

Ricerca

Impiego di Phosphorus 30CH nella terapia della fibrosi epatica sperimentale del ratto

C.A. Palmerini, M. Codini e A. Floridi

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche dell'Università di Perugia

P. Mattoli, S. Buffetti e E. Di Leginio

FIAMO Federazione Italiana delle Associazioni e dei Medici Omeopatici Sez Umbria – Comitato scientifico

Introduzione

La fibrosi epatica caratterizza non solo la cirrosi, ma anche, in misura variabile, ogni forma di malattia epatica cronica. Essa svolge un ruolo fondamentale nella progressione di tali malattie ed è la causa della maggioranza delle loro conseguenze. La fibrosi epatica è caratterizzata da un abnorme aumento di tessuto connettivo del fegato. La fibrogenesi è causata da numerosi tipi cellulari: fibroblasti, miofibroblasti (1,2), lipociti perisinusoidali (3,4).

In corso di fibrosi aumenta nel fegato il contenuto di tutte le componenti connettivali: glicosaminoglicani (5), fibronectina (6), laminino (6), fibre elastiche (7) ed infine il collagene, al quale si è rivolta la maggiore attenzione. Infatti mentre il fegato umano normale contiene circa 5mg di collagene per grammo di tessuto, nella fibrosi epatica, e più ancora nella cirrosi epatica, tale contenuto aumenta fino a 7 volte (8). In considerazione quindi dell'importante ruolo che la fibrosi ha nell'avanzamento delle malattie epatiche croniche, appare evidente il valore della individuazione di molecole attive che possano diminuire la deposizione di collagene a livello epatico o anche stimolare i processi di degradazione di questa molecola connettivale, per poterle efficacemente impiegare nella terapia antifibrotica nell'uomo. Attualmente per la fibrosi del fegato, non vi è uno schema terapeutico preciso. Tra le varie molecole che sono state proposte e valutate sperimentalmente a questo fine, solo la Colchicina ha dimostrato un rilevante effetto antifibrotico. I risultati di ricerche su animali e trials clinici dimostrano che questo farmaco può favorevolmente migliorare l'andamento della malattia fibrotica cronica, interferendo con la produzione di collagene e stimolando l'attività collagenasica del fegato. L'utilizzazione terapeutica della Colchicina nell'uomo, però può essere fatta solo a dosi che non superino 1-1,2 mg/die a causa dei seri effetti collaterali provocati dalla tossicità del farmaco: per questo l'efficacia del trattamento non può essere mai ottimale. Rimane dunque aperto il problema di un adeguato trattamento dei pazienti aventi una fibrosi epatica attiva e, ancor più, con cirrosi epatica il cui esito è tutt'ora infausto.

In questo studio si è voluto prendere in considerazione come agente terapeutico il Fosforo, che viene già da tempo utilizzato nella pratica clinica omeopatica per terapia di alcune sindromi patologiche, fra le quali anche le epatiti acute e croniche e la cirrosi (9). In particolare si è utilizzato Phosphorus 30 CH: il fosforo bianco diluito 30 volte 1:100.

Parte sperimentale

Materiali e Metodi

Sostanze chimiche

Tutte le sostanze chimiche e i solventi per HPLC, usati in questo lavoro, sono prodotti in grado analitico o di grado HPLC.

Animali

Sono stati utilizzati per ogni sperimentazione, ripetuta per tre volte, 50 ratti maschi Sprague Dawley (Charles River) con un peso iniziale di 200g. Gli animali sono stati divisi in 4 gruppi ciascuno dei quali è stato trattato secondo la procedura seguente:

Gruppo A: il primo gruppo di 10 animali è stato usato come controllo; a ciascun animale sono stati inoculati intraperitoneo 0,85 ml di olio minerale 3 volte in una settimana per 7 settimane;

Gruppo B: il secondo gruppo di 15 animali è stato reso cirrotico mediante iniezione intraperitoneale di 0,15ml di tetracloruro di carbonio in 0,85ml di olio minerale, 3 volte alla settimana per 7 settimane;

Gruppo C: il terzo gruppo di 15 animali è stato trattato come il gruppo B, ma con l'aggiunta per ciascun soggetto di 100 ul di Phosphorus 30 CH (Boiron) mediante iniezione per vena caudale;

Gruppo D: il quarto gruppo di 10 animali è stato trattato come il gruppo B, ricevendo ciascun animale Colchicina (0,4 mg/kg peso corporeo) in soluzione acquosa per via endovenosa.

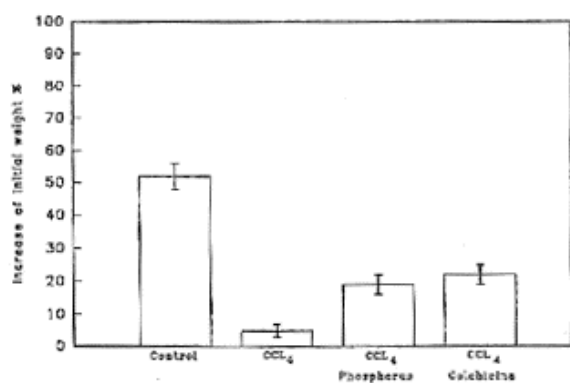


Fig. 1. L'aumento percentuale in peso alla fine della sperimentazione rispetto al peso iniziale per ciascun gruppo

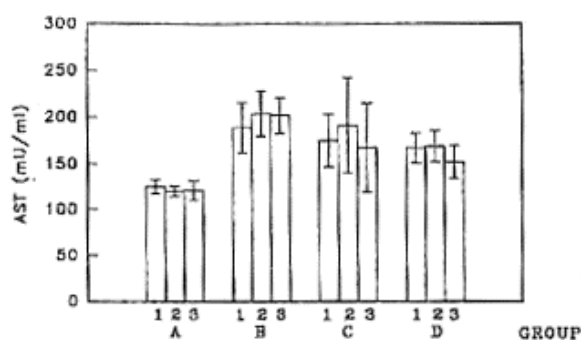


Fig. 3a. I livelli dell'aspartato aminotrasferasi (AST).

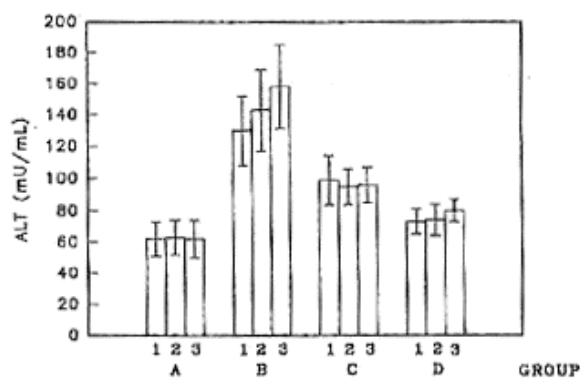


Fig. 3b. I livelli dell'alanina aminotrasferasi (ALT).

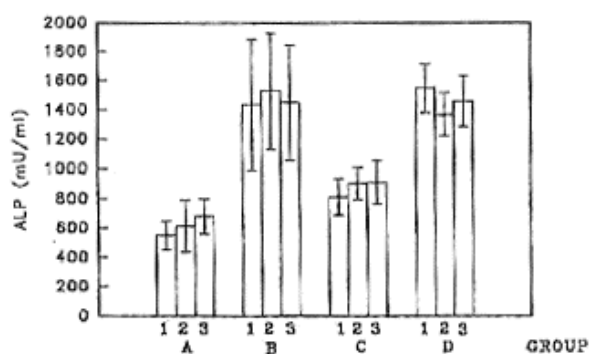


Fig. 3c. I livelli della fosfatasi alcalina (ALP).

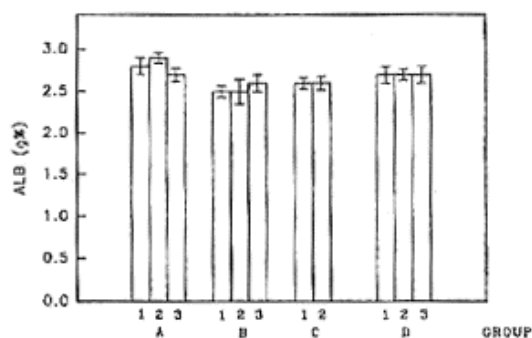


Fig. 3d. I livelli dell'albumina (ALB).

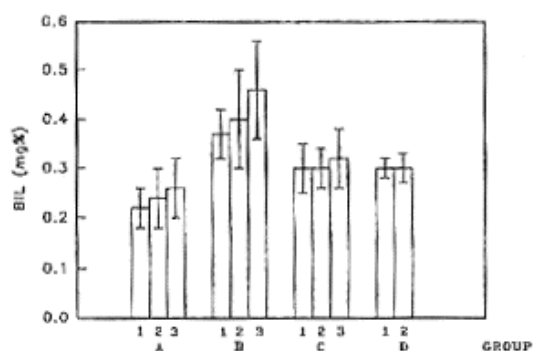


Fig. 3e. I livelli della bilirubina (BIL).

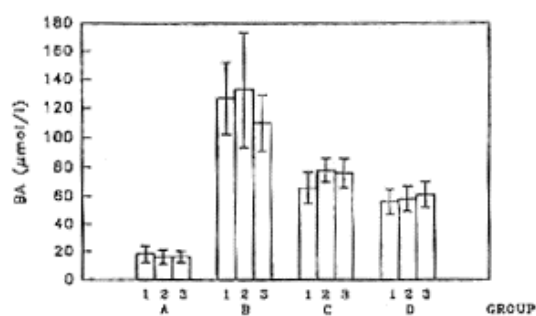


Fig. 3f. I livelli degli acidi biliari (BA).

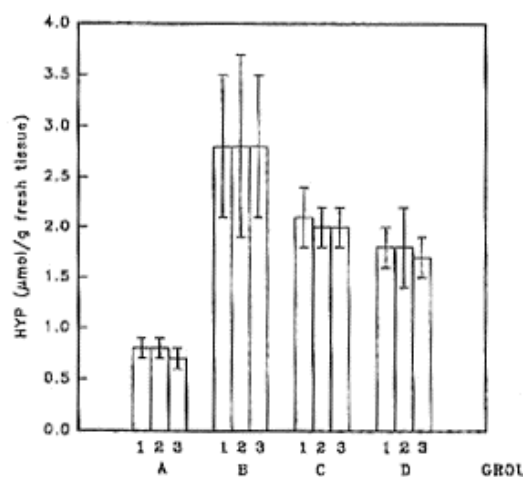


Fig. 4. I livelli di idrossiprolina legata al collagene.

Prima di essere sacrificati, gli animali sono stati anestetizzati e campionati di sangue sono stati prelevati mediante puntura cardiaca; la coagulazione è stata effettuata a temperatura ambiente per 2 ore ed il siero ottenuto per centrifugazione è stato utilizzato immediatamente per le prove biochimiche dei parametri ematici. I ratti sono quindi stati sacrificati per decapitazione e campionati di fegato sono stati prelevati per prove morfologiche e biochimiche.

Parametri Ematici

Dei campioni di siero sono stati utilizzati per la misurazione dei seguenti parametri ematici: albumina, bilirubina, fosfatasi alcalina e transaminasi (aspartato aminotrasferasi: AST e alanina aminotrasferasi: ALT). Sono stati utilizzati kit analitici forniti dalla Sigma Chemical Company. Gli acidi biliari sono stati dosati utilizzando il kit della ditta Nyegaard Diagnostica, Norway.

Istologia epatica

Campioni del lobo destro del fegato sono stati fissati in formalina al 10% in tampone fosfato e sezioni paraffinate sono state colorate con ematossilina ed eosina, ed impregnate con argento, secondo il metodo Van Gieson.

Determinazione di idrossiprolina legata al collagene

Campioni di 2gr di ciascun fegato sono stati omogeneizzati in acqua distillata (1:3 p/v). Le proteine sono state precipitate aggiungendo 2ml di acido perclorico (PCA) al 20% (p/v) all'omogenato. Dopo 10 minuti a 4°C, l'intero omogenato è stato trasferito in un tubo da centrifuga e centrifugato a 9000xg per 15 minuti a 4°C. Il sopranatante è stato scartato e il precipitato è stato usato per la determinazione dell'idrossiprolina legata al collagene secondo la procedura di HPLC descritta in precedenza (10). L'idrossiprolina legata al collagene è espressa come $\mu\text{mol/g}$ di fegato (tessuto fresco).

Analisi statistiche

I risultati delle analisi biochimiche sono stati valutati statisticamente mediante il test di Student.

RISULTATI

Animali

Durante gli esperimenti non c'è stata mortalità nei gruppi di controllo, mentre nel gruppo B2 due animali sono morti nel primo e nel secondo esperimento e tre animali nel terzo esperimento; nei gruppi di animali trattati con Colchicina e Phosphorus 30CH, un soggetto per ciascun gruppo è morto.

L'aumento percentuale in peso alla fine della sperimentazione rispetto al peso iniziale per ciascun gruppo è riportato in fig. 1 (media di tre esperimenti). La crescita si è quasi totalmente arrestata nei ratti trattati con solo CCl₄ mentre gli animali trattati anche con Colchicina e Phosphorus 30 CH hanno aumentato il loro peso iniziale del 22% e del 19% rispettivamente, a fronte di un 52% dei controlli.

Istologia Epatica

Le sezioni di fegato di animali cirrotici (fig.2B) mostrano ben evidenti tessuti necrotici, soprattutto centrolobulari, con steatosi nel parenchima circostante. Si è notato un attivo processo fibrotico intralobulare ed anche ampi setti di tessuto connettivo collegati l'uno all'altro che li circondavano e noduli rigenerativi di varia grandezza. Il quadro istologico è apparso alterato sia nelle sezioni di fegato animali trattati anche con Phosphorus 30 CH (fig. 2C) che con la Colchicina (fig 2D); entrambi i fegati hanno mostrato alterazioni ridotte dell'architettura del parenchima con setti fibrosi

poco consistenti e generalmente incompleti. La situazione istologica in questi due gruppi di animali era molto simile a quella del gruppo di controllo (fig. 2A)

TAB. 1 Parametri serici di funzionalità epatica. ALB: Albumina (g%); AST: aspartato aminotrasferasi (mU/ml); ALT: alaninaaminotrasferasi (mU/ml); BIL: bilirubina (mg%); ALP: fosfatasi alcalina (mU/ml); BA: acidi biliari (umol/L).

		GRUPPO A	GRUPPO B	GRUPPO C	GRUPPO D
ALB	1.	2.8 = 0.1	2.5 = 0.07	2.6 = 0.07	2.7 = 0.10
	2.	2.9 = 0.06	2.5 = 0.15	2.6 = 0.08	2.7 = 0.07
	3.	2.7 = 0.08	2.6 = 0.08	-----	2.7 = 0.10
AST	1.	125 = 8	189 = 27	175 = 28	67 = 16
	2.	120 = 6	204 = 24	191 = 51	169 = 17
	3.	121 = 11	202 = 19	167 = 48	152 = 18
ALT	1.	62 = 11	130 = 22	99 = 15	73 = 8
	2.	63 = 11	143 = 26	95 = 11	74 = 10
	3.	62 = 12	158 = 27	96 = 11	80 = 7
BIL	1.	0.22 = 0.04	0.37 = 0.05	0.30 = 0.05	0.30 = 0.02
	2.	0.24 = 0.06	0.40 = 0.1	0.30 = 0.04	0.30 = 0.03
	3.	0.26 = 0.06	0.46 = 0.1	0.32 = 0.06	-----
ALP	1.	549 = 100	1436 = 447	811 = 122	546 = 167
	2.	613 = 178	1530 = 399	00 = 107	1364 = 148
	3.	680 = 121	1449 = 395	909 = 145	1457 = 174
BA	1.	18 = 6	127 = 25	66 = 11	56 = 9
	2.	16 = 5	133 = 40	78 = 8	58 = 9
	3.	16 = 4	110 = 19	76 = 10	61 = 9

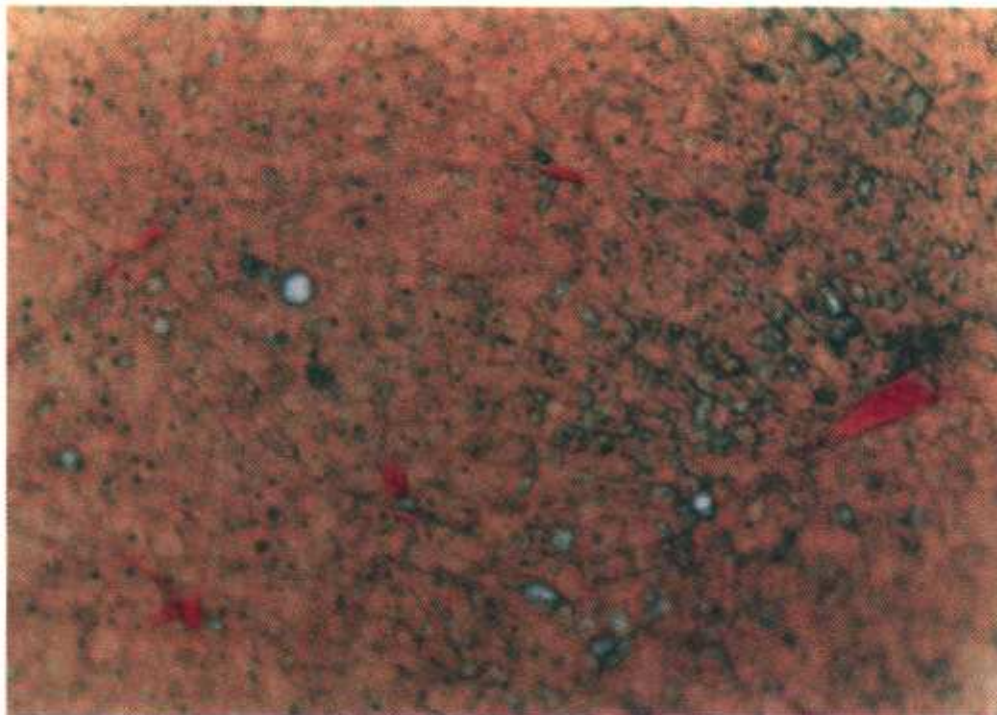
TAB. 2 Contenuto (umol/g tessuto fresco) di idrossiprolina (HYP).

		GRUPPO A	GRUPPO B	GRUPPO C	GRUPPO D
HYP	1.	0.8 = 0.1	2.8 = 0.7	2.1 = 0.3	1.8 = 0.2
	2.	0.8 = 0.1	2.8 = 0.9	2.0 = 0.2	1.8 = 0.4
	3.	0.7 = 0.1	2.8 = 0.7	2.0 = 0.2	1.7 = 0.2

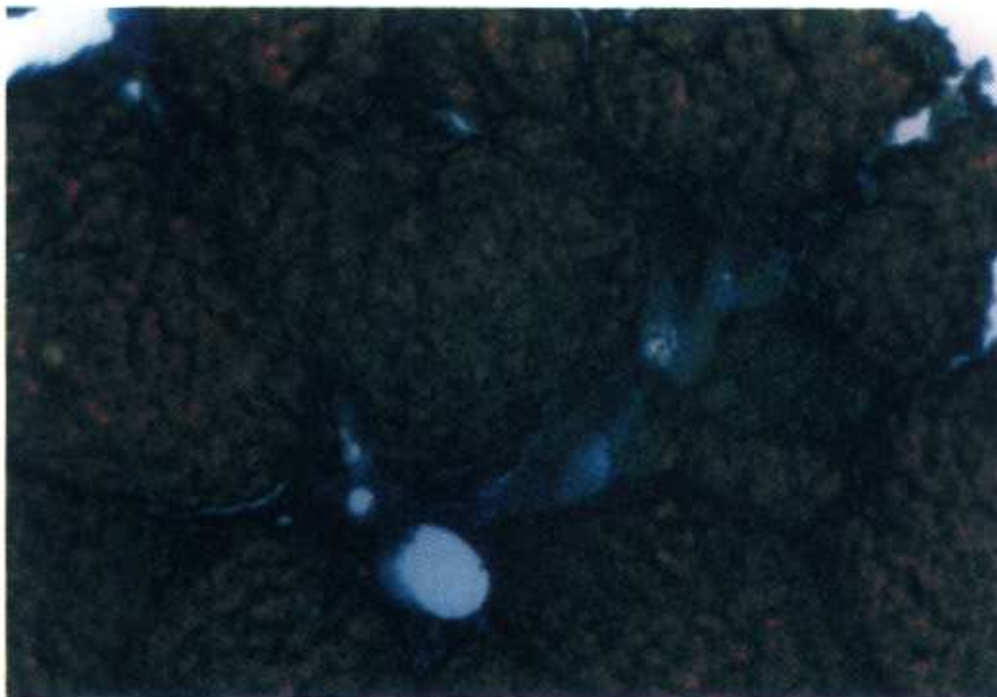
Parametri di funzionalità epatica

I risultati di questi test sono presentati in fig 3a – 3 f (grafici) e in Tab 1 (numerici). In tutti gli esperimenti effettuati, le alterazioni dei parametri ematici di sofferenza epatica tra i gruppi di controllo e quelli trattati con cirrosi sono state rilevanti e statisticamente significative. I valori delle aminotrasferasi, in particolare della ALT, sono risultati notevolmente più alti nei ratti trattati in cronico con CCl₄, evidenziando una alterazione morfologico-strutturale dell'integrità epatocitaria: inoltre i valori di bilirubina e di ALP, erano rispettivamente raddoppiati e triplicati, indicando un'alterazione biliare, mentre il livello di albumina serica è risultato diminuito nei ratti deceduti anche se la differenza degli animali di controllo non è statisticamente significativa. Nei gruppi di animali deceduti trattati con Colchicina o Phosphorus 30 CH è stato osservato un miglioramento generale ed in qualche caso significativo di tutti i parametri ematici della malattia. Infatti mentre i livelli dell'ASP erano simili ai valori trovati negli animali deceduti non sottoposti a trattamento, nei ratti sottoposti a trattamneto si sono trovate diminuzioni significative per l'attività serica della alanina aminotrasferasi e nella concentrazione di bilirubina; i valori del siero si avvicinano ai

normali valori fisiologici in aricolare per i gruppi trattati con Colchicina. Per quanto riguarda l'attività della fosfatasi alcalina del siero, mentre il gruppo dei ratti trattati anche con Colchicina presentavano valori simili a quelli dei ratti fibrotici, il gruppo trattato con Phosphorus 30 CH ha mostrato un miglioramento in questo valore enzimatico.



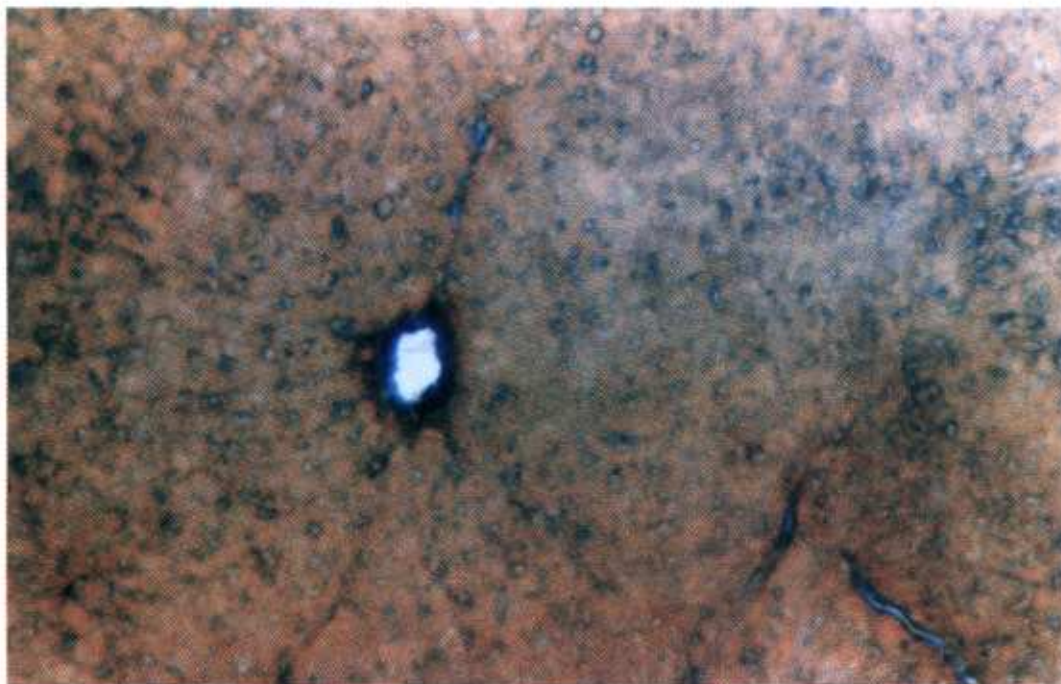
Sezione di fegato di ratto di controllo sano.
(colorazione mallory; ingrandimento finale x300)



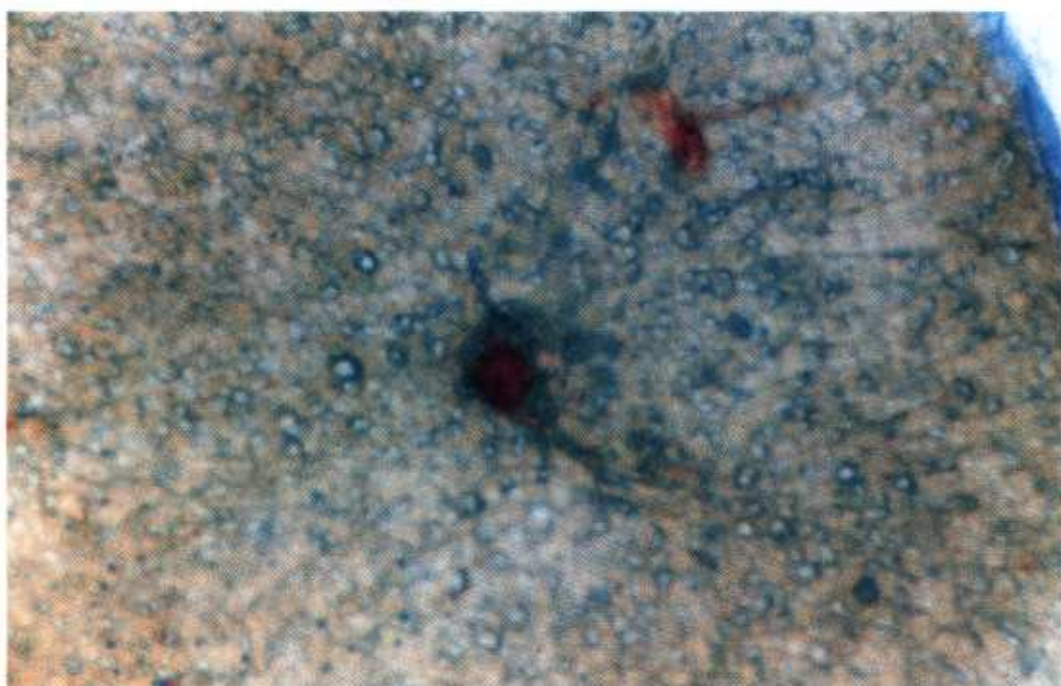
Sezione di fegato di ratto cirrotico.
(colorazione mallory; ingrandimento finale x300)

Biochimica del grado di fibrosi del fegato

La fig. 4 (grafico) e la tabella 2 (numerico) mostrano che i livelli di idrossiprolina legata al collagene, un indice biochimico del contenuto di collagene del fegato, risulta più di 3 volte aumentato nei ratti a cui è stato somministrato CC14 rispetto ai controlli. Questo dato biochimico si accorda con il quadro istologico epatico di stato fibrotico conclamato. Dalla stessa tabella risulta evidente una diminuzione statisticamente significativa del contenuto di idrossiprolina legata al collagene nei gruppi di ratti che hanno ricevuto insieme all'agente tossico anche Colchicina e Phosphorus 30CH; pur rimanendo consistente la deposizione di matrice extracellulare rispetto ai controlli. Nei ratti trattati con Colchicina l'idrossiprolina epatica è ridotta al valore di 1.8 $\mu\text{mol/g}$ di tessuto fresco (media di tre esperimenti) a fronte di un contenuto di 2.8 $\mu\text{mol/g}$ di tessuto fresco nei ratti trattati solo con CC14. Una situazione simile si riscontra nei ratti fibrotici trattati con Phosphorus 30 CH, per i quali si è osservato un contenuto medio di idrossiprolina nei tre esperimenti di circa 2 $\mu\text{mol/g}$ di fegato.



Sezione di fegato di ratto trattato con Phosphorus 30CH.
(colorazione mallory: ingrandimento finale x300)



Sezione di fegato di ratto trattato con colchicina.
(colorazione mallory: ingrandimento finale x300)

Conclusioni

Al momento, una adeguata terapia per la fibrosi del fegato ed in particolare la cirrosi, non è disponibile. L'unico farmaco ad accertata azione antifibrotica è la Colchicina, come esperimenti su animali e protocolli clinici hanno dimostrato (11).

L'elevata tossicità della molecola ne preclude l'utilizzo in terapia umana; i nostri esperimenti precedenti (12) e quelli di nuovo effettuati in questo lavoro, confermano l'efficacia della Colchicina e dimostrano che il Phosphorus 30 CH induce un effetto simile quando somministrato a ratte aventi una fibrosi cronica indotta.

Il fosforo bianco a dosi basse appare proteggere il parenchima epatico dall'azione devastante del tossico, migliorando tutti i parametri ematici presi in considerazione. Inoltre, anche l'accrescimento corporeo degli animali è risultato migliorato e la mortalità è nettamente diminuita come risultato del trattamento con il medicinale omeopatico.

Riferimenti bibliografici

1. Fibroblasti contrattili nella cirrosi alcolica cronica. Rudolph R., Mc Clure, Woodward M., *Gastroenterology* 76, 704, 1979
2. Ultrastruttura degli stati iniziali della fibrosi perivenulare in "alcohol fed baboons". Nakano M., Lieber C.S. *Cin. Res.*, 29, 568 A., 1981
3. Lipociti che contengono vitamina A e formazione di collagene tipo III nell'intossicazione epatica. Kent G., Gay S., Inouye T., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 73, 3719, 1976.
4. Cellule stellate perisinusoidali (cellule immagazzinanti grasso, cellule interstiziali, lipociti). Wake K., *Int. Rev. Cytol.*, 66,303, 1980
5. Storia naturale dell'epatite alcolica. IV Glicosaminoglicuronanti e collagene nel tessuto connettivo epatico. Galambos J.T., Shapira R., *J. Clin. Invest.*, 107, 2952, 1973.
6. Distribuzione delle proteine delle membrane basali nel fegato umano normale e fibrotico: collagene tipo IV, lamina e fibronectina. Hahn E.G. Wick G., Pencev D., et al., *Gut*, 21, 63, 1980.
7. Fibrosi epatica e collass: distinzione istologica con colorazione con orcina Scheuer P.J., Maggi G., *Histopathology*, 4, 487, 1980.
8. Tipi di collagene nel fegato normale e cirrotico. Roijkind M., Giambrone M.A., Biempica L., *Gastroenterology*, 76, 710, 1979.
9. *Pratique homeopathique en gastroenterologie*. Ed. a cura del "Centre d'études et de documentation homeopathiques", Lione 1977.
10. Analisi dell'idrossiprolina acidosolubile, prolina libera e idrossiprolina legata al collagene nel fegato di ratto con cromatografia liquida ad alta risoluzione con derivazione "pre-column" Palmerini C.A., Vedovelli A., Morelli A., Fini C., Floridi A., *J. Liquid. Chromatogr.* 8, 1853, 1985.
11. Un saggio preliminare della colchicina nella cirrosi biliare primaria. Kaplan M.M., Allig D.W., Zimmerman H.J. et al., *N. Engl. J Med.*, 315, 1448, 1986
12. Cirrosi epatica sperimentale: effetti di alte e basse dosi. Floridi A., Fini C., Palmerini C.A. et al. *Gastroenterology*, 84, 1371, 1983.