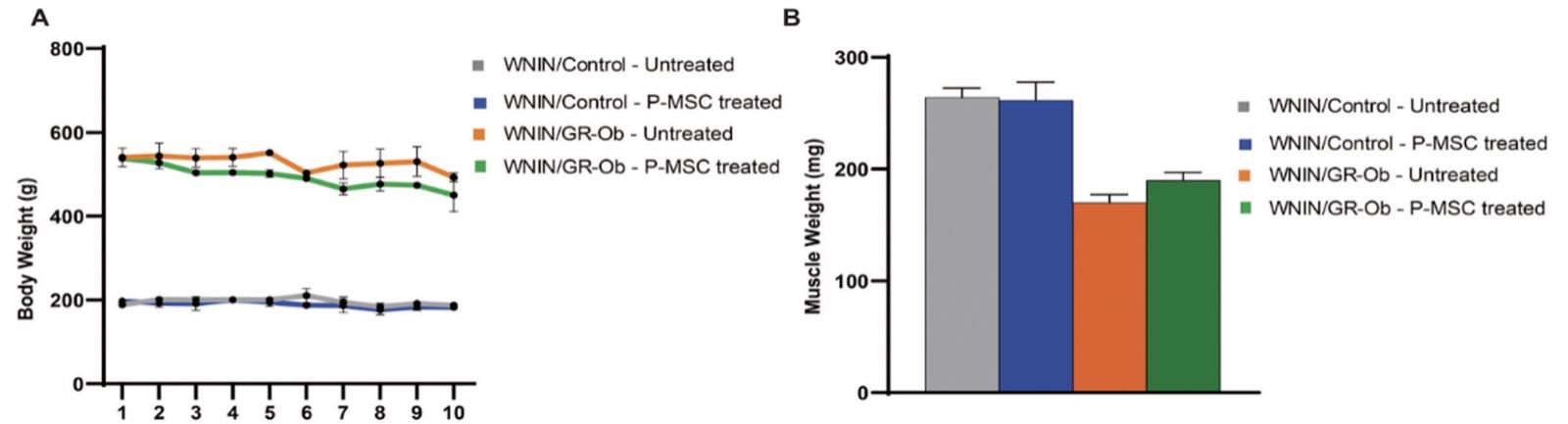
2.5 Misurazione dell'attività dell'esochinasi e della piruvato chinasi

- ❑ **L'esochinasi** fosforila il glucosio al fine di diminuire la sua concentrazione intracellulare. In questo modo il glucosio può entrare nelle cellule e questo processo permettere di regolare la glicemia nel sangue.
- ❑ La **piruvato chinasi** va a rimuovere il gruppo fosfato dal C2 dell'acido fosfoenolpiruvico e lo trasferisce ad una molecola di ADP formando ATP.
- ❑ Le attività enzimatiche sono state misurate e rappresentate come il **cambiamento dell'assorbanza/min**, calcolata utilizzando una porzione lineare della curva ottenuta.

3.1 La terapia con P-MSCs umane porta alla clearance del glucosio nel sangue periferico nei ratti WNIN/GR-Ob

Lo studio ha mostrato che i ratti WNIN/GR-Ob trattati con P-MSCs sono associati a **nessun cambiamento nel loro peso corporeo** (Fig. A), ma c'è stato un **aumento del peso muscolare complessivo** (Fig. B), dopo l'iniezione di P-MSCs rispetto ai ratti WNIN/GR-Ob Control.

Si sta quindi ristabilendo un livello di partenza.

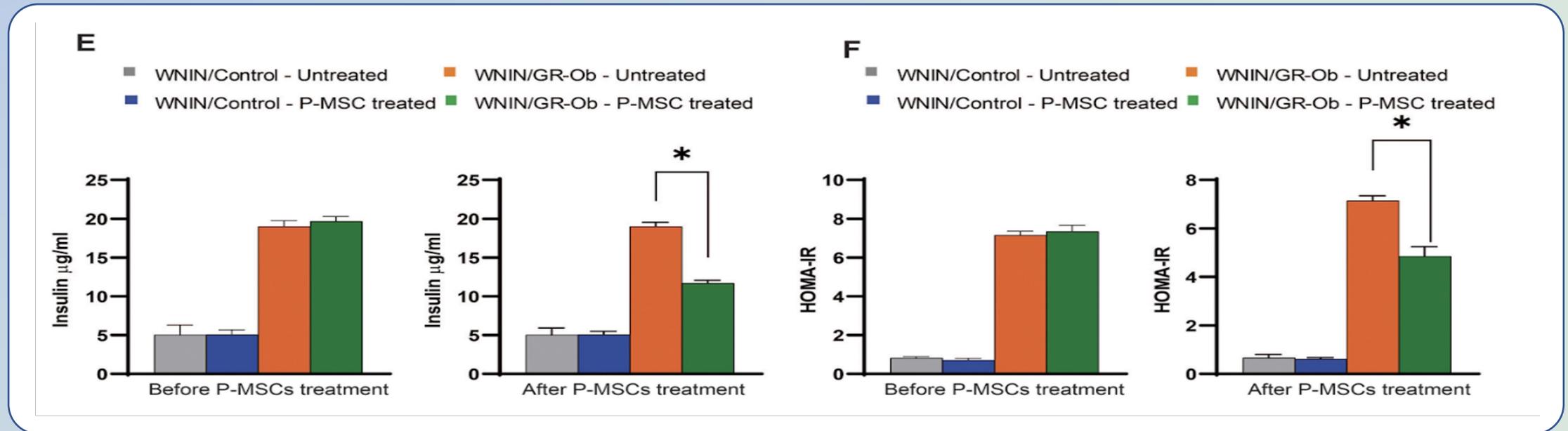


In seguito, è stato eseguito il test di tolleranza al glucosio orale (OGTT), prima e dopo l'iniezione di P-MSCs umane, ed è stato confrontato con i ratti WNIN/Controllo. È stato osservato che **i ratti WNIN/GR-Ob hanno mostrato una minore tolleranza al glucosio**, rispetto ai ratti WNIN/Controllo (Fig. C, D).

Il test OGTT utilizzando il sangue periferico ha indicato che il **trattamento P-MSCs ha migliorato** l'utilizzo del glucosio nei ratti WNIN/GR-Ob, rispetto ai ratti WNIN/Controllo.

3.1 La terapia con P-MSCs umane porta alla clearance del glucosio nel sangue periferico nei ratti WNIN/GR-Ob

Inoltre, è stato osservato che i ratti WNIN/GR-Ob, in risposta all'iniezione di P-MSCs, hanno mostrato una significativa diminuzione dei livelli di insulina nel siero (Fig. E).

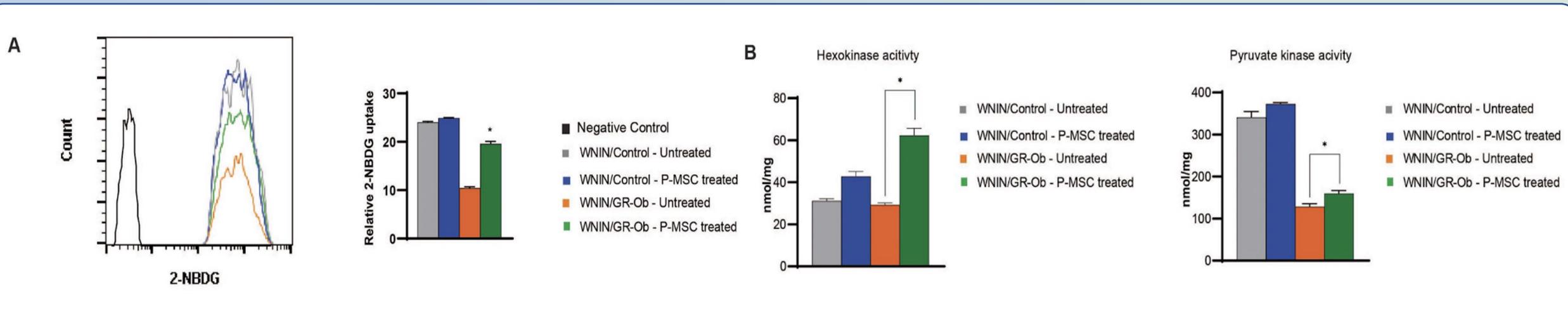


L'analisi "HOMA- IR" è una metodologia ampiamente accettata per misurare l'IR. Si può notare come i ratti WNIN/ GR-Ob hanno una diminuzione di 1,09 volte dei livelli di HOMA-IR, rispetto ai ratti WNIN/GR-Ob di controllo, e un aumento di sette volte dei livelli di HOMA-IR rispetto ai ratti WNIN/controllo (Fig. F).

Dai vari grafici si evince che l'effetto delle P-MSC nella riduzione del glucosio nel sangue permette di ridurre il livello di insulina nei GR-Ob trattati e conseguentemente riproduce lo stesso effetto nell'HOMA-IR.

3.2 Il trattamento con P-MSCs umane ripristina l'assorbimento del glucosio nei tessuti muscolari scheletrici dei ratti WNIN/GR-Ob in vivo

- ❑ E' stato isolato il muscolo soleo dai ratti WNIN/GR-Ob e dai ratti WNIN/Controllo ed è stata confrontata la rispettiva capacità di assorbimento del glucosio usando il saggio del 2-NBDG. Il muscolo soleo dei ratti WNIN/GR-Ob aveva meno capacità di assorbimento del glucosio, rispetto ai ratti WNIN/controllo (Fig. A).
- ❑ Il 2-NBDG è un tracciante fluorescente utilizzato per monitorare l'assorbimento del glucosio nelle cellule viventi.
- ❑ Nell'istogramma (Fig. A) è evidente come i valori di assorbimento del 2-NBDG sia maggiore nei Gr-Ob trattati che non, avvicinandosi ad una situazione equivalente a quella del controllo.
- ❑ Il tutto è in linea con lo scopo dell'esperimento perché se le P-MSC non funzionassero il livello di assorbimento sarebbe inferiore.



- ❑ È interessante notare che l'iniezione di P-MSCs era più efficace nei ratti WNIN/GR-Ob per ristabilire la capacità di assorbimento del glucosio del muscolo soleo (Fig. A). A supporto di questi dati, è stato osservato un **aumento dell'attività degli enzimi esochinasi e piruvato chinasi** nel muscolo soleo dei ratti WNIN/GR-Ob trattati, rispetto ai ratti WNIN/controllo (Fig. B).

4. Conclusioni

È stato dimostrato che un'iniezione intramuscolare di P-MSCs isolate dalla placenta umana ha:

- ❑ **Ridotto l'obesità**
- ❑ **Migliorato IR e l'omeostasi del glucosio** nel tessuto adiposo di ratti obesi WNIN/GR-Ob ❑ l'iniezione di P-MSCs nei ratti WNIN/GR-Ob ha **aumentato l'assorbimento del glucosio inducendo l'espressione di Glut4** nel muscolo soleo, oltre ad una maggiore utilizzazione del glucosio nel muscolo scheletrico, come dimostrato dall'**aumento dell'attività degli enzimi esochinasi e piruvato chinasi**. Infine, sono stati associati questi cambiamenti con la **normalizzazione** della via di segnalazione **dell'insulina** nel muscolo scheletrico dei ratti WNIN/ GR-Ob che era promettente con la terapia con P-MSCs.
- ❑ **Sensibilizzato** i tessuti muscolari scheletrici **all'insulina endogena**
- ❑ **Contrastato** efficacemente lo **squilibro del glucosio**, come evidenziato dalla normalizzazione dei livelli HOMA-IR e OGTT.

Le P-MSCc sono cellule staminali adulte, promettenti nella terapia rigenerativa e sono ben documentate per la loro plasticità:

- ❑ Sun et al., 2017 hanno dimostrato che le cellule staminali mesenchimali derivate dal cordone ombelicale e dalla placenta hanno **diminuito la resistenza all'insulina** sopprimendo l'infiammazione nei ratti T2D.
- ❑ Chen et al., 2020 avevano dimostrato che l'iniezione intramuscolare di cellule staminali mesenchimali **migliora il diabete indotto dalla dieta ad alto contenuto di grassi e le sue complicazioni**, utilizzando il modello di topi.
- ❑ Il presente studio recentemente pubblicato di Kotikalapudi et al., 2021 ha mostrato gli effetti benefici di MSC per **annullare le alterazioni metaboliche del T2D indotte dall'obesità**.
- ❑ Molti studi (sia pre-clinici che clinici) mostrano una crescente evidenza dell'efficacia terapeutica delle MSC.

...*MA*...

Molti studi forniscono anche la prova di una bassa incidenza delle MSC a causa della loro **vitalità di breve durata** dopo l'iniezione. Mäkelä et al., 2015 hanno dimostrato che le MSC dopo il trapianto endovenoso erano intrappolate nei polmoni, con conseguente riduzione della popolazione cellulare delle MSC nei siti di destinazione. Il **metodo con cui le cellule vengono somministrate** può essere un fattore importante per il loro raggiungimento della destinazione prevista.

4. Conclusioni

I principali vantaggi della somministrazione intramuscolare di MSC sono:

- ❑ **il tempo prolungato** fornito dalle fibre muscolari dense che trattengono le MSC in situ
- ❑ **l'alta densità vascolare** che fornisce un condotto per il rilascio sistemico dei fattori trofici delle MSC
- ❑ **l'abbondanza di tessuto** che consente siti di iniezione multipli

L'efficacia clinica del trattamento MSCs per T2D ha mostrato alcuni buoni risultati, tuttavia, molti di questi studi hanno impiegato **l'iniezione intravenosa o intrapancreatica di MSC nei pazienti**. I rischi potenziali del trattamento con MSC per questa via devono essere considerati, poiché la somministrazione endovenosa può causare eventi avversi polmonari, respiratori e immunologici. Attualmente, questo è un motivo di preoccupazione per l'istituzione e l'applicazione clinica dell'uso delle MSC nella gestione del T2DM.

Sulla base dell'ipotesi presa in considerazione, anche se soggetta alla limitazione in seguito a modelli di ratto a breve termine, si è potuta dimostrare la risposta funzionale delle P-MSC nel **migliorare l'infiammazione sistemica e tissutale, la tolleranza al glucosio e il miglioramento della sensibilità all'insulina nei ratti obesi**. Questi dati suggeriscono che le applicazioni della terapia cellulare con le P-MSC possono essere esplorate nel T2D.

Tuttavia, **applicarla ai soggetti diabetici umani** necessita di sottostare a diversi fattori di differenziazione rispetto ai ratti come **la durata del T2D, la resistenza all'insulina, l'infiammazione**, così come **l'esaurimento β -pancreatico** come modificatori della risposta. Pertanto, richiede studi più approfonditi per delineare le potenti funzioni benefiche delle P-MSC per ripristinare la normoglicemia nei soggetti umani.

Nel complesso i risultati del presente studio aprono nuove strade nella strategia di gestione dell'obesità, del diabete e delle complicazioni connesse.

**GRAZIE PER
L'ATTENZIONE**

SARA TRASATTI

A.A. 2021/2022

