

Università degli Studi Di Palermo

**Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dipartimento di Discipline Chirurgiche,
Oncologiche e Stomatologiche DICHIRONS**



Istituto Zooprofilattico della Sicilia "A.Mirri"

Direttore: Dr. Antonio Salina

**Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Chirurgiche e Medicina
Rigenerativa Nell'Insufficienza D'Organo**

Coordinatore: Prof. Attilio Ignazio Lo Monte

XXIV Ciclo

STUDIO SPERIMENTALE SU PANCREAS DI MAIALE PER L'OTTENIMENTO DI CELLULE PRODUCENTI INSULINA

**Tesi di dottorato del:
Dr. Francesco Cacciabaudo**

**Tutor:
Ch.mo Prof. Attilio Ignazio Lo Monte**

**Co-Tutor:
Dott.ssa Maria Concetta Gioviale**

**Coordinatore:
Ch.mo Prof. Attilio Ignazio Lo Monte**

**Anni Accademici: 2011-2013
SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE: MED-18**

INDICE

IL DIABETE MELLITO DI TIPO I (IDDM)	2
• Introduzione.....	2
• Epidemiologia.....	3
• Quadro clinico.....	8
• Eziologia.....	10
ORIGINE DEL PANCREAS	13
RICHIAMI ANATOMICI DEL PANCREAS	16
MEDICINA RIGENERATIVA	21
OBIETTIVI	23
MATERIALI E METODI	25
• Fasi del progetto.....	25
• Isolamento e coltura di cellule proveniente dal dotto di Wirsung.....	26
• Isolamento e coltura di cellule provenienti dall'intero pancreas porcino...31	
• Isolamento e coltura di cellule β -pancreatiche.....	33
RISULTATI	36
CONCLUSIONI	48
BIBLIOGRAFIA	50

INTRODUZIONE

Il Diabete Mellito

Il diabete tipo 1 è la più comune malattia endocrino-metabolica dell'infanzia e dell'adolescenza; colpisce un bambino su 400-500 [1].

È un disordine metabolico multisistemico cronico caratterizzato da alterato metabolismo glucidico, lipidico e proteidico dovuto alla diminuita secrezione d'insulina, ed un deficit della sua azione o ad entrambi.

Le più classiche manifestazioni cliniche sono rappresentate dagli elevati livelli glicemici e dallo sviluppo di complicanze acute e croniche; ad esse si associano un' aumentata morbilità e mortalità e una peggiore qualità di vita dei pazienti [2].

Colpisce il 3-5% della popolazione e sia l'incidenza sia la prevalenza di questa sindrome, come riportato nelle ultime stime dell'OMS, sono in continuo aumento [3].

Nel mondo, nel 1995, i pazienti diabetici erano circa 135 milioni e l'area geografica più colpita era l'Europa, seguita dalle Americhe e dal Sud-Est Asiatico [4].

Il diabete mellito tipo I, che rappresenta circa il 10% di tutti i casi di diabete, è caratterizzato da una distruzione delle β -cellule pancreatiche su base immunitaria tale da richiedere la somministrazione esogena d'insulina

Epidemiologia

Per quanto riguarda l'età, l'IDDM presenta 2 picchi di incidenza: uno, relativamente modesto, tra i 5 e gli 8 anni, e uno, più evidente, fra gli 11 e i 14 anni.

Solo nei primi anni di vita il sesso maschile risulta il più colpito.

Alcuni studi eseguiti negli ultimi anni hanno comunque suggerito come sia probabilmente sottostimata l'incidenza del diabete tipo I nell'età adulta; sembra, infatti, che la malattia presenti un ulteriore picco di incidenza nell'età adulta/senile.

Dopo la descrizione degli ICA e dei GAD come markers per il diabete di tipo 1 infantile, si è visto che alcuni pazienti, in cui il diabete insorge nell'età adulta, sono anch'essi positivi per entrambi gli anticorpi [5] .

Allora si introdusse il termine LADA [6] (Latent Autoimmune Diabetes of the Adult) per descrivere questa importante minoranza di pazienti.

Tipicamente si tratta di soggetti che hanno un'età maggiore di 35 anni, positivi per i GAD, non obesi, che non presentano chetoacidosi e perdita di peso.

L'esordio del diabete di tipo I nell'età adulta, raramente è acuto, più frequentemente ha un esordio lento/attenuato.

Benché molti di questi soggetti mantengano buoni livelli glicemici con le sulfaniluree per parecchi anni, diventano insulino-dipendenti più rapidamente rispetto ai soggetti diabetici di tipo 2, che sono negativi per i GAD.

Incidenza

Negli ultimi anni è stata riscontrata un'ampia variazione geografica dell'incidenza dell'IDDM nel mondo in soggetti al di sotto dei 15 anni; infatti, gli indici di incidenza raccolti variano da 0,6/100.000 in Corea e a Città del Messico fino a 36/100.000 in Sardegna e Finlandia [7].

Tale ampia variazione è stata osservata anche in piccole aree di singoli paesi come l'Italia, le Repubbliche Baltiche e quelli della penisola arabica.

La variazione di incidenza fra continenti ha evidenziato che l'indice più basso si riscontra in Asia, seguita dall'Africa e dal Sud America; indici più alti si registrano in Oceania (Australia e Nuova Zelanda) e nell'America del Nord, ma i più alti di tutti sono quelli riscontrati in Europa, dove è stata notata la maggiore variazione intra-continentale di incidenza.

Gli studi effettuati nei paesi mediterranei hanno eliminato l'ipotesi che l'incidenza dell'IDDM sia legata alla latitudine, come si supponeva precedentemente.

La Sardegna, il "punto caldo" del Mediterraneo, presentava il più alto indice di incidenza al mondo, 36/100.000 nel periodo 1989-95 [8], così come la Finlandia nel periodo 1987-92.

Dati recenti sull'incidenza dell'IDDM in Grecia, invece, riportano un indice di 6,25/100.000, che è fra i più bassi in Europa. Inoltre, due studi spagnoli hanno mostrato un'incidenza relativamente alta, avvalorando quindi i dati mediterranei, in contraddizione con un supposto gradiente di incidenza da nord a sud .

È stato riscontrato un incremento della frequenza del diabete giovanile nella maggior parte dei paesi occidentali, soprattutto nei bambini più giovani di 5 anni [9].

In Italia, la variazione interna di incidenza dell'IDDM è la più ampia d'Europa [10].

L'interesse per i dati italiani è cresciuto a causa del riscontro dei sorprendenti indici registrati nella popolazione, che presenta differenze genetiche, storiche, climatiche e di stile di vita nelle diverse zone del paese.

Non sono ancora disponibili gli indici d'incidenza per tutte le regioni italiane, ma il rischio di IDDM sembra essere molto variabile (dal 6,8/100.000 della Lombardia al 36/100.000 della Sardegna).

Recentemente, il quadro italiano è stato arricchito dai dati dei registri delle regioni Campania e Lazio, più meridionali, con un'incidenza rispettivamente di 6,07/100.000 e di 7,9/100.000, simili a quelle delle regioni settentrionali di Piemonte e Lombardia: questo è ancora una volta in contraddizione con la teoria del gradiente da nord a sud.

In molti studi sulla popolazione è stata notata una notevole variazione temporale di incidenza dell'IDDM.

Un'incidenza in ascesa è stata osservata recentemente in Sardegna [11], nei Paesi Bassi, in Sudan, in Finlandia, in Svezia, in Slovacchia, in Germania, in Russia, in Pennsylvania e fra gli ebrei yemeniti. In altre popolazioni è stato osservato un indice fluttuante d'incidenza dell'IDDM.

Molti studi continuano a mostrare un aumento dell'incidenza di IDDM durante i mesi più freddi a tutte le latitudini, anche se meno costante nei bambini al di sotto dei 5 anni.

Dati recenti forniti dallo studio Eurodiab Ace hanno messo in evidenza una notevole variazione stagionale all'esordio clinico con un picco invernale che sembra caratterizzare la maggioranza dei popoli europei, compresi quelli dell'Europa meridionale.

Questo risultato è meno evidente nelle regioni scandinave, anche a paragone con dati svedesi precedenti (dal 1938 al 1977) che mostrano un picco nei mesi invernali e un altro in tarda estate.

Alcuni dati italiani mostrano che non esistono variazioni significative in Liguria, mentre in Sardegna si verifica un nadir in estate (luglio) e un picco in autunno (ottobre).

Dato il ben noto lungo periodo di latenza che precede la diagnosi clinica dell'IDDM, una diversa variazione stagionale nell'esordio della malattia in vari paesi fa supporre l'effetto facilitante di qualche agente infettivo non specifico.

Inoltre, una precoce esposizione a fattori ambientali (in particolare le infezioni trasmesse nell'utero o perinatali, e le prime abitudini dietetiche) possono influire sull'insorgenza del diabete.

Una recente analisi della stagionalità alla nascita fra bambini diabetici inglesi ha rivelato una chiara prevalenza di nascite in primavera e nei primi mesi estivi.

Nella popolazione in generale, la frequenza di infezioni mostra variazioni stagionali, con prevalenza in inverno.

Il collegamento fra l'esposizione a infezioni intrauterine e perinatali e lo sviluppo susseguente di IDDM è coerente con tali risultati.

Il meccanismo genetico non è sufficiente a giustificare i netti andamenti di stagionalità alla nascita.

Molti registri hanno riportato la distribuzione per età dei casi neodiagnosticati di diabete infantile.

La ripartizione per età all'esordio dell'IDDM mostra generalmente un picco di esordi fra i 10 e i 15 anni con un calo piuttosto marcato nella tarda adolescenza (16-19 anni).

È probabile che i bambini suscettibili siano esposti a uno o più fattori, che favoriscono il diabete, nei primi 15 anni di vita: in seguito, o tale esposizione diminuisce o nella maggioranza degli individui suscettibili si è già manifestata la malattia entro i 20 anni di età.

Fra i 15 e i 30 anni, sembra essere più pronunciato l'andamento secondo il sesso ($M/F > 1$).

I bambini che hanno un parente di primo grado con DM 1 sono ad altissimo rischio [12].

Prevalenza

Gli studi recenti dimostrano una prevalenza tra 0,5/1000 e 0,6/1000 abitanti [13].

Nell'Italia continentale la malattia ha un'incidenza annuale di circa 10 nuovi casi per 100.000 abitanti al di sotto dei 15 anni di età, e quindi una prevalenza calcolata dello 0,3%, considerando che un terzo dei pazienti sviluppa IDDM oltre i 15 anni di età [14].

In Italia sono presenti circa 1.700.000 diabetici (50.000 diabetici di tipo I) e si prevede di raggiungere la cifra di 3.300.000 diabetici tra 30 anni [15].

La presenza di diabete influenza negativamente la speranza di vita, che, a seconda degli studi, si riduce di circa 10-15 anni nei diabetici di tipo I [16].

I dati prospettici esistenti nel nostro Paese evidenziano che dai 35 anni in poi i pazienti diabetici presentano tassi di mortalità più alti dei soggetti non diabetici e che, mediamente, il diabete è associato ad un aumento del rischio di morte di circa il 50% [17].

Prima dell'era insulinica la principale causa di morte era lo scompenso glicometabolico acuto mentre, oggi, le complicanze micro e macrovascolari rappresentano le principali cause di morte nei pazienti diabetici.

Quadro clinico

Spesso il DM di tipo 1 si presenta con chetoacidosi, che può insorgere ex novo o dopo stress dovuto ad una malattia o ad interventi chirurgici.

L'insorgenza improvvisa di sintomi in un paziente giovane e magro con chetoacidosi è stata infatti, considerata diagnostica di IDDM.

La malattia potrebbe anche avere un'insorgenza improvvisa in seguito ad un'infezione.

Le principali manifestazioni cliniche sono:

- Poliuria e sete: la poliuria è dovuta alla diuresi osmotica secondaria all'iperglicemia. La sete è dovuta allo stato iperosmolare e alla disidratazione;
- Polifagia con perdita di peso: è dovuta alla deplezione di acqua e allo stato catabolico con riduzione del glicogeno, proteine e trigliceridi;
- Astenia e debolezza: potrebbe essere dovuta al consumo muscolare per lo stato catabolico che deriva dalla deficienza di insulina, all'ipovolemia e all'ipokalemia;
- Crampi muscolari dovuti allo squilibrio elettrolitico;
- Enuresi notturna: quando è secondaria alla poliuria può essere un indicatore dell'insorgenza del diabete nei bambini;
- Visione confusa: dovuta all'effetto dello stato iperosmolare sul cristallino e sull'umor vitreo. Il glucosio e i suoi metaboliti causano una dilatazione della lente alterando la normale lunghezza focale;
- Sintomi gastrointestinali: nausea, disagio addominale o dolore e alterazioni dell'alvo potrebbero accompagnare una chetoacidosi acuta. Una steatosi epatica acuta potrebbe portare alla distensione della capsula epatica causando dolore all'ipocondrio destro. Un dolore persistente potrebbe anche indicare una pancreatite. Sintomi cronici in uno stadio tardivo possono essere espressione di una neuropatia autonoma;
- I pazienti possono mantenere il loro peso normale o mostrare dimagrimento, ciò in relazione alla distanza che intercorre tra l'insorgenza della malattia e il trattamento;

- Neuropatia periferica: si presenta come torpore e formicolii in entrambe le mani e i piedi con un pattern a guanto o a calza. E' una neuropatia ascendente bilaterale, simmetrica dovuta a molteplici fattori che includono l'accumulo di sorbitolo nei nervi sensitivi periferici a causa della sostenuta iperglicemia.

Le prime manifestazioni cliniche di solito precedono di giorni o settimane la diagnosi della malattia; comunque la distruzione delle cellule può già essere iniziata da mesi o anche anni, considerando che il diabete si manifesta in seguito ad una riduzione di almeno il 90% del patrimonio cellulare.

Eziologia

L'IDMM ha un'aumentata prevalenza fra soggetti con altre malattie autoimmunitarie come l'Addison, la tiroidite di Hashimoto, l'anemia perniciosa e la celiachia.

È una malattia cronica irreversibile, risultato finale di un processo patologico cronico, caratterizzato dalla distruzione selettiva e progressiva delle cellule β pancreatiche da parte dei linfociti T [18, 19].

Alla base vi è un processo autoimmune che si pensa risulti dall'interazione di fattori ambientali (quali virus, tossine, fattori presenti nella dieta) con un substrato genetico predisponente.

Suscettibilità genetica

Gli HLA DR3 e DR4 e i loro alleli associati 0201 e 0302 predispongono al diabete infantile di tipo 1.

DR2 e DQ_1*0602 sono fortemente protettivi nei confronti del DM 1 infantile, di conseguenza è molto raro trovarli in questi pazienti.

In contrasto, DR2 e DQ_1*0602 sono presenti relativamente più spesso nel LADA [20].

Fattori ambientali

Agenti virali: virus della Parotite, Rosolia, Citomegalovirus (CMV) e dagli Enterovirus, in particolare della famiglia dei Coxsackie.

Alcune proteine presenti nel latte vaccino (spesso sostituito troppo presto al latte materno): sembrano avere un ruolo importante nella patogenesi del IDDM quando vengono in contatto con il sistema immunitario non completamente sviluppato[21].

A favore del ruolo del latte vaccino nella patogenesi del IDDM vi è la presenza di una risposta cellulo-mediata nei confronti della β -caseina e della β -lattoglobulina, e quella di anticorpi anti-albumina bovina nei diabetici di recente diagnosi.

L'allattamento al seno è invece un fattore protettivo certo, probabilmente legato alla presenza d'insulina, sia pure in minima quantità [22].

Anche la regolare supplementazione con vitamina D avrebbe analogamente un effetto protettivo.

Carattere distintivo dell'IDDM è la comparsa precoce di autoimmunità umorale e T cellulare.

I principali autoantigeni bersaglio di questa reazione autoimmunitaria sono rappresentati dall'insulina, dalla decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD), dalle insule e dalle proteine ad attività tirosin-fosfatasica IA-2 e IA-2 β .

Il primo bersaglio della risposta autoimmune precoce nei bambini con suscettibilità genetica per il IDDM è rappresentato dall'insulina.

Gli anticorpi anti-insulina (IAA) sono presenti nel 50% dei soggetti con diagnosi recente.

La combinazione degli anticorpi anti-isole (ICA) (Figura1)

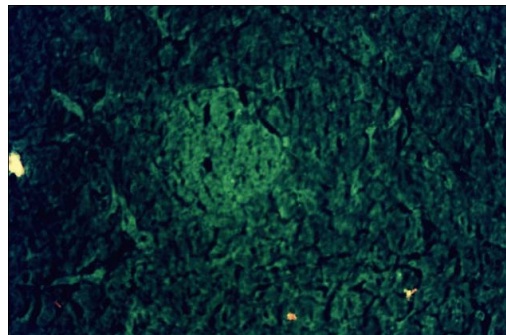


Figura 1: Immunofluorescenza degli anticorpi anti-isola pancreaticca (ICA): si riconosce l'immagine dell'insula pancreaticca.

e degli anticorpi anti-insulina (IAA) è notevolmente predittiva dello sviluppo di un diabete di tipo 1 (il 70% dei parenti di primo grado positivi per entrambi gli anticorpi sviluppa la malattia entro 5 anni).

Sono stati identificati numerosi altri antigeni delle cellule insulari, in particolare la decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD), enzima che converte il glutammato in GABA.

Questo ha un ruolo molto importante poiché gli anticorpi anti-GAD sono presenti precocemente e sono molto più predittivi della malattia rispetto agli anticorpi anti-cellule insulari o agli autoanticorpi anti-insulina.

Gli anticorpi anti-insulina (IAA) si ritrovano prima della comparsa di anticorpi anti-GAD o anti-IA-2, ma sono meno frequenti dopo 10 anni [23].

La malattia attraversa una fase prodromica, durante la quale gli anticorpi diretti contro antigeni insulari sono presenti in circolo e fungono da marker per la predizione della patologia.

I linfociti T che infiltrano il pancreas nel periodo che precede l'insorgenza clinica della malattia (insulite), sono cellule T autoreattive dirette verso autoantigeni β cellulari; la loro presenza in circolo deriva, verosimilmente, da un difetto dei meccanismi normalmente deputati al mantenimento dell'omeostasi immunologica.

È stato ipotizzato che nel IDDM il sistema immunologico non sia in grado di bloccare la risposta diretta verso le cellule produttrici di insulina a causa di una alterazione dei meccanismi di controllo dell'apoptosi.

In base ai dati presenti in letteratura si può affermare che l'apoptosi rappresenta un meccanismo di morte β cellulare nel diabete autoimmune[24].

Origine del pancreas

Il pancreas si sviluppa verso la 5^o settimana per una proliferazione dell'epitelio (endoderma) dell'intestino anteriore che determina la comparsa di due abbozzi

distinti, dorsale e ventrale, situati rispettivamente al di sopra e al di sotto del diverticolo epatico.

Dopo la sua formazione, l'abbozzo ventrale si sposta posteriormente intorno alla 7° settimana e si fonde con l'abbozzo dorsale penetrando insieme a questo, nel mesogastrio dorsale.

Tuttavia, ciascun abbozzo continua a mantenere un collegamento indipendente con l'intestino primitivo, sotto forma di un sottile peduncolo che ben presto si canalizza; si formano così i due dotti pancreatici, il principale (di Wirsung) e l'accessorio (di Santorini).

La gemma dorsale dà origine alla parte superiore della testa, al corpo e alla coda.

L'abbozzo ventrale invece dà origine alla parte inferiore della testa (figura 2).

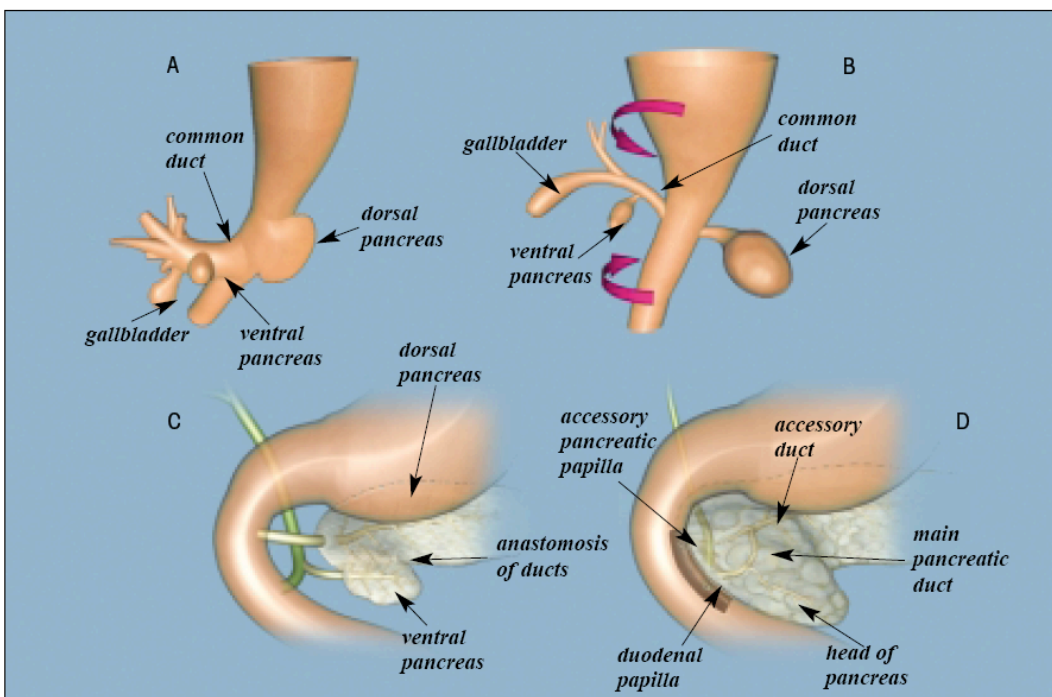


Figura 2: Stadi di sviluppo del pancreas. Sviluppo embriologico del feto intorno alla 4° settimana di gestazione con le gemme ventrale e dorsale (a), sei settimane con il pancreas ventrale che si estende verso il pancreas dorsale (le frecce indicano l'asse di rotazione); sette settimane con la fusione del pancreas dorsale e ventrale e l'inizio dell'anastomosi duttale (c), e alla nascita quando il pancreas è un organo unico e l'anastomosi duttale è completata (d).

Nelle fasi iniziali dello sviluppo (III mese) l'abbozzo del pancreas è rappresentato da un insieme di dotti ramificati, le cui estremità, proliferando, danno origine a gemme epiteliali.

Queste ultime in gran parte divengono cave in modo che il loro lume prosegue con quello dei dotti da cui derivano; traggono così origine gli acini ghiandolari esocrini.

Nel frattempo, le cellule epiteliali dell'abbozzo pancreatico si organizzano dando origine agli acini ghiandolari e al complesso sistema dei dotti escretori.

Nel corso del 3° mese dagli stessi elementi epiteliali si differenziano gli isolotti pancreatici che cominciano a secernere insulina e glucagone verso il 5° mese [25].

Una parte delle gemme, invece, si distacca dal sistema dei dotti, migra attraverso la membrana basale nel mesenchima circostante [26], formando cordoni cellulari che vengono riccamente irrorati e costituiscono gli isolotti endocrini: le prime cellule contenenti ormoni derivano, quindi, dall'epitelio dei dotti pancreatici embrionali.

La migrazione dei precursori delle insule è parzialmente controllata da una matrice di metalloproteasi (MMP) [27], una superfamiglia di antigeni che degradano le proteine della matrice extracellulare, compresi il collagene, fibronectina, e laminina.

Due proteasi, MMP-2 e MMP-9, sono espresse durante lo sviluppo pancreatico, e gli inibitori della funzione delle MMP interferiscono con la morfogenesi insulare nell'epitelio pancreatico isolato.

L'attività funzionale delle cellule insulari è presente già dalla decima settimana di vita embrionale e al quarto mese la massa del tessuto insulare rappresenta circa il 33% del volume totale della ghiandola pancreatica.

La potenzialità di formare tessuto endocrino pancreatico a partenza dai dotti, non è ristretta al periodo dello sviluppo embrionale: in determinate circostanze, come in caso di pancreatectomia parziale o legatura dei dotti, la formazione di nuove insule può avvenire con grande efficienza.

Richiami anatomici del pancreas

Il pancreas è situato nello spazio retroperitoneale ai limiti fra il piano sovramesocolico e quello sottomesocolico, nell'addome superiore dietro la retrocavità degli epiploon, posto obliquamente con asse dal basso e da destra verso l'alto e sinistra.

È composto da tre parti: la testa, il corpo e la coda. Solo la coda è intraperitoneale, contenuta nel legamento pancreatico-lienale, mentre la testa e il corpo sono situati nel retroperitoneo.

La testa ha rapporti intimi con l'ansa duodenale, che la contorna; anteriormente è incrociata dalla radice del mesocolon trasverso.

Dalla testa, a sinistra e in basso, si protrae il processo uncinato, che si porta dietro e sotto il corpo pancreatico formando un solco che contiene la vena e l'arteria mesenterica superiore più a sinistra.

La faccia posteriore della testa ha rapporti col coledoco, il cui tratto terminale risulta intrapancreatico.

Posteriormente, dietro un piano fasciale, decorre la vena cava inferiore che a tale livello riceve la renale destra. Il peso medio è di circa 70 gr.

Il corpo pancreatico, lungo circa 10 cm, corrisponde indietro alle prime due vertebre lombari.

È a contatto, indietro, con i pilastri mediali ed intermedi del diaframma e con l'arteria mesenterica superiore che origina, a questo livello, dall'aorta, dalla quale è separata dal passaggio della vena renale e surrenale sinistra.

La faccia anteriore costituisce parte della parete posteriore della retrocavità degli epiploon.

Il margine superiore del corpo pancreatico più posteriormente presenta un solco trasversale che contiene l'arteria e la vena splenica più in profondità.

L'arteria e la vena sinistra sono postero-inferiori rispetto al corpo del pancreas.

Vascularizzazione

Il pancreas è vascularizzato da arterie che provengono dal tronco celiaco e dalla mesenterica superiore.

A livello della testa del pancreas, lungo il margine del duodeno, vi sono due arcate arteriose pancreatico-duodenali, sulla faccia anteriore e posteriore, formate dall'anastomosi dell'arteria pancreatico-duodenale superiore, ramo della gastro-duodenale, e dalla pancreatico-duodenale inferiore, ramo della mesenterica superiore.

Le arcate pancreatico-duodenali, anteriore e posteriore, irrorano la C duodenale e la porzione cefalica del pancreas.

Il corpo è vascolarizzato dai rami dell'arteria lienale e dalla pancreatica dorsale a sede retropancreatica che origina dall'epatica o dalla mesenterica superiore o dalla splenica o dal tronco celiaco o dall'aorta.

L'arteria pancreatica dorsale si divide in due rami: un ramo sinistro laterale, che decorre lungo il margine postero-inferiore del pancreas, e un ramo destro, che incrocia la testa pancreatica, formando anastomosi con l'arcata pancreatico-duodenale.

Dall'arteria splenica nascono diversi rami pancreatici superiori e caudali.

Uno dei rami superiori può essere di calibro maggiore, denominato arteria pancreatica magna; se presente, entra nel corpo del pancreas a livello del terzo medio e del terzo distale.

Il drenaggio venoso corre in modo parallelo al decorso delle arterie.

La vena pancreatica inferiore drena nella vena mesenterica superiore, le vene pancreatiche superiori drenano nella splenica.

Sono presenti, inoltre, diverse vene brevi che drenano direttamente nel tronco portale.

La circolazione linfatica è tributaria di numerosi linfonodi satelliti dei vasi sanguigni pancreatico-duodenali, mesenterici superiori, splenici, retropancreatici, preaortici, iuxtacavali, pericoledocici, catena dell'arteria epatica.

L'innervazione è data dal plesso celiaco, direttamente o tramite i plessi perivasali che ne originano: è costituita da fibre ortosimpatiche e vagali con funzione secretiva e sensitiva.

La secrezione esocrina del pancreas avviene attraverso due dotti escretori, il principale, di Wirsung, e l'accessorio di Santorini.

Il Wirsung percorre tutta la ghiandola dalla coda alla testa, sfociando nella ampolla Vateriana ove, con la bile, il secreto pancreatico raggiunge il duodeno attraverso la papilla di Vater.

Il Santorini, più breve, è situato nella parte superiore della testa del pancreas e sbocca all'estremo destro nella papilla minore nel duodeno, all'estremo sinistro nel Wirsung: in condizioni normali funziona soprattutto come collaterale del Wirsung, mentre diventa la via di scarico più importante in caso di stenosi del dotto principale.

Il succo pancreatico è liquido, limpido, filante, alcalino.

Prodotto nella quantità giornaliera di circa 700 ml, è formato da due componenti:

1. una acquosa, ricca di elettroliti e soprattutto di bicarbonato, secreta dalle cellule centro-acinose e da quelle dei segmenti escretori intercalari
2. una ad alto contenuto proteico, costituita essenzialmente dagli enzimi secreti dalle cellule acinose.

Gli enzimi pancreatici sono: proteolitici, lipolitici, e glicolici.

Componente endocrina

La funzione endocrina del pancreas viene espletata dalle cellule, appartenenti al sistema APUD, contenute nelle isole di Langerhans, le quali prendono il nome dall'Autore che le descrisse nel 1869; queste sono disposte lungo tutta la ghiandola in numero variabile, e compreso tra i 20.000 e 2.000.000 (1-2 per mm^3), di forma

rotonda e del diametro di 150-250 μm , pesano in media nell'uomo circa 2 gr (0,5-2,5 g). Le isole di Langerhans hanno una morfologia tipica delle ghiandole endocrine cordonali e presentano una ricca rete capillare che rende possibile la rapida immissione nel flusso del secreto ormonale (figura 3).

Gli isolotti sono, inoltre, riccamente innervati da fibre nervose amieliniche simpatiche e parasimpatiche che formano plessi nervosi perivasali con propaggini che si spingono sino a contatto con le cellule insulari, che verosimilmente svolgono un ruolo nella regolazione della secrezione ormonale.

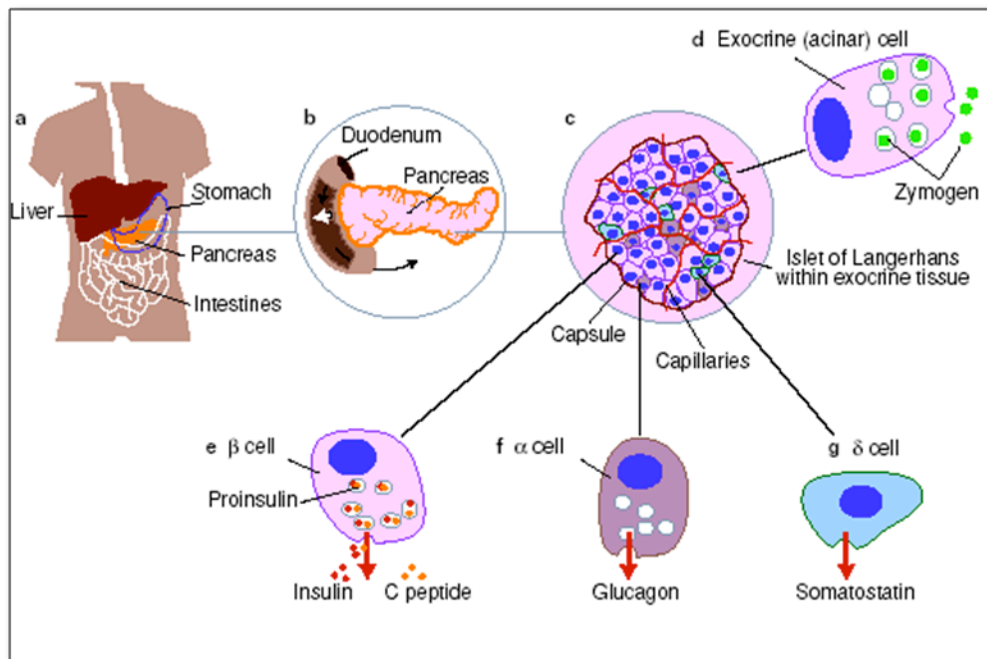


Figura 3: Organizzazione delle insule di Langerhans

Una sottile capsula fibrosa separa le insule dal tessuto circostante esocrino deputato alla produzione dei zimogeni.

All'interno delle isole di Langerhans si distinguono 4 differenti tipi di cellule, ognuna di queste con un suo proprio prodotto di secrezione ormonale:

- cellule α , disposte alla periferia dell'isola, rappresentanti il 15% del totale insulare; secernono glucagone, ormone iperglicemizzante.
- Cellule β , che occupano la parte centrale dell'isola, che rappresentano il 65% del totale insulare e secernono pro-insulina, la quale si scinde in C-peptide ed insulina, ormone ipoglicemizzante.
- Cellule δ , alla periferia dell'isola in proporzione del 20% del totale insulare; secernono somatostatina, ormone che regola localmente l'attività delle cellule insulo-pancreatiche e gastrina in tracce.
- Cellule PP (o F), diverse dagli altri tipi cellulari, che secernono il polipeptide pancreatico; l'azione di questo sul metabolismo glucidico non è stata ancora chiarita; sappiamo che i suoi livelli plasmatici sono incrementati in seguito ad ingestione di proteine, al digiuno, all'attività fisica e all'iperglicemia.

La posizione occupata dalle diverse cellule all'interno dell'isola pancreatica ha importanza funzionale. Infatti è stato dimostrato che tra cellule diverse che siano adiacenti vi è scambio di sostanze e di ioni [28].

Medicina Rigenerativa

I problemi associati al trattamento di patologie legate alla perdita di funzionalità o al semplice invecchiamento di organi e tessuti hanno orientato, negli ultimi anni, l'interesse della ricerca scientifica verso la medicina rigenerativa.

L'obiettivo è quello di ripristinare la funzionalità degli organi compromessi, o

almeno di migliorarla.

La Medicina rigenerativa identifica l'insieme delle ricerche e delle terapie che, nel perseguire l'obiettivo della rigenerazione, utilizzano le cellule staminali. Le protagoniste di una nuova era scientifica sono appunto le cellule staminali (SCs), esse potrebbero essere utilizzate per curare malattie genetiche e degenerative come le malattie cardiovascolari, muscolari o neurologiche, quali il Parkinson e Alzheimer, patologie gastrointestinali e il diabete.

Si sono aperti, così, diversi scenari d'intervento e tra essi la possibilità di inserire fattori di crescita nel sito danneggiato, in modo da stimolare le cellule a rigenerare il tessuto, o alternativamente lo sviluppo di biomateriali per l'ingegneria tissutale, come polimeri biomimetici e scaffold tridimensionali bioattivi, capaci di indurre specifiche risposte cellulari e di dirigere la formazione di nuovi tessuti da impiantare in vivo.

Le SCs esistono in tutti gli organismi multicellulari e sono cellule indifferenziate, capaci di dare origine a diverse progenie mature e di auto-mantenersi, esse giocano un ruolo centrale nell'omeostasi, generando nuove cellule mature per aumentare la massa tissutale durante la crescita pre- e post-natale, e rimpiazzare le perdite cellulari dovute a senescenza o danno[29].

OBIETTIVI

L'obiettivo del mio studio è stato quello di standardizzare delle tecniche per prelevare, mantenere e transdifferenziare la componente sia esocriche sia endocrine del pancreas in cellule producenti insulina; per poter realizzare tale lavoro sono state seguite diverse fasi.

Nella fase preliminare furono prelevate e trans-differenziate cellule provenienti dal dotto di Wirsung di maiale in cellule- β producenti isulina.

Nella seconda fase le β -cellule furono ottenute dalla componente esocrina di pancreas in toto di maiale dopo exsanguinazio e con l'impiego di due diverse soluzioni di conservazione, al fine di valutare quale delle due potesse mantenere meglio l'organo e potesse dare una successivamente una migliore resa cellulare; inoltre l'altro obiettivo di questa seconda fase del mio studio fu quella di confrontare la vitalità e la capacità di produrre insulina delle cellule prima e dopo crioconservazione.

Nella fase finale furono prelevate direttamente le cellule β -pancreatiche da maiale a cuore non battente con l'impiego delle due soluzioni di conservazione prima citate, al fine di valutare ancora una volta le differenze nelle capacità conservative delle due soluzioni direttamente sulle cellule β e di valutare la vitalità e la capacità di produrre insulina delle suddette β -cellule direttamente prelevate dal maiale prima e dopo criopreservazione.

Questo studio è stato condotto presso il laboratorio di Chirurgia Sperimentale e

presso il reparto di Virologia Sperimentale dell'Istituto Zooprofilattico della Sicilia "A.Mirri", in collaborazione con il Consorzio Interuniversitario per i Trapianti d'Organo di Roma.

MATERIALI E METODI

Fasi del progetto:

1) Ottenimento di cellule produttrici di insulina da cellule duttali prelevate dal dotto di Wirsung di maiale

2) Ottenimento di cellule β pancreatiche da componente esocrina di maiale dopo exsanguinazione;

-impiego di due soluzioni di conservazione al fine di valutarne l'efficienza conservativa;

-valutazione della vitalità cellulare prima e dopo criopreservazione.

3) Prelievo di cellule β pancreatiche da maiale prelevato a cuore non battente;

-impiego di due soluzioni di conservazione al fine di valutarne l'efficienza conservativa;

-valutazione della vitalità cellulare prima e dopo criopreservazione.

La scelta del maiale come modello sperimentale è stata presa in considerazione per le similitudini anatomiche e fisiologiche con l'uomo e per la relativa facilità di gestione tecnica della stabulazione.

Isolamento e Coltura di cellule provenienti dal dotto di Wirsung Porcino

1) Per la **prima fase** dello studio sono stati utilizzati pancreas di 20 maiali di sesso femminile (grande bianco / Landrace), di età compresa tra i 12 e i 18 mesi, di peso medio (120-140 kg). I Pancreas sono stati raccolti a cuore non battente dopo dissanguamento completo dell'animale seguendo le linee guida approvate dal comitato etico[30].

L'anestesia è stata indotta con premedicazione utilizzando ketamina (Ketavet , Farmaceutici Gellini , Peschiera Borromeo , Italia , 10 mg / kg) , atropina Solfato (Monico Spa , Venezia Mestre , Italia; 0,03 mg / kg) e diazepam (Valium , Roche , Monza , Italia , 0,4 mg / kg), seguito da una miscela di ossigeno isoflurano / fornito da intubazione orotracheale . L'anestesia generale è stata mantenuta con l'1% -1,7% isoflurano (Rhodia Chem SpA , Ospiate di Bollate , Italia) con il 50 % di ossigeno integrato da una infusione continua di fentanyl (Fentanest , Pfizer , Latina, Italia , 8 g / kg / h) e midazolam (Ipnovel , Roche , Monza , Italia , 0,5 mg / kg / h) .

Dopo il prelievo i pancreas sono stati lavati con soluzione salina, contenente antibiotici e antifungini al fine di ridurre il più possibile le contaminazioni.

Successivamente, mediante una tecnica di microchirurgia effettuata dal prof Attilio Ignazio Lo Monte e suoi collaboratori, è stato possibile localizzare il dotto di Wirsung (Figura 4).

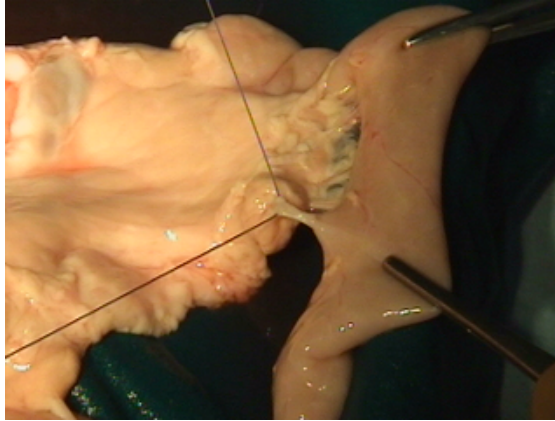


Figura 4: scollamento del duodeno e repertazione su laccio del dotto di Wirsung

Successivamente esso è stato sezionato per introdurre una cannula calibro 18 (Figura 5), tramite il quale si è perfuso circa 50 ml di soluzione di 4°C Hanks (Sigma - Aldrich) contenenti antibiotici (200 U/ml di penicillina, 200 µg/mL streptomina) e farmaci antifungini con lo scopo di raffreddare il parenchima, e sterilizzare la cavità duttale. È stato inoltre sezionato il Wirsung e nelle sue maggiori ramificazioni utilizzando lo stesso catetere come supporto per la delicata manipolazione.

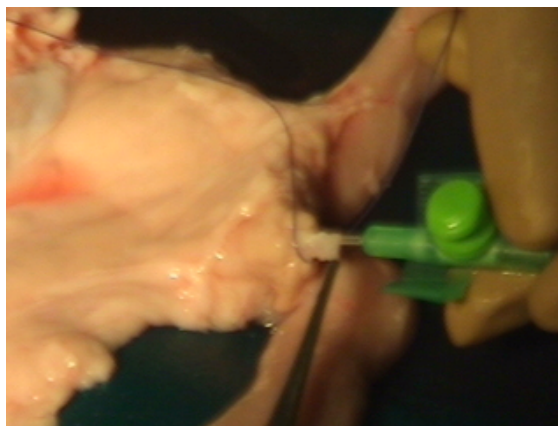


Figura 5: incannulamento del dotto di Wirsung mediante un agocannula da 18 G

Colture Cellulari

I dotti Successivamente, sono stati conservati in soluzione di Hanks a 4°C con 200 U/ml penicillina, 200 µg/ml streptomicina, e 2% fungizone. Dopo che la soluzione di Hanks fu rimossa, i condotti furono lavati con 50 ml di Medium A: (CMRL 1066, 10% siero fetale bovino (FCS), 2 mmol / L di L- glutammina, 0,1 UI / ml di insulina umana , 200 IU / ml penicillina, 200 µg/ml streptomicina, 2 % fungizone , e 2 µg/mL desametasone).

Dopo incubazione a 37°C con il 5 % CO₂ per 2, giorni al fine di consentire l'espansione duttale, il sovrinatante è stato rimosso e i condotti sono stati lavati 3 volte con medium B:(15 mmol/L DMEM/F12-HEPES, 0,1 mg/ml inibitore di tripsina, 30 mg/ml di albumina di siero bovino (BSA), 2 mmol/L di L- glutammina, 200 U/ml penicillina, 200 µg/mL streptomicina, 2 % fungizone, pH 7,4)

Il tessuto così fu ridotto in piccoli pezzi e fu lasciato incubare nel medium C:(15 mmol/L DMEM / F12 - HEPES, 0,1 mg/ml inibitore di tripsina, 30 mg/mL di BSA, 2 mmol/L di L- glutammina , 200 U/ml penicillina, 200 µg/mL streptomicina, 2% fungizone , 1 mg/ml di collagenasi P (Roche), pH 7,4).

Dopo la disgregazione, i piccoli frammenti furono incubati per 40 minuti a 37°C con il 5% di CO₂, e dopo centrifugati a 1000 rpm per 10 minuti, scartando il sovrinatante; il pellet, fu sottoposto a digestione con 2 mg/ml di tripsina per 30 minuti a 37°C seguita da centrifugazione per 10 minuti a 1000 rpm . Il sovrinatante fu scartato e il pellet fu lavato tre volte con mezzo B e centrifugato per 3 minuti a 2000rpm.

In fine il pellet ottenuto fu risospeso nel mezzo D: buffer di Ca^{2+} / Mg^{2+} , 15 mmol/L HEPES, 145 mmol/L di NaCl, 4,5 mmol/L KCl, 2 mmol/L EGTA, 5,6 mmol/L di glucosio, 200U/ml penicillina, 200 microgrammi/ml streptomina, 2% fungizone, pH 7,4 .

Dopo incubazione per 10 minuti a 37°C con il 5% di CO_2 , le cellule furono distribuite in fiasche T-75 rivestite con matrigel(Becton Dickinson) ed incubate per 4 giorni a 37°C 5% di CO_2 in medium E : CMRL 1066, 10% FCS, 2 mmol/L di L- glutamina, 0,1 UI/L insulina umana, 2 micro g / mL dexametasone, 200 U/ml di penicillina, 200microg/ml di streptomina, 2%, fungizone, 5,6 mmol/L di glucosio, pH 7,4 .

Differenziamento cellulare

Dopo 4 giorni di incubazione le cellule furono raccolte e coltivate in fiasche rivestite con Matrigel (Collaborative Research - Becton Dickinson) in presenza del medium F senza glucosio contenente: 15 mmol/L DMEM/F12 - HEPES, 2 mmol/L di L- glutamina, 200 U/ml penicillina, 200 µg / ml streptomina, 2% fungizone, 1g/L insulino - transferrina - sodio selenito (ITS ; Sigma - Aldrich) , 2 g/ml BSA , 10 mmol/L e 20 ng/mL cheratinociti fattore di crescita (KGF , Roche Diagnostics GmbH) e mantenute 7 giorni in modo da promuovere l'associazione delle cellule duttali in strutture tridimensionali, le fiasche furono lavate tre volte in mezzo RPMI : G (5 mmol/L di glucosio, 10 mmol/L HEPES, 200 U/ml penicillina, 200 µg/mL di streptomina , 10 % FBS).

Dopo ciò furono prelevate da ciascuna fiasca 2 gruppi da 20 aliquote e incubate nel medium F (in assenza di glucosio) in piastre da 20 pozzetti, il primo gruppo per 4 ore a 37°C, il secondo gruppo per 24 ore a 37°C, al fine di valutare la possibile produzione di insulina in questa fase preliminare utilizzando un kit radioimmunologico.

Dopo ciò le cellule sono state suddivise in 4 gruppi al fine di incubarle per 2 settimane a diverse concentrazioni di glucosio :0 (controllo), 5,6 , 17,8 e 25 mmol/L. La quantificazione dei livelli di insulina e glucagone nel terreno fu eseguita anche in questo caso utilizzando un kit radioimmunologico .

Saggio di Immunocitochimica

Al fine di confermare la presenza di insulina e glucagone, le cellule in monostrato furono sottoposte a saggio di immunoistochimica; in particolare sono state fissate per 30 minuti con 40 g/L polyformalde - hyde (PFA) in 0,1 mol/L di tampone fosfato salino (PBS, pH 7,2) . Dopo incubazione con 0,3 % H₂O₂ in metanolo puro per 30 minuti a temperatura ambiente e l'immersione in 0,1 mol/L pH 6,0 di tampone citrato, i campioni sono stati incubati con 10 g/L BSA più 4 g/L di Triton X - 100 a 37°C per 30 minuti .

Per la colorazione immunocitochimica furono utilizzati diversi tipi di anticorpi primari: anticorpi monoclonali di topo anti-insulina umane (1:200), anticorpi policlonali di coniglio anti-glucagone umane (1:100) e anticorpi monoclonali di topo anticitocheratina -19 (anti-CK-19) anticorpi (1:50). Gli anticorpi secondari utilizzati

per immunofluorescenza furono: asino/antimurini IgG Texas rosso (1:200) , capra/anti-coniglio IgG con isotiocianato di fluorescina (FITC, 1:200), e di capra/antimurini IgG FITC (1:250) . Tutti gli anticorpi sono stati acquistati da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif , Stati Uniti). I campioni cellulari sono stati montati su vetrino per l'esame con un microscopio ottico Zeiss [31] .

Isolamento e Coltura di cellule provenienti dall'intero pancreas porcino

Anche per questa **seconda fase** dello studio, sono stati utilizzati pancreas di 20 maiali di sesso femminile (grande bianco / Landrace), di età compresa tra i 12 e i 18 mesi, di peso medio (120-140 kg). La procedura operativa fu anche in questo caso approvata dal nostro Comitato Etico e le modalità di prelievo e conservazione furono condotte nelle stesse condizioni sperimentali descritte precedentemente[30].

Dopo i prelievi, i pancreas furono divisi in 2 gruppi contenenti ciascuna 10 unità, di cui il primo gruppo (gruppo UW) fu immerso in soluzione U.W (Pentafrazione 50g/L, Acido Lattobionico (come Lactone) 35.83 g/L, fosfato monobasico di Potassio 3.4 g/L, Magnesio Solfato eptaidrato 1.23 g/L, Raffinosio pentaidrato 17.83 g/L, Adenosina 1.34 g/L, Allopurinolo 0.136 g/L, Glutatione 0.922 g/L, Idrossido di Potassio 5.61 g/L, acido cloridrico per tamponare a pH 7.4) e il secondo gruppo (gruppo TLM) in soluzione UW addizionata con 500ml perfluorocarbonato ossigenato (PFC) secondo la metodica del "Two Layer Method"(Figura 6). Il contenitore fu raffreddato a 4°C [32]. Entrambi i gruppi furono mantenuti nelle rispettive soluzioni per 240 minuti a 4°C.

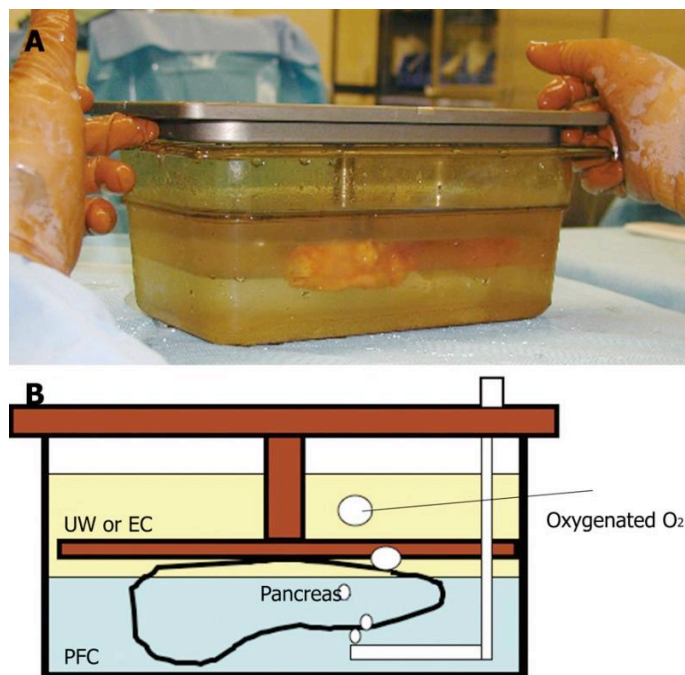


Figura 6: Rappresentazione del “Two Layer Method”

La fase successiva fu quella di ottenere il tessuto esocrino mediante digestione dell'intero pancreas usando collagenasi P (Roche, Monza, Italia ; 3mg/ml) secondo il metodo di Gray [33].

Il tessuto venne fatto sedimentare su un gradiente discontinuo di Ficoll (Sigma Aldrich , Milano , Italia) di 1108, 1096, 1069, e 1037 g/cm³ . Dopo centrifugazione 750g a 4°C per 18 minuti , furono ottenute le fasi 1096/1108 per le cellule acinose e 1037/1069 per le cellule duttali epiteliali .

Un'aliquota contenente cellule acinose e cellule epiteliali duttali di entrambi i gruppi fu criopreservato (riducendo gradualmente la temperatura, prima del trasferimento in azoto liquido a -196°C) per 8 settimane usando DMSO al 10% (Sigma Aldrich, Milano, Italia) [34-36]. I pellet freschi invece furono sospesi nel tampone utilizzato nella prima fase dello studio, e successivamente furono seguiti gli stessi step di coltura, di valutazione della secrezione insulinica e di immunocitochimica.

Invece per quanto riguarda i campioni criopreservati, dopo 8 settimane furono sottoposti a scongelamento graduale e successivamente a gradienti di Percoll (Sigma Aldrich, Milano, Italia) 1063g/cm³ per eliminare i rifiuti cellulari e lo stesso terreno di coltura.

Tutti i dati sono stati espressi come percentuali, mediane e valori medi \pm con un errore standard medio (SEM) comparati con il test χ^2 con valori di $P < 0,05$ considerati dati significativi, ottenuti dal confronto tra i due metodi di conservazione dell'organo: sul campione cellulare fresco, sulle cellule dopo 2 settimane di cultura, e dopo 2 settimane di cultura più 8 settimane di crioconservazione [37].

Isolamento e coltura di cellule β pancreatiche

Anche nella **terza fase** del mio lavoro di ricerca, sono stati utilizzati i pancreas di 20 maiali di sesso femminile (grande bianco / Landrace), di età compresa tra i 12 e i 18 mesi, di peso medio (120-140 kg). La procedura operativa fu anche in questo caso approvata dal nostro Comitato Etico e le modalità di prelievo e conservazione rispettano il protocollo messo a punto e utilizzato nelle fasi precedenti della mia ricerca [30]. Anche in questo caso i pancreas sono stati divisi in 2 gruppi contenenti ciascuna 10 unità, di cui il primo gruppo (gruppo UW) è stato immerso in soluzione U.W e il secondo in UW addizionato con 500ml di perfluorocarbonato. Il contenitore è stato raffreddato a 4°C [32]. Entrambi i gruppi sono stati mantenuti nelle rispettive soluzioni per 240 minuti a 4°C. Dopo 240 minuti anche in questo caso fu effettuata una digestione dell'intero pancreas usando collagenasi P (Roche , Monza , Italia ; 3

mg / ml) secondo il metodo di Gray [33].

Il tessuto venne fatto poi sedimentare su un gradiente discontinuo di Ficoll (Sigma Aldrich, Milano, Italia) di 1108, 1096, 1069, e 1037 g/cm³. Dopo centrifugazione 750g a 4°C per 18 minuti, furono ottenute le fasi 1096/1069 e 1069/1037 e dopo prelevate le isole al microscopio, in particolare quelle con diametro rispettivamente > 200nm e < 200nm. Per aumentare il grado di purezza, le cellule furono messe in coltura per 2 giorni a 37°C con il 5% di CO₂ in CMRL 1066 (Sigma aldrich, Milano Italia), arricchito con 10% FCS, ciò permise alle cellule esocrine di aderire alla fiasca.

Anche in questo caso, al fine di valutare la vitalità e la funzionalità di queste cellule endocrine dopo crioconservazione un'aliquota fu conservata (riducendo gradualmente la temperatura, prima del trasferimento in azoto liquido a -196°C) per 8 settimane usando DMSO al 10% (Sigma Aldrich, Milano, Italia).

La colorazione DTZ/DMSO fu usata nelle aliquote rimanenti per contare il campione fresco. Dal campione fresco fu inoltre valutata la vitalità e la resa cellulare attraverso la colorazione FDA/PI. Le isole furono contate come numero/g totale di tessuto e come equivalenti di isole/g di tessuto (IEq= 150 µm diametro del numero equivalente di isole).

L'attività cellulare fu valutata monitorando la produzione di insulina sotto stimolazione con basse e alte concentrazioni di glucosio. Infatti dopo i primi 2 giorni di coltura un'aliquota delle isole furono incubate con 2.8mM di glucosio in CMRL a 37°C e il 5% di CO₂, un'altra aliquota fu incubata con 25 mM di glucosio in RPMI

1640 (Sigma Aldrich, Milano Italia). I livelli d'insulina furono determinati con il kit immunoradiologico.

Per quanto riguarda le aliquote criopreservate per 8 settimane furono gradualmente scongelate e centrifugate in un gradiente discontinuo di percoll (1063 gr/cm³. Sigma Aldrich), al fine di rimuovere le cellule morte e/o i residui cellulari. Le cellule furono contate nuovamente con la colorazione DTZ/DMSO. La vitalità fu valutata anche in questo caso attraverso la colorazione FDA/PI e la funzionalità attraverso il kit immunoradiologico come fatto in precedenza.

Tutti gli altri dati furono espressi come media +/- SEM e i 2 gruppi furono comparati con il test χ^2 . Il valore $P < 0.05$ fu considerato significativo [38].

RISULTATI

I risultati ottenuti dagli esperimenti fatti nella prima fase del mio studio, mostrarono che le cellule cresciute lentamente durante le prime 2 settimane; 90% (885/984) di esse erano positive per CK-19. Dopo 3/4 settimane, le cellule formarono colonie aderenti a formare un monostrato con chiara morfologia epiteliale. Dopo 2 settimane di coltura senza glucosio (figura 7), il conteggio totale di cellule per CK-19+ erano 885/984 (90%), mentre 80/1114 (7,2%) erano positivi per insulina e 11/995 (1,1%) erano positivi per il glucagone.

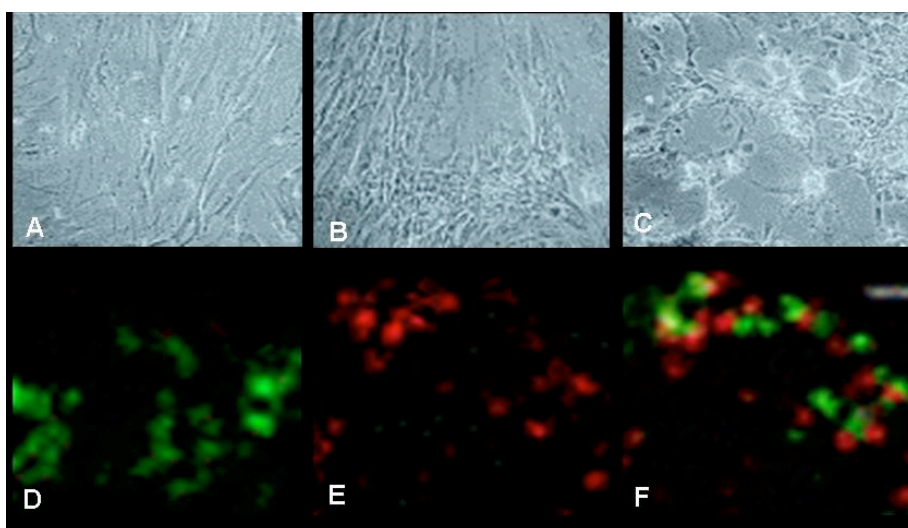


Figura 7: Cellule duttali dopo digestione con collagenasi (A); Monostrato di cellule duttali(B); differenziamento dopo 2 settimane in strutture tridimensionali (cisti) (C);Immunoistochimica dopo 2 settimane di coltura: cellule duttali CK-19 +(D),cellule Insulino+ (E) ; cellule insulino + e CK-19+(F)

Utilizzando una concentrazione di glucosio di 5,6 mmol/L, le cellule CK-19+ erano 765/1021 (75%) con 138/1109 (12,5%) di cellule insulina positive e 14/1092 (1,4%) glucagone positive. Nel mezzo contenente 17,8 mmol/L di glucosio, 526/1013 (52%) erano CK-19-positive, 200/996 (20,1%) di cellule insulina positive, e 31/987 (3,2%) glucagone positive. Quando la concentrazione di glucosio fu portata a 25 mmol/L di

glucosio, le cellule CK-19+ erano 243/1008 (24%); cellule insulino-positivo, 227/1058 (21,5%), e cellule glucagone-positivo, 28/1038 (2,7%). Il contenuto di insulina in campioni a 2 settimane di incubazione con 0 mmol/L di glucosio non era rilevabile, al contrario, con 5,6 mmol/L di glucosio, era $1,9 \pm 0,1$ ng/mL; e con 17,8 mmol/L di glucosio era di $2,8 \pm 0,3$ ng/mL e con 25 mmol/L di glucosio era $4,2 \pm 0,5$ ng/mL (Figura 8).

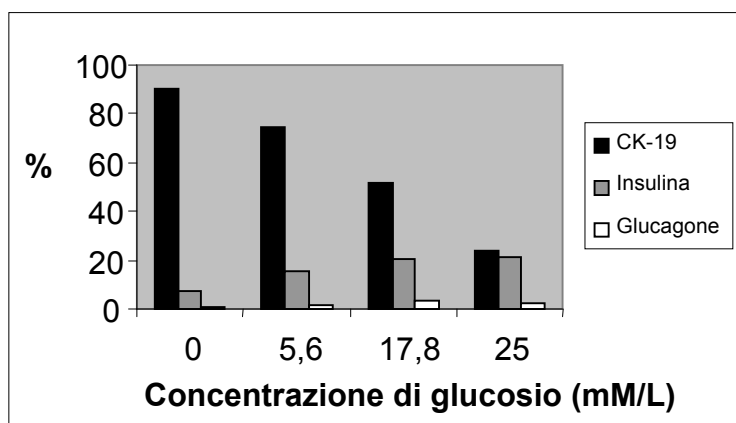


Figura 8: Percentuale delle cellule immunopositive in relazione alla concentrazione di glucosio nel medium

I risultati ottenuti nella seconda parte dei miei esperimenti, cioè utilizzando cellule ottenute dal pancreas in toto, mostrano (tabella 1 e Figura 1) che le cellule isolate non crioconservate CK-19+, insulina e glucagone positive, dopo 2 settimane di cultura a 5,6 mmol/L o 17,8 mmol/L di glucosio erano maggiori nel gruppo TLM rispetto gruppo UW (P <0,05) .

Concentrazione di glucosio		UW	TLM	P	UW post	TLM post	P
0 mM /L	CK-19+	903,5±20,11	885±33,67	Ns	628,8±26,1	665,8±32,4	Ns
	Insulin +	84±2,4	80,10±2,7	Ns	66,6±4,39	70,2±3,69	Ns
	Glucagon +	13,8±1,33	12,2±0,78	Ns	11,1±0,64	9,7±0,82	Ns
5,6 mM/L	CK-19+	724,9±39,76	890,2±57	<.05	609,1±22	667,7±27	Ns
	Insulin +	149,1±9,25	197,8±15,29	<.05	101,9±6,46	132,2±9,23	<.05
	Glucagon +	15,8±1,36	22,8±3,02	<.05	9,6±1	17,5±1,9	<.05
17,8 mM/L	CK-19 +	543,±27,11	470,2±10,5	<.05	435,1±13,8	404,6±20,7	Ns
	Insulin +	206,3±6,57	248,3±14,82	<.05	127,4±7,6	180,1±14	<.05
	Glucagon +	34,2±2,03	52,10±3,48	<.05	26,8±1,9	36,5±1,9	<.05
25 mM/L	CK-19 +	242,3±11,97	214,5±13,79	Ns	132,7±8,4	158,4±12,7	Ns
	Insulin +	240,7±6,47	279,1±19,86	Ns	167±9,7	205,1±4,76	<.05
	Glucagon +	28,20±1	30±2,04	Ns	21,2±0,91	22,3±0,97	Ns

Tabella 1: Cellule immunopositive a diverse concentrazioni di glucosio in coltura prima e dopo criopreservazione .
Dati espressi come media ± SEM.UW , University of Wisconsin solution; TLM, Two-layer method (UW/PFC solution)

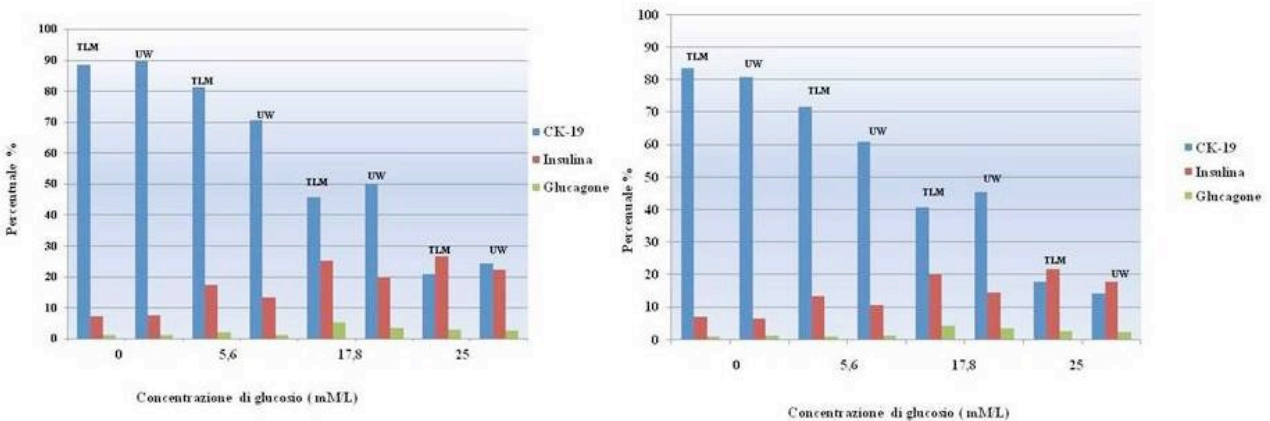


Figura 9: Percentuali di cellule immunopositive a differenti concentrazioni di glucosio
a) Dopo 2 settimane di coltura; b) dopo 8 settimane di criopreservazione

Colture mantenute con 0 mmol/L e 25 mmol/L di glucosio non hanno mostrato differenze significative (Figura 10) .

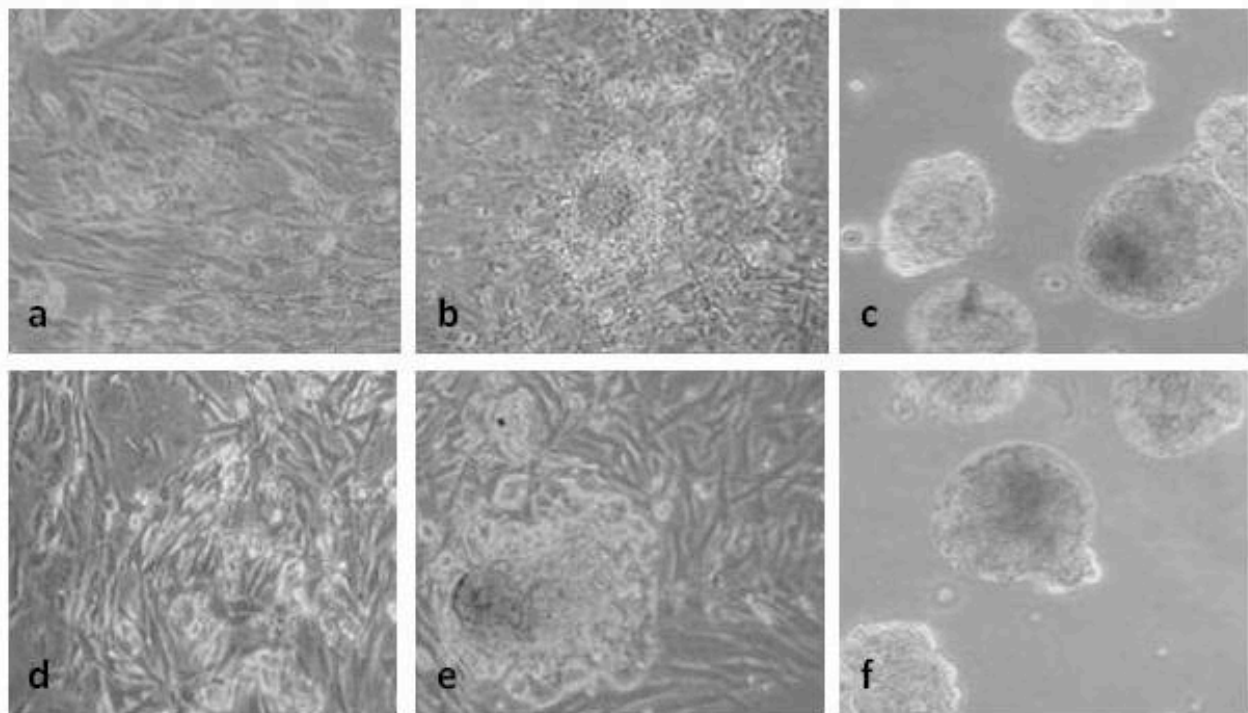


Figura 10: Differenziazione di cellule pancreatiche duttali in cellule beta simili a,b, c: cellule duttali a una settimana con conservazione del pancreas con soluzione UW. a) non aggregazione delle cellule duttali all'inizio della coltura senza glucosio, b) aggregati di cellule duttali dopo due settimane di coltura alla concentrazione di glucosio di 5,6 mM/l; c) aggregati di cellule duttali dopo due settimane di coltura alla concentrazione di glucosio di 5,6 mM/l;d, e, f : cellule duttali dopo una settimana con conservazione del pancreas con TLM d) non aggregazione delle cellule duttali all'inizio della coltura senza glucosio, e) aggregati di cellule duttali dopo due settimane di coltura alla concentrazione di glucosio di 5,6 mM/l;f) aggregati di cellule duttali dopo due settimane di coltura alla concentrazione di glucosio di 5,6 mM/l

A 8 settimane di crioconservazione (Tabella 1;Figura 9) c'era un maggior numero di cellule insulina e glucagone positive nel gruppo di cultura TLM rispetto al gruppo UW ad una concentrazione di glucosio di 5,6 e 17,8 mmol/L. Ad una concentrazione di glucosio di 25 mmol/L solo le cellule insulina positive hanno rivelato un valore maggiore ($P < 0.05$) nel gruppo TLM. Gli altri valori in entrambi i gruppi non presentano alcuna differenza. I dati relativi alla secrezione insulinica (Tabella 2) mostrano che dopo due settimane di coltura, le cellule incubate con concentrazioni di

glucosio di 17,8 e 25 mmol/L, rispettivamente presentavano valori più elevati nel gruppo TLM rispetto al gruppo UW.

Concentrazione di glucosio	Secrezione insulinica (SI) (ng/ml)					
	UW	TLM	P	UW post	TLM post	P
0 mM /L	Nd	Nd	-	Nd	Nd	-
5,6 mM/L	1,68 ±0,75	2,07±0,06	<.05	1,19±0,06	1,24±0,07	Ns
17,8 mM/L	2,4±0,11	3,54±0,07	<.05	1,81±0,09	2,8±0,13	<.05
25 mM/L	3,32±0,08	4,21±0,15	<.05	2,15±0,09	3,36±0,07	<.05

Tabella 2: Coltura a diverse concentrazioni di glucosio prima e dopo criopreservazione nei due differenti metodi di conservazione UW , University of Wisconsin solution; TLM, Two-layer method (UW/PFC solution). Valori espressi come media ± SEM.

A 5,6 mmol/L non vi era alcuna differenza tra i gruppi. A 0 mmol/L di glucosio i livelli di insulina non erano, anche in questo caso, rilevabili nel mezzo .

Dopo 8 settimane di crioconservazione il numero delle cellule era maggiore tra i campioni del gruppo TLM rispetto al gruppo di UW, per concentrazioni di glucosio di 17,8 e 25 mmol/L , rispettivamente. A 5,6 mmol/L non vi era alcuna differenza tra i gruppi. A 0 mmol / L di glucosio i livelli di insulina non erano rilevabili nel mezzo (Figura 11).

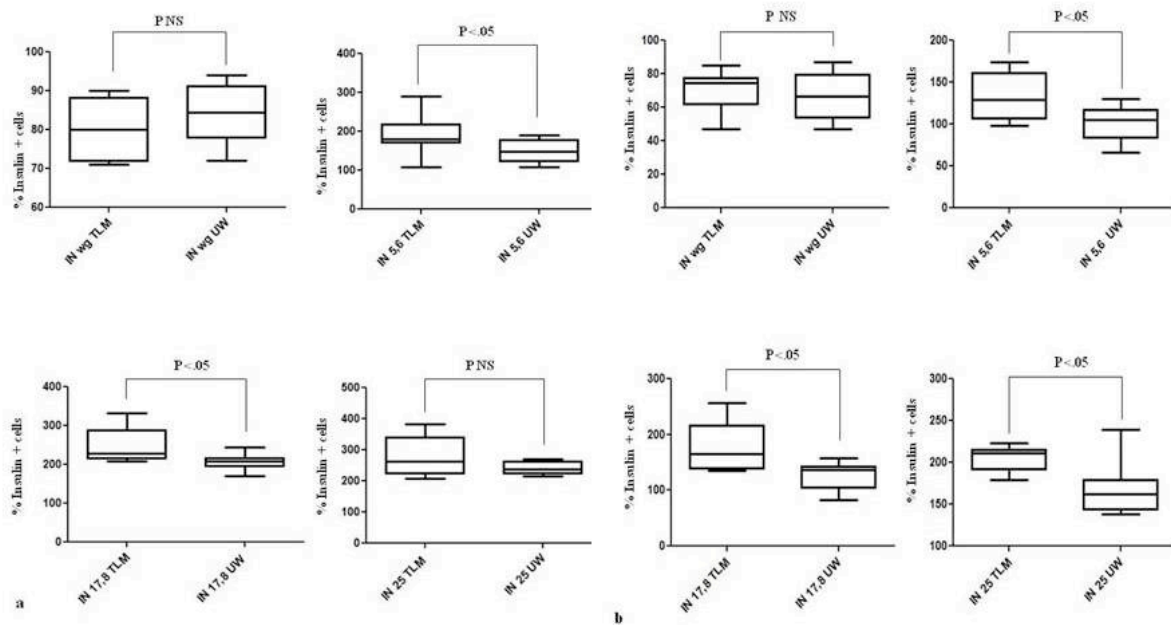


Figura11: Whisker- and- box plot: della percentuale cellule insulino + a diverse concentrazioni di glucosio in coltura prima (a) e dopo 8 settimane di crioconservazione(b) con due diversi metodi di conservazione.

I risultati ottenuti dal prelievo di cellule β , non mostrano differenze significative in numero, nel gruppo TLM (tabella 3), prima e dopo crioconservazione (3570 \pm 147 nel gruppo UW rispetto alle 5620 \pm 203 nel gruppo TLM e dopo crioconservazione 2676 \pm 205 nel gruppo UW rispetto 4776 \pm 234 nel gruppo TLM; $p < 0.0001$);

Dati	UW	TLM	P
N Pancreas	10	10	ns
Età (m) (range)	12-18	12-18	ns
Peso Kg (media \pm SEM)	120 \pm 40	120 \pm 40	ns
Peso pancreas gr (media \pm SEM)	81 \pm 8	85 \pm 9	ns
WIT (min) (media \pm SEM)	15.6 \pm 0.3	14.09 \pm 0.4	ns
CIT (h) (media \pm SEM)	4 \pm 0.2	3.9 \pm 0.3	ns
CT (w) (media \pm SEM)	8 \pm 1	8 \pm 1	ns
TNI/gr (media \pm SEM)	3570 \pm 147,66	5620 \pm 203,84	<.0001
TNI/gr (media \pm SEM) <i>dopo crioconservazione</i>	2676 \pm 205,27	4776 \pm 234,89	<.0001
IEq/gr (media \pm SEM)	3550 \pm 176,84	5520 \pm 203,88	<.0001
IEq/gr (media \pm SEM) <i>dopo crioconservazione</i>	2462 \pm 139,71	4692 \pm 173,99	<.0001
Quota rimanente dopo crioconservazione	0,66	0,86	-
Purezza (%) (media \pm SEM)	75 \pm 1,29	77 \pm 1,74	ns
Purezza (%) (media \pm SEM) <i>dopo crioconservazione</i>	72 \pm 1,44	74,1 \pm 1,45	ns
Vitalità (%) (media \pm SEM)	83 \pm 1,49	88 \pm 1,85	ns
Vitalità (%) (media \pm SEM) <i>dopo crioconservazione</i>	74 \pm 1,29	84 \pm 1,39	ns
SI (media \pm SEM)	2.05 \pm 0,13	2.5 \pm 0,16	<.05
SI (media \pm SEM) <i>dopo crioconservazione</i>	1.78 \pm 0.14	2.40 \pm 0.23	<.05

Tabella 3: Caratteristiche dei donatori e risultati dopo isolamento

UW, University of Wisconsin Solution; TLM, Two Layer Metod (UW/PFC solution); WIT, Tempo di ischemia calda; CIT, Tempo di ischemia fredda; CT, Tempo di crioconservazione; TNI, Totale di n. di isole per grammo di pancreas; IEq/gr, Totale di isole equivalenti per grammo di pancreas; SI, Indice di stimolazione insulinica; ns, statisticamente non significativo

il valore IEq/gr era significativamente più alto nel gruppo TLM, prima e dopo crioconservazione (3350 \pm 176 nel gruppo UW contro le 5520 \pm 203 nel gruppo TLM e dopo crioconservazione 2462 \pm 139 nel gruppo UW contro le 4692 \pm 173 nel gruppo TLM; $p < 0.0001$ valutato con il test χ^2). La purezza e la vitalità cellulare, prima e dopo crioconservazione, non mostrarono differenze significative (purezza 75 \pm 1.2 nel gruppo UW contro 77 \pm 1.77 nel gruppo TLM prima della crioconservazione e 72 \pm 1.4

nel gruppo UW contro 74 ± 1.4 nel gruppo TLM dopo crioconservazione; (p =non significativa); la vitalità mostra un valore di 83 ± 1.4 nel gruppo UW rispetto 88 ± 1.8 prima del crioconservazione, e 74 ± 1.2 nel gruppo UW rispetto 84 ± 1.3 nel gruppo TLM dopo crioconservazione; (p =n.s. valutata con il test di Student). La secrezione di insulina in risposta alla stimolazione con basse ed alte concentrazioni di glucosio, prima e dopo crioconservazione, furono significativamente più alte nel gruppo TLM (2.05 ± 0.13 nel gruppo UW rispetto 2.5 ± 0.16 nel gruppo TLM, e dopo crioconservazione furono 1.78 ± 0.14 nel gruppo UW rispetto 2.40 ± 0.23 nel gruppo TLM; $p < 0.05$ dato ottenuto dal test χ^2 (Tabella 3), i rispettivi risultati sono mostrati in (Figura 12).

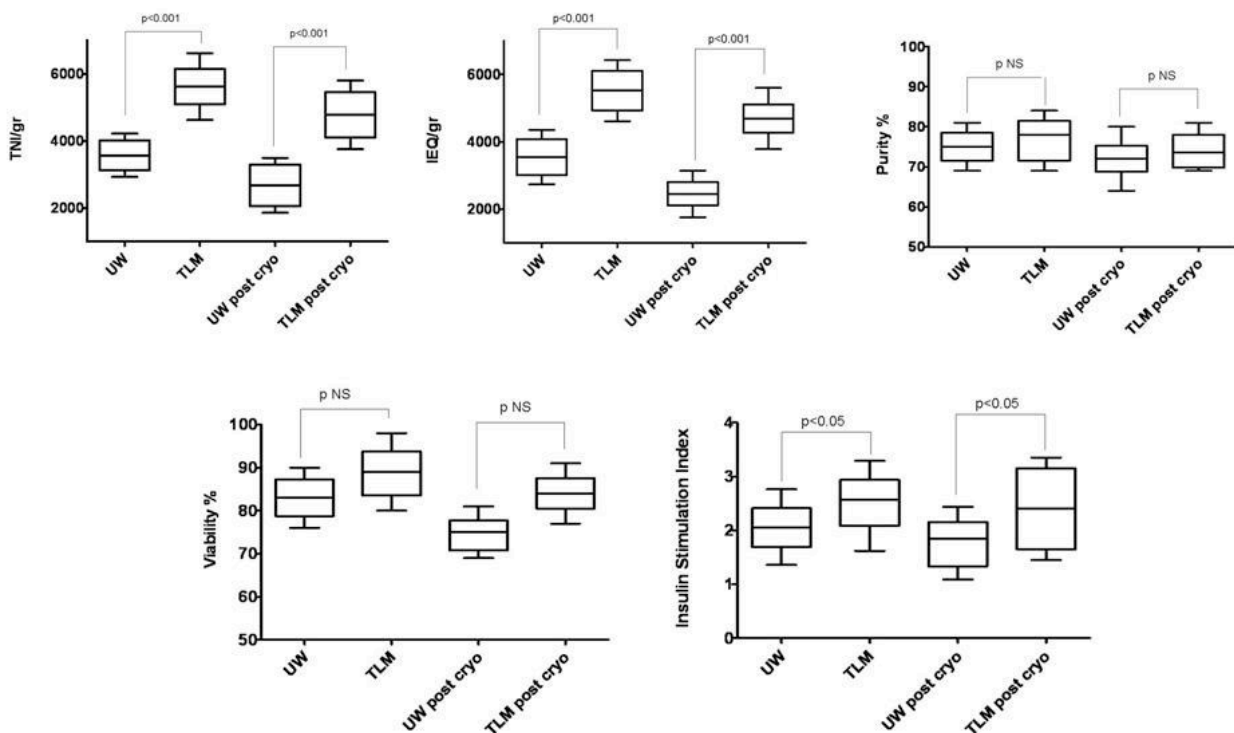


Figura 12: Whisker- and- box plot: Numero totale di insule (TNI)/g; Equivalente di isole (IEq)/g; Purezza, Vitalità e Indice di Stimolazione insulinica con UW solution e con TLM solution.

Le sezioni di tessuto pancreatico dopo 240 minuti di incubazione in soluzione di conservazione sono mostrati in figura 13, e in figura 14.

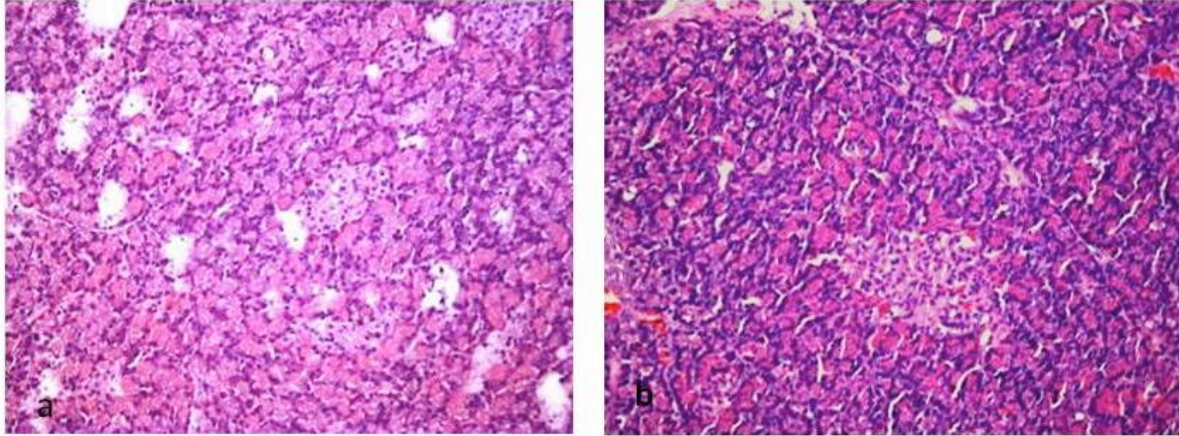


Figura 13: Sezioni di tessuto pancreatico (Ematossilina-eosina 20x) dopo conservazione con UW soluzione (a) e TLM solution (b)

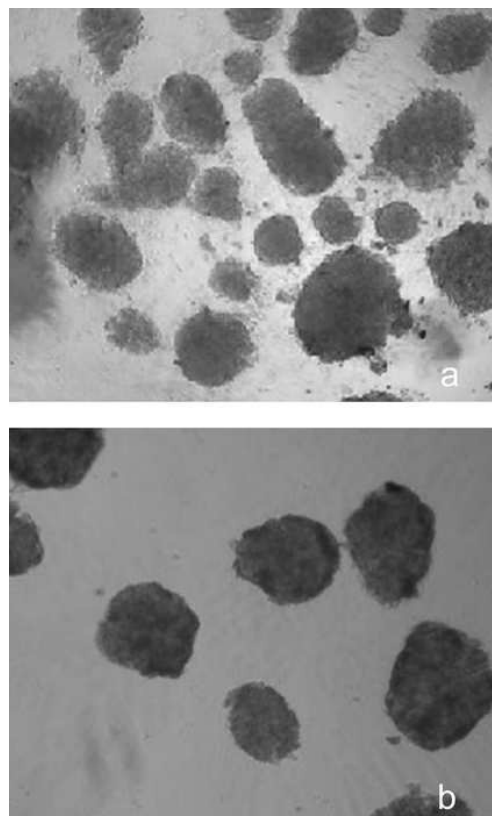


Figura 14: Insule isolate dopo 240 min con conservazione con soluzione UW (a) e con TLM (b) e colorate con DTZ

Discussione

Sebbene il trapianto di pancreas rappresenti un valido aiuto per la terapia insulinica nel diabete di tipo I, i risultati clinici mostrano grande difficoltà nella gestione del paziente. I problemi principali sono la scarsa disponibilità di organi, la bassa quantità di tessuto insulare recuperata, e la scelta della terapia immunosoppressiva ottimale. In passato la scarsa disponibilità di pancreas ha indotto gli scienziati a scegliere il modello suino al fine di ottenere tessuto produttore di insulina strutturalmente affine con l'insulina umana.

Quando le cellule duttali del pancreas sono poste su un substrato di matrice extracellulare, sono in grado di differenziare in strutture tridimensionali insulari-simili. Questi dati hanno confermato l'ipotesi che le cellule duttali hanno in vitro il potenziale di perdere il loro specifico fenotipo, tornando ad essere cellule multipotenti capaci di differenziarsi in cellule produttrici di insulina sotto l'influenza di opportuni fattori esogeni. È stato possibile quindi indirizzare queste cellule verso un fenotipo capace di produrre insulina e glucagone.

La capacità di mettere in coltura isolotti provenienti dalle cellule duttali pancreatiche apre un nuovo approccio per la terapia con cellule β in animali da sperimentazione.

Si è cercato di ottenere cellule produttrici di insulina, da elementi isolati mediante dissezione microchirurgica del dotto di Wirsung suino senza dover utilizzare, in prima battuta, l'intero pancreas. È stato possibile ripetere più volte il protocollo,

grazie all'abbondanza di pancreas. Tuttavia, vi è stata una notevole difficoltà di ottenere campioni in condizioni sterili che hanno richiesto l'uso di abbondanti quantità di farmaci antisettici e antimicotici. Nel nostro studio, avendo isolato e selezionato cellule in presenza di Matrigel con siero e in assenza di glucosio, utilizzando il fattore di crescita dei cheratinociti e la nicotinamide, è stato possibile ottenere strutture tridimensionali. È stato possibile dimostrare che l'aumento della concentrazione di glucosio nei terreni di coltura (a 17,8 mmol/L) porta a un ridotto numero di cellule CK-19+, ma un aumento del numero di cellule producenti insulina e glucagone, come in precedenza riportato. Sebbene limitati, questi primi risultati forniscono comunque una base per l'espansione e la differenziazione di questi elementi[39].

Per quanto riguarda la seconda parte della sperimentazione, con il pancreas in toto, pensata dopo i dati ottenuti dalle cellule duttali, furono utilizzate diverse soluzioni di perfusione in modo da individuare quale potesse essere la più efficace ed efficiente nella conservazione degli organi, sia per la coltivazione immediata sia dopo crioconservazione. Quello che emerge è che la conservazione con TLM dà migliori risultati nell'ottenimento di isolotti di Langherans rispetto alla soluzione UW [32]. Si è cercato di verificare se TLM confrontata con la UW, migliorasse la capacità delle cellule esocrine di diventare β -simili producenti insulina [31,40].

Abbiamo ottenuto un maggior numero di cellule β -like producenti insulina dopo conservazione in TLM, in coltura con 5,6 o 17,8 mmol / L e 25 mmol / L di glucosio. Allo stesso modo, la secrezione di insulina è stata maggiore in cellule ottenute dal

gruppo-TLM rispetto al gruppo UW, anche dopo 8 settimane di crioconservazione (Tabella 1 e Tabella 2 e fig. 9 e fig. 11) .

Da questi risultati è possibile dedurre che il “Two Layer Method” potrebbe essere il candidato per ottenere una procedura standard per raccogliere le cellule pancreatiche a scopo di ricerca nel campo della medicina rigenerativa.

Anche nella terza fase dello studio, per il prelievo delle cellule β da pancreas suino, la TLM si è dimostrata migliore rispetto all’UW, in quanto fu in grado di ridurre i danni cellulari da ischemia, di aumentare il numero e migliorare la qualità delle isole ottenute da pancreas dopo prelievo, e di migliorare la vitalità a lungo termine dopo 8 settimane di crioconservazione, e la secrezione insulinica. Questa grande efficacia del TLM riscontrata in entrambe le fasi sperimentali è da attribuire alla presenza del Perfluorocarbonato; esso è in grado di ossigenare l’organo e di mantenere alta la concentrazione di ATP in modo da rifornire le pompe cellulari e quindi di garantire l’integrità cellulare [38].

CONCLUSIONI

Nonostante il trapianto di pancreas in toto rappresenti una valida alternativa alla convenzionale somministrazione di insulina nel trattamento del diabete di tipo I , l'applicazione clinica di tale terapia risulta ancora a tutt'oggi di difficile gestione.

I principali problemi sono: la scarsa disponibilità degli organi, la scarsa quantità di tessuto insulare ottenibile in grado di ristabilire l'omeostasi glicemica. Già in passato la ridotta disponibilità di pancreas ha indotto i ricercatori a scegliere il maiale per ottenere tessuto insulare per le affinità biochimiche con l'insulina umana.

Questo studio sperimentale effettuato su animali di media taglia ha avuto in primo luogo lo scopo di dimostrare la capacità di coltivare in vitro isole da digesto di cellule staminali duttali di suino, come nuovo approccio per la terapia β -cellulare inoltre è servito ad affinare la tecnica di prelievo di pancreas e la successiva microdissezione del dotto senza dover ricorrere al prelievo di pancreas in toto.

La limitazione nell'ottenimento di un numero esiguo di cellule produttrici insulina e i buoni risultati ottenuti nella fase preliminare dello studio, ci ha indotti ad utilizzare come fonte di cellule staminali non le cellule del dotto di Wirsung ma i duttolociti presenti in tutta la ghiandola .A tal proposito abbiamo potuto dimostrare che il danno

da ischemia può essere minimizzato con l'ossigenazione degli organi durante l'ischemia fredda mediante la conservazione con TWL (UW/PFC solution).

Dall'analisi dei risultati si evince la superiorità della conservazione con TLM rispetto alla classica conservazione con UW nell'ottenere un maggior numero di cellule endocrine ed esocrine vitali di pancreas di maiale dopo exanguinatio dell'animale e anche dopo 8 settimane di criopreservazione, al fine di utilizzare tali risultati per studi sulla capacità di transdifferenziamento, resistenza cellulare e crescita e senescenza delle cellule pancreatiche.

Pertanto questo studio sperimentale si propone di dare un importante contributo alla ricerca sulla medicina rigenerativa, dando una spinta innovativa che ben si inserisce in una prospettiva di ricerca più ampia al passo con l'attuale sperimentazione internazionale, in quanto la successiva coltivazione in vitro di cellule staminali purificate ed ottenute con le tecniche già descritte, indotte alla differenziazione in cellule- β simili e poi sottoposte ad adeguati stimoli chimici per produrre insulina, porterebbe in un prossimo futuro ad un importante risvolto clinico risolvendo, in primo luogo l'annoso problema della scarsa disponibilità di organi, in quanto tale tecnica applicata su tessuto pancreatico umano (prelievo endoscopico o laparoscopico di tessuto pancreatico dello stesso paziente diabetico) fornirebbe cellule produttrici di insulina prive di connotazioni immunologiche risolvendo i problemi legati al rigetto .

Bibliografia

1. Eurodiab Study Group: *Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe*, Lancet 355:873-6, 2001
2. Unger RH, Foster DW: *Diabetes mellitus. Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: WB Saunders Co. 1998, 973-1059
3. National Diabetes Data Group: *Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance*. Diabetes 1979, 28: 1039-574.
4. World Health Organization. *The World Health Report 1997: conquering suffering, enriching humanity*. Geneva, Switzerland, 1997
5. Irvine WJ, Gray RS, McCallum CJ, Duncan LJP: *Clinical and pathogenic significance of pancreatic-islet-cell antibodies in diabetics treated with oral hypoglycemic agents*. Lancet 1:1025–1027, 1977
6. Zimmet PZ: *The pathogenesis and prevention of diabetes in adults: genes, autoimmunity, and demography*. Diabetes Care 18:1050–1064, 1994
7. Tuomilehto J., Virtala E., Karvonen M., Lounamaa R., Pitkaeniemi J., Reunanen A., Tuomilehto-Wolf E., Toivanen L. and the DIME Study Group: *Increase in incidence of insulin-dependent diabetes mellitus among children in Finland*. Inter J Epidemiol 24: 984-992 (1995)
8. Songini, M.: *Diabete di tipo I in Sardegna*. Aggior Med. 21: 27-33 (1997)
9. EURODIAB ACE Study Group: *Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe*. Lancet 355:873–876, 2000.

- 10.** Karvonen M.J., Tuomilehto I., Libman R.E., for the World Health Organization DIAMOND Project Group: *A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus.* Diabetologia 36: 883-892 (1993).
- 11.** Cerutti F., Cavallo F., De Donno V., Sacchetti C. : *IDDM incidence in children 0-14 years of age in Piedmont, Italy.* Diabetes Care 17: 1233 (1994).
- 12.** Aktinson M.A., MacLaren N.K.: *The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus.* N Engl J Med 331:1428–1436, 1994
- 13.** Navalesi R.: *Diabete ed assistenza sanitaria: presente e futuro.* Il diabete 1998, 10:135-53
- 14.** Karvonen M., Tuomilehto J., Libman I.: *For the World Health Organization DiaMond Project Group. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type I (insulin- dependent) diabetes mellitus.* Diabetologia 1993, 36: 883-92.
- 15.** Navalesi R.: *Diabete ed assistenza sanitaria: presente e futuro.* Il diabete 1998, 10:135-53.
- 16.** Muggeo M., Verlato G., Bonora E.: *A population based survey on known diabetes mellitus prevalence and 5-yr all cause mortality.* Diabetologia 1995, 38: 318-2
R. Tisch, H. Mc Devitt: *Insulin dependent diabetes mellitus.* Cell 1996, 85: 291-7.
- 17.** Tisch R., Mc Devitt H. : *Insulin dependent diabetes mellitus.* Cell 1996, 85: 291-7.
- 18.** Nepom G. T.: *Class II antigens and disease susceptibility.* Ann Rev Med 1995, 46: 17-25

19. Karvonen M., Tuomilehto J., Libman I.: *For the World Health Organization DiaMond Project Group. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type I (insulin-dependent) diabetes mellitus.* Diabetologia 1993, 36: 883-92
20. Tuomi T., Carlsson Å., Li H., Isomaa B., Miettinen A., Nilsson A., Nisse' M., Ehrnstrom B., Forsen B., Snickars B., Lahti K., Forsblom C., Saloranta C., Taskinen M., Groop L.: *Clinical and genetic characteristics of type 2 diabetes with and without GAD antibodies.* Diabetes 48:150–157, 1999
21. Cavallo M. G., Fava D., Monetini L.: *Cell-mediated immune response to beta-casein in recent-onset insulin-dependent diabetes: implication for disease pathogenesis.* Lancet 1996, 348: 926-8.
22. Shehadeh N., Shamir R., Berant M., Etzioni A.: *Insulin in human milk and the prevention of type I diabetes.* Pediatr Diabetes 2:175-7, 2001
23. Christie M.J.: *Living with asthma: Contemporary perspectives – an editorial review.* In *Assessment of quality of life in childhood asthma.* Edited by: Christie MJ and French DJ. Chur, Switzerland, Harwood Academic Publishers; 1994
24. Eiser C., Morse R.: *A review of measures of quality of life for children with chronic illness.* Arch Dis Child 2001, 84:205-211
25. Spooner B.S., Walther B.T., Rutter W.J.: *The development of the dorsal and ventral mammalian pancreas in vivo and in vitro.* J Cell Biol 1970, 47: 235–246
26. Golosow N., Grobstein C.: *Epitheliomesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis.* Dev Biol 1962, 4: 242–255

27. Tuch B. E., Madrid J. C., Summers E., Smith M. S.: *Production and characterization of fetal sheep pancreatic islet-like cell cluster*. Cell Transplant July 1996, 5: 491-498.
28. Standring S. Anatomia del Gray. Le basi anatomiche per la pratica clinica. Ed.40, Elsevier.2009.
29. Halban P.A.: Cellular sources of new pancreatic β -cells and therapeutic implications for regenerative medicine. Nat Cell Biol 6:1021, 2004
30. Demers G., Griffin G., De Vroey G., et al: Harmonization of animal care and use guidance. Science 312:700, 2006
31. Gioviale M.C., Damiano G., Montalto G., et al: Isolation and culture of β -like cells from porcine wirsung duct. Transplant Proc 41:1363, 2009
32. Matsumoto S., Rigley T.H., Qualley S.A. et al.: Efficacy of the oxygen-charged static two layer method for short term pancreas preservation and islet isolation from non human primate pancreata. Cell transplant 11-08 769-77 2002
33. Gray D.W., McShane P., Grant A., et al: A method for isolation of islets of Langerhans from the human pancreas. Diabetes 33:1055, 1984.
- 34.15. Rajotte RV: Islet cryopreservation protocols. Ann N Y Acad Sci 875:200, 1999
- 35.16. Gatto C., Callegari M., Folin M., et al: Effects of cryopreservation and coculture with pancreatic ductal epithelial cells on insulin secretion from human pancreatic islets. Int J Mol Med 12:851, 2003
36. Piemonti L., Bertuzzi F., Nano R., et al: Effects of cryopreservation on in vitro and in vivo long-term function of human islets. Transplantation 68:655, 1999
37. Gioviale M.C., Damiano G., Cacciabaudo F., Palumbo D.V. et al.: A good Breath

of Oxygen for Beta-like cells obtained from porcine exocrine pancreatic tissue. Transplantation Proceeding 43, 1173-1177. 2011.

38. Gioviale M.C., Damiano G., Palumbo V.D., Cacciabaudo F.: Pancreatic islets from non-heart-beating donor pig: two-layer preservation method in an in vitro porcine model. Int.J.artif Organs. 34-6 519-25 2011.
39. Piper K, Ball SG, Keeling JW, et al: Novel SOX9 expression during human pancreas development correlates to abnormalities in Campomelic dysplasia. Mech Dev 116:223, 2002
40. Bonner-Weir S., Taneja M., Weir G.C., et al: In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. Proc Natl Acad Sci 97:7999, 2000