

ORGANOIDI DI COLANGIOCITI: UN NUOVO STRUMENTO NELLA RICERCA SUI MECCANISMI FISIOPATOLOGICI DELLE COLANGIOPATIE

Le Colangiopatie, ossia le patologie che colpiscono l'albero biliare, sono un ampio gruppo di malattie a varia eziologia tra cui colangite biliare primaria (PBC), colangite sclerosante primaria (PSC), atresia biliare, malattia epatica policistica, e colangiocarcinoma, che condividono un target principale: il colangiocita¹. Le colangiopatie, data la loro natura progressiva e la mancanza di terapie mediche efficaci, sono responsabili di un'elevata morbilità e mortalità e il trapianto di fegato rimane l'unico trattamento risolutivo per i casi avanzati.

I colangiociti, che rivestono l'albero biliare, modificano la composizione e il volume della bile e sono coinvolti in processi (risposta riparativa al danno epatico, fibrogenesi, angiogenesi, regolazione del flusso sanguigno, etc.), che condizionano la fisiopatologia dell'intero fegato². Il meccanismo fisiopatologico delle colangiopatie prevede un danno iniziale ai colangiociti ad opera di un fattore esogeno, ad esempio ambientale, o da un fattore endogeno, quale un microorganismo, che porta ad un fenotipo proinfiammatorio del colangiocita con rilascio di numerose sostanze, quali citochine, fattori di crescita ormoni e neuropeptidi¹⁻². La perpetuazione della risposta infiammatoria iniziale porta ad una infiammazione cronica dei dotti biliari (colangite) e, in ultima analisi, a colestasi, proliferazione del dotto biliare, duttopenia, fibrosi e alla potenziale trasformazione maligna dei colangiociti.

I disturbi del sistema biliare, con conseguente colangite e colestasi intra e extraepatica, rappresentano la causa del 70% del trapianto di fegato pediatrico e fino a un terzo del trapianto di fegato adulto³, e, spesso, richiedono un secondo trapianto.

Organoidi di colangiociti: la nuova frontiera nella medicina rigenerativa

Le colangiopatie acquisite, come la PBC) e la PSC sono malattie multifattoriali complesse che mancano ancora di modelli di studio soddisfacenti⁴. Un problema importante negli studi

fisiopatologici delle colangiopatie è la mancanza di modelli in vitro umani per studiare i meccanismi alla base della patologia e per convalidare potenziali bersagli terapeutici. Mentre l'uso di modelli animali soffre spesso di una mancanza di riproducibilità del fenotipo della malattia, i colangiociti umani primari sono difficili da isolare, e perdono le loro caratteristiche fenotipiche dopo pochi passaggi in coltura. Inoltre, le linee cellulari immortalizzate non riassumono fedelmente le normali funzioni fisiologiche dei colangiociti.

Al contrario, i sistemi di coltura di organoidi sono emersi come una nuova tecnologia di frontiera nella ricerca sul fegato e sulle vie biliari. A differenza delle classiche colture cellulari monostrato bidimensionali che non riproducono l'interazione e la comunicazione tra cellule, gli organoidi sono costituiti da cellule organo-specifiche che si auto-organizzano in un sistema di coltura cellulare tridimensionale che riassume l'interazione cellulare e l'architettura dell'organo con elevata fedeltà. Gli organoidi possono essere generati da cellule staminali o da cellule isolate da biopsie del paziente, essere espansi e mantenuti in coltura a lungo termine mantenendo le loro caratteristiche morfologiche e funzionali e possono essere crioconservati a formare biobanche⁵.

Gli organoidi derivati dai colangiociti rappresentano un modello innovativo e clinicamente importante per lo sviluppo di studi *proof-of-concept* sui disturbi biliari nell'uomo⁶. Rappresentano uno strumento prezioso per lo screening dei farmaci, la modellazione della malattia e le applicazioni terapeutiche. Gli organoidi di colangiociti possono essere utilizzati per applicazioni in medicina rigenerativa e riparare il dotto biliare prima e dopo il trapianto⁷, in bioingegneria, nella creazione di dotti biliari artificiali funzionanti una volta trapiantati nel fegato⁸.

Obiettivo dello studio

L'obiettivo di questo studio sarà lo sviluppo di un nuovo modello di organoide colangiocitario che mimica patologie a livello d'organo, in particolare il profilo proinfiammatorio delle colangiopatie. Questi organoidi offriranno un nuovo approccio per studiare la natura progressiva e graduale della colangiopatia e possono essere potenzialmente sfruttati per lo screening dei farmaci.

Per raggiungere il suo obiettivo, questa proposta si articolerà in due obiettivi operativi (O.O):

O.O 1 Formazione *in vitro* di organoidi di colangiociti

Le cellule epiteliali del dotto biliare saranno isolate dalla bile umana e/o cistifellea e cresceranno in coltura fino a formare strutture tridimensionali, ovvero gli organoidi di colangiociti⁹.

Per caratterizzare gli organoidi, valuteremo l'espressione di marcatori biliari chiave (citocheratina 19, citocheratina 7, Sox9 e gamma-glutamyl transferasi (GGT)) mediante Real time PCR, nonché la funzionalità dei colangiociti, come la fosfatasi alcalina e l'attività della GGT mediante saggio immunoenzimatico.

O.O 2: Modello *in vitro* di colangiopatia proinfiammatoria utilizzando organoidi di colangiociti

Poiché nelle malattie epatiche colestatiche, inclusa la PSC, i colangiociti sono esposti ad aumentati livelli di lipopolisaccaride (LPS) rilasciato da microbi enterici attraverso la circolazione venosa portale¹⁰, attiveremo gli organoidi di colangiociti con LPS, in associazione ad altre citochine infiammatorie (come il tumor necrosis factor alpha, TNF- α), per mimare un fenotipo proinfiammatorio.

Dopo stimolazione con LPS e/o TNF- α , valuteremo:

- 1) la senescenza cellulare, mediante analisi dell'espressione della β -galattosidasi (Real time-PCR)
- 2) il fenotipo proinfiammatorio, determinando l'espressione di molecole di adesione e chemo/citochine proinfiammatorie che orchestrano il reclutamento e l'attivazione delle cellule immunitarie innate e adattative che caratterizzano i colangiociti attivati (Tecnologia Luminex)

Sviluppi futuri

La creazione di organoidi colangiocitari permetterà di:

- 1) testare la loro capacità di riparare l'albero biliare in un modello murino di danno biliare, aprendo così la strada alla terapia cellulare mediante organoidi;

2) valutare gli effetti di nuovi farmaci sia sul nostro modello in vitro di colangiopatia proinfiammatoria che su organoidi derivati da biopsie di pazienti con colangiopatie.

Referenze

1. Lazaridis, K.N.N.F. LaRusso, The Cholangiopathies. *Mayo Clin Proc* 2015;90: 791-800.
2. Banales, J.M., R.C. Huebert, T. Karlsen, M. Strazzabosco, N.F. LaRussoG.J. Gores, Cholangiocyte pathobiology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;16: 269-281.
3. Kriegermeier, A.R. Green, Pediatric Cholestatic Liver Disease: Review of Bile Acid Metabolism and Discussion of Current and Emerging Therapies. *Front Med (Lausanne)* 2020;7: 149.
4. Rabiee, A.M.G. Silveira, Primary sclerosing cholangitis. *Transl Gastroenterol Hepatol* 2021;6: 29.
5. Shiota, J., L.C. SamuelsonN. Razumilava, Hepatobiliary Organoids and Their Applications for Studies of Liver Health and Disease: Are We There Yet? *Hepatology* 2021;74: 2251-2263.
6. Sato, K., W.J. Zhang, S. Safarikia, A. Isidan, A.M. Chen, P. Li, et al., Organoids and Spheroids as Models for Studying Cholestatic Liver Injury and Cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2021;74: 491-502.
7. Sampaziotis, F., D. Muraro, O.C. Tysoe, S. Sawiak, T.E. Beach, E.M. Godfrey, et al., Cholangiocyte organoids can repair bile ducts after transplantation in the human liver. *Science* 2021;371: 839-846.
8. Wang, Z., J. Faria, L.C. Penning, R. MasereeuwB. Spee, Tissue-Engineered Bile Ducts for Disease Modeling and Therapy. *Tissue Eng Part C Methods* 2021;27: 59-76.
9. Soroka, C.J., D.N. Assis, L. Alrabadi, S. Roberts, L. Cusack, M.G. Silveira, et al., Bile-Derived Organoids from PSC Patients Recapitulate the Inflammatory Immune Profile Seen in Cholangiopathies, Providing an in Vitro Model to Test Candidate Therapeutic Agents. *Hepatology* 2018;68: 1080a-1080a.
10. Sasatomi, K., K. Noguchi, S. Sakisaka, M. SataK. Tanikawa, Abnormal accumulation of endotoxin in biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 1998;29: 409-416.

Budget

	Categoria	Costo in Euro
Finanziamento richiesto	Attrezzature da laboratorio e materiali di consumo	3000,00
	Isolamento, propagazione e coltura di organoidi	12000,00
	Caratterizzazione genica e funzionale degli organoidi (RT-PCR and saggi immunoenzimatici)	6000,00
	Determinazione of mediatori infiammatori (Luminex technology)	4000,00
Totale		25.000,00