

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE CHIRURGICHE

Ciclo XXVIII

Settore Concorsuale di afferenza: 06/A2

Settore Scientifico disciplinare: MED/05

**Il contributo delle cellule mesenchimali vascolari nello
sviluppo dell'aneurisma dell'aorta addominale.**

Presentata da: Enrico Gallitto

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. Mauro Gargiulo

Chiar.mo Prof. Mauro Gargiulo

Esame finale anno 2016

INDICE

• ABSTRACT	pag. 3
• INTRODUZIONE	pag. 5
• BACKGROUND	pag. 7
• ENDPOINTS	pag. 9
• METODI	pag. 10
• RISULTATI	pag. 18
• DISCUSSIONE	pag. 27
• LIMITI	pag. 34
• CONCLUSIONI	pag. 35
• TABELLE	pag. 36
• FIGURE	pag. 37
• BIBLIOGRAFIA	pag. 45

Il contributo delle cellule mesenchimali vascolari nello sviluppo dell'aneurisma dell'aorta addominale.

ABSTRACT

Introduzione. Processi di invecchiamento e infiammazione sono coinvolti nella patogenesi delle patologie aortiche. Un'infiltrazione infiammatoria e un'eccessiva proteolisi della matrice extracellulare (ECM), mediata da metallo-proteinasi (MMPs), sono alterazioni tipiche dell'aneurisma dell'addominale (AAA). Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono state isolate dalla parete vascolare e rappresentano i potenziali candidati target per la medicina rigenerativa in virtù della loro potenziale differenziazione mesodermica e attività immuno-modulatoria. Lo scopo dello studio è stato valutare la presenza di un potenziale ruolo delle MSCs nello sviluppo di AAA.

Metodi. Sono stati prelevati segmenti di parete aortica aneurismatica da pazienti portatori di AAA e sottoposti a trattamento chirurgico open e segmenti di tessuti aortici da donatori sani. È stata effettuata valutazione istologica della parete di AAA. Le MSCs sono state isolate dal tessuto di AAA (AAA-MSCs) e caratterizzate (marcatori mesenchimali/staminali, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e l'EMMPRIN). Le AAA-MSCs sono poi state testate per valutarne le caratteristiche di immuno-modulazione mediante co-culture di cellule mononucleate attivate (PBMC) provenienti da sangue periferico e di MSCs da donatore sano.

Risultati. Le cellule AAA-MSCs hanno mostrato proprietà fenotipiche e genotipiche di tipo mesenchimale: forma fibroblastica, presenza di antigeni MSC e geni staminali. Le MMP-9 (mRNA e proteina di attività enzimatica) sono risultate significativamente aumentate in AAA-MSCs rispetto MSCs. Le AAA-MSCs hanno dimostrato una debole attività immunosoppressiva. I loro livelli di MMP-9 sembra possano essere modulate a livello trascrizionale attraverso il diretto contatto con l'azione paracrina di MSCs sane.

Conclusioni. L'AAA non ha influenzato il *fenotipo* di base delle MSC, ma ne ha alterato la funzione, aumentando l'attività di MMP-9 e mostrando un'inefficace attività di immuno-modulazione. Questi dati potrebbero suggerire che le MSCs della nicchia vascolare possano contribuire alla formazione di AAA. Lo studio dei processi chiave per ripristinare

l'immunomodulazione delle MSsC potrebbe essere quindi utile per trovare un approccio medico per il monitoraggio della progressione degli AAA.

Parole chiave: AAA; MSCs; infiammazione; MMP-9; immunomodulazione

INTRODUZIONE

L'attività di ricerca è stata incentrata sull'isolamento e caratterizzazione di cellule staminali mesenchimali (MSC) dalla parete arteriosa patologica di un aneurisma dell'aorta addominale (AAA) al fine di identificare un loro eventuale ruolo nella patogenesi aneurismatica.

L'aneurisma dell'aorta addominale (AAA) è una condizione patologica caratterizzata dilatazione focale e permanente dell'aorta (>50% del diametro fisiologico), che porta al progressivo indebolimento della parete del vaso fino alla rottura. La formazione di un AAA è del tutto asintomatica, non presenta infatti segni o sintomi specifici e la sua rottura presenta un alto tasso di mortalità⁽¹⁾. Un aspetto peculiare dell'AAA è rappresentato dalla sbilanciata attività degli enzimi proteolitici della parete arteriosa, che si traduce in un'eccessiva degradazione della matrice extracellulare e nell'indebolimento della parete vascolare specie nella tonaca media. Dati disponibili in letteratura hanno identificato quali sono i meccanismi principalmente coinvolti nella formazione dell'aneurisma: processo infiammatorio, up-regolazione delle metalloproteasi (MMPs), stress ossidativo, ipossia e invecchiamento della parete vascolare⁽¹⁾.

Le MMPs costituiscono una famiglia di enzimi proteolitici, distinti in diverse classi in base al substrato della matrice extracellulare che degradano. In particolare, le MMPs principalmente coinvolte nella patogenesi dell'aneurisma sono le collagenasi (MMP-1,-8,-13,-18) che degradano il collagene di tipo I, II e III, e le gelatinasi (MMP-2,-9) il cui substrato è rappresentato dalla gelatina⁽²⁾. L'aumento di produzione e dell'attività proteolitica delle MMPs riveste una notevole importanza nell'insorgenza dell'AAA. Studi su pazienti affetti da AAA mostrano elevati livelli plasmatici di MMP-2 e MMP-9^(3, 4).

E' stato inoltre dimostrato che le gelatinasi sono necessarie per indurre sperimentalmente un AAA nel topo ⁽⁵⁾.

Le MSC rivestono una notevole importanza nel campo terapeutico, in virtù della loro funzione immuno-modulatoria. Queste cellule regolano infatti la risposta immune in caso di danno tissutale, trapianto o malattie autoimmuni, attraverso la loro capacità di sopprimere la proliferazione dei linfociti T e delle cellule Natural Killer. Il gruppo di ricerca diretto dal Prof. Pasquinelli, grazie alla collaborazione con la Banca Regionale dei Tessuti Cardiovascolari dell'Ospedale Sant'Orsola-Malpighi di Bologna, ha maturato un'esperienza nell'isolamento e nella caratterizzazione di MSCs dalla parete di tessuti vascolari provenienti da donatori sani ^(6, 7). Diversi fattori, tra cui l'invecchiamento e l'insorgenza di mutazioni o modificazioni epigenetiche a carico di MSCs, possono rappresentare il presupposto della sbilanciata attività proteolitica e infiammatoria riscontrata nella parete vascolare aneurismatica.

Lo studio che viene riportato si è quindi sviluppato su tre livelli:

- Isolamento e caratterizzazione MSC da AAA (AAA-MSCs)
- Analisi dell'espressione genica di mediatori patogenetici di AAA in AAA-MSCs
- Analisi delle capacità immuno-regolatorie delle AAA-MSCs in un contesto infiammatorio

BACKGROUND

La presenza di MSCs nella parete vascolare (nicchia vasculogenica) è stata dimostrata in diverse esperienze (Zengin et al, 2006; Ergun et al, 2011; Psaltis et al, 2011; Gómez-Gavero et al, 2012;). Il team di ricerca diretto dal Prof Pasquinelli ha maturato un'esperienza decennale nell'isolamento di MSC dalla parete di diversi segmenti arteriosi ottenuti da donatori sani di varie età e caratteristiche cliniche (Pasquinelli et al, 2007; Pasquinelli et al, 2010; Valente et al, 2014).

Più specificamente, è stata isolata una popolazione di cellule che esprimono antigeni e fattori trascrizionali mesenchimali che sono in grado di differenziazione adipogenica, osteogenica e condrogenica. Inoltre, questa popolazione cellulare, denominata MSCs di parete vascolare (VW-MSCs), ha dimostrato forma simil capillare sotto l'influenza di VEGF utilizzato come fattore solubile in aggiunta alle colture cellulari. In aggiunta a queste caratteristiche fenotipiche e funzionali, le VW-MSC sono state saggiate per l'attività immuno-modulatoria. Le VW-MSCs, come altre MSCs umane, sono in grado di modulare negativamente la risposta immunitaria, attraverso un effetto negativo sulla proliferazione di cellule mononucleate attivate (PBMC), agendo sull'arresto del ciclo cellulare in fase G0/G1. D'altro canto, le VW-MSCs hanno dimostrato una pronunciata espressione di HLA-G, un antigene MSC specifico che inibisce la reazione immunitaria con la soppressione di cellule T e natural killer. In aggiunta, è stato recentemente valutato che si riesce ad ottenere un certo numero di VW-MSC con elevata capacità proliferativa anche da arterie crioconservate (carotide comune, arteria succlavia, arco aortico, aorta toracica) da 5 anni. Queste cellule hanno quindi mostrato di resistere a basse temperature in azoto liquido a lungo termine (Valente et al, 2014).

Alla luce di tali presupposti, abbiamo deciso di valutare la presenza e funzionalità della nicchia di MSCs anche in condizioni patologiche avverse come in caso di AAA.

Attualmente non è stabilito un approccio farmacologico specifico in grado di ripristinare la normale condizione della parete del vaso in presenza di un AAA e quando il diametro supera i 5.5 cm vi è l'indicazione ad effettuare un trattamento chirurgico (open o endovascolare). La patogenesi di un AAA è associata alla degradazione della tonaca media arteriosa, mediata dall'attività proteolitica degli enzimi secreti dalle cellule della parete vascolare stessa e da cellule infiammatorie. In questo contesto, le MMPs rappresentano i mediatori molecolari principalmente coinvolti nella degradazione della matrice extracellulare (ECM). Nel frattempo, l'infiammazione coinvolge la parete aortica e aggrava il rimodellamento tissutale, poiché le cellule infiammatorie, quali i linfociti T, B e macrofagi migrano nel tessuto lesionato, rilasciando citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-6, TNF- α , etc) e MMPs. È stato supposto che una risposta immunitaria cellulo-mediata, basata sulla risposta immunitaria di cellule T contro un antigene endogeno (origine autoimmune) o esogeno (virus herpes simplex, CMV, etc) potrebbe essere alla base dell'origine di un AAA.

Oltre a cellule infiammatorie, le MMPs sono prodotte e rilasciate anche da MSCs a diversi livelli, come dimostrato da numerose esperienze (Silva et al, 2003; Mannello et al, 2006). Infatti, MMPs in particolare MMP-2 e MT-MMP1 sono essenziali per la migrazione di MSCs e la capacità invasiva (Ries et al, 2007). Queste considerazioni ci inducono a supporre un potenziale contributo delle VW-MSCs nella patogenesi di un AAA.

ENDPOINTS

1: isolamento di AAA-MSCs e caratterizzazione

- isolamento di AAA-MSC da campioni di parete aneurismatica prelevati in corso di trattamento chirurgico open di AAA
- caratterizzazione di AAA-MSC secondo i criteri morfologia, antigeni mesenchimali (citometria a flusso) e fattori di trascrizione stemness (RT-PCR).

2: coinvolgimento delle AAA-MSCs nella patogenesi di AAA

- caratterizzazione di AAA-MSC per l'espressione di MMP: MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e EMMPRIN (mRNA, proteine e valutazione di attività).
- immuno-modulazione di AAA-MSC: la possibilità di regolare la reazione immunitaria attraverso co-culture con MSC sane e PBMC attivate.
- immuno-modulazione di MMP attraverso un approccio anti-infiammatori con uso di MSCs ed esposizione a IL-10.

METODI

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico Locale (protocollo numero APP-13-01) e sottoscritto mediante un consenso informato dedicato da tutti i pazienti arruolati.

I segmenti di parete aortica aneurismatica sono stati forniti dall'Unità di Chirurgia Vascolare dell'Università di Bologna, Policlinico S. Orsola-Malpighi. Sono stati raccolti 12 campioni da pazienti sottoposti a trattamento chirurgico open per riparazione di AAA (group A). I dati demografici, fattori di rischio cardio-vascolari e le co-morbidità sono stati inseriti in un database elettronico dedicato.

I Segmenti di aorta toracica proveniente da tre donatori sani (non portatori di aneurismi) sono stati forniti dalla Banca dei Tessuti cardio-vascolari dell'Ospedale Universitario S. Orsola-Malpighi, Bologna. Tali tessuti vascolari derivano dai segmenti arteriosi scartati dalla banca e sono stati usati come gruppo di controllo sano (group B) con l'approvazione del Comitato Etico Locale (protocollo numero APP-13-01). I segmenti aortici sani sono stati scelti secondo criteri specifici: età donatore fra tra 18 e 55 anni per escludere che il processo di invecchiamento interferisse con la nostra analisi; causa della morte non associata a malattie cardiovascolari pre-esistente o emorragia cerebrale. Ciò è stato effettuato per poter confrontare i dati del gruppo A con un gruppo di soggetti sani in assenza di rischio cardiovascolare.

Lo studio è stato sviluppato mediante effettuando valutazioni istologiche e cellulari. Per questo scopo i campioni di parete aortica sono stati in parte fissati per poter effettuare lo studio istologico e di immuno-colorazione e in parte trattati con soluzioni enzimatiche per consentirne l'isolamento di cellule.

Di seguito si riportano sommariamente le metodiche di laboratorio utilizzate. Per la descrizione in dettaglio dei processi di laboratorio utilizzati per lo studio istologico,

citologico, immuno-fenotipico e immuno-modulatorio si rimanda alle pregresse pubblicazioni riportate dal nostro gruppo di ricerca di base ^{x, x, x}.

Caratteristiche istopatologiche di AAA

Ematossilina / eosina

I segmenti di parete arteriosa sono stati in parte riservati per l'esame istologico al fine di caratterizzare la parete aortica e identificare le tipiche caratteristiche di un aneurisma. I tessuti di AAA sono stati fissati con una soluzione di formaldeide al 10%, lavati e disidratati mediante passaggio del tessuto attraverso soluzioni con concentrazione aumentate di alcol (70%-96%-100%) ed inclusi in paraffina per poi ottenere quattro sezioni. Ogni sezione è stata tagliata attraverso il microtomo e colorata con ematossilina / eosina tradizionale per l'analisi istopatologica secondo i metodi istologici. Dopo la colorazione, le diapositive sono state osservate con microscopio luminoso e analizzate utilizzando il Image-Pro Plus® 6.

La colorazione immunoistochimica

L'immunoistochimica è stata eseguita su pezzi di aneurisma e su campioni sani per caratterizzare la popolazione di MSC prima della digestione enzimatica. Gli antigeni mesenchimali (CD44 e CD90) sono stati usati per il rilevamento in situ delle MSCs umane. In aggiunta, la colorazione MMP-9 è stata eseguita per valutare il contributo dei differenti tipi di cellule all'interno della parete del vaso nel rimodellamento arterioso patologico.

Analisi di MSCs isolate da AAA

Isolamento e coltura di MSC

Il protocollo utilizzato per l'isolamento di MSCs da segmenti vascolari consiste di un adeguamento della tecnica precedentemente descritta da Pasquinelli et al. 2010. Due cm² di sezioni di campioni sani e aneurismatici sono stati digeriti in una soluzione enzimatica contenente 0,3 mg/mL di Liberasi tipo II (Liberase TM Ricerche Grade, Roche) a 37°C in una apparecchiatura di rotore. Il risultante omogenato tissutale è stato filtrato utilizzando una cella epuratoria a diametro decrescente (100-70-40µm) per eliminare i residui di non-tessuto digerito e centrifugato a 1200 giri/min. La vitalità delle cellule è stata valutata mediante esclusione con Trypan blu. Le MSCs isolate da tessuto di aneurisma sono state identificate con la sigla AAA-MSCs, mentre MSCs isolate da aorta sana sono state definite come controllo cMSCs. AAA-MSCs e cMSCs sono state coltivate secondo le condizioni di coltura standard (37° C incubatore, 5% CO₂) in DMEM arricchito con siero bovino fetale 20% (FBS; Sigma Aldrich) e espanso in vitro.

Immuno-fenotipo di MSC: analisi di citometria a flusso

L'analisi citometrica a flusso è stata eseguita su AAA-MSCs e cMSCs per studiare l'espressione tipica di marcatori di cellule mesenchimali ed esplorare eventuali differenti pattern di espressione di antigeni esaminati. Un ampio pannello di coniugati di anticorpi è stato utilizzato: anti-CD44-isotiocianato di fluoresceina (FITC), anti-CD73-ficoeritrina (PE), anti-CD90-ficoeritrina cianina-5, anti-CD14-FITC, anti-CD34-FITC, anti-CD45-allofocianina, anti-CD146-PE, anti-fattore di crescita ottenuto da piastrine (PDGFR-p) (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, Stati Uniti d'America). L'analisi mediante citometria a flusso ha incluso anche l'espressione di HLA-G, associato con l'attività immuno-modulatoria di MSCs. Per questo scopo, la rilevazione è stata effettuata attraverso l'incubazione con anticorpo anti-HLA-G-FITC (Abcam, Cambridge, UK). I controlli negativi erano effettuati usando opportuni coniugati di anticorpi irrilevanti. I campioni

sono stati analizzati utilizzando un Navios FC dotato di due laser per l'acquisizione dei dati (Beckman-Coulter). I risultati sono stati analizzati con software Kaluza FC (Beckman-Coulter).

Profilo molecolare di MSC: marcatori STEMNESS, mediatori di AAA e fattori immunomodulatori.

L'estrazione di RNA totale e Reverse-Transcription.

L'RNA totale è stato estratto da cMSC e AAA-MSCs. In breve, le cellule coltivate sono state omogeneizzate in soluzione TRI di reagente e incubate a temperatura ambiente per 5 minuti. Dopo lisi, il cloroformio è stato aggiunto ai campioni di omogenato e lasciato a temperatura ambiente per 10 minuti, per consentire la separazione di fase: dopo la centrifuga, l'RNA contenuto nella fase acquosa è stato raccolto e trasferito in una nuova provetta. Una fase di precipitazione di RNA per aggiunta di alcool isopropilico, incubata a temperatura ambiente per 10 minuti, è stata eseguita; il pellet visibile di RNA è stato infine lavato con alcool al 75%, centrifugato ed essiccato con aria per dieci minuti. L'RNA è stato disciolto in acqua libera con RNAasi e conservato a 20°C fino all'uso. Alla fine del protocollo di estrazione di RNA, l'integrità e la concentrazione sono state valutate usando ND-1000 (spettrofotometro NanoDrop, Fisher Thermo, Wilmington, DE, STATI UNITI D'AMERICA). La PCR a trascrittasi inversa è stata effettuata su tutti i campioni di RNA con un rapporto di assorbanza (260/280) tra 1.8-2.2. RNA totale è stato retro-trascritto in una reazione di 20 µL volume con elevata capacità di trascrizione inversa Kit (Life Technologies).

Valutazione mediante RT-PCR di Marcatori Stemness

RT-PCR è stata eseguita su AAA-MSCs per valutare l'espressione di geni stemness NANOG, oct-4 e SOX-2.

Real time quantitative PRC (qPCR)

Real time qPCR è stata eseguita per valutare l'espressione di fattori trascrizionali dei mediatori molecolari di AAA, citochine antinfiammatorie e i livelli di mRNA in cMSCs e AAA-MSCs.

Rilevazione della proteina MMP-9 mediante analisi Western Blot

Analisi Western Blot è stata eseguita su AAA-MSCs e cMSCs per valutare l'espressione di MMP-9.

Saggio di attività delle metalloproteinasi: zimografia a gelatina

La zimografia a gelatina è una tecnica utilizzata per analizzare l'attività di MMP attraverso la separazione elettroforetica di campioni su SDS-PAGE, contenente il substrato specifico per il MMP ioni Ca^{2+} necessario riattivare le MMPs (NaCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Tris-HCl, pH=8).

Valutazione dell'attività immunomodulatoria di AAA-MSC

Co-saggi di coltura di cellule mononucleari di sang

umano sano e MSC in corrispondenza dello stadio 3 del ciclo sono state seminate a 2.5×10^5 cellule in un sei pozzetti in DMEM 20% FBS. Le cellule mononucleari di sangue periferico (PBMC) sono state isolate da buffy coats di donatori sani e fornite dal Servizio di Medicina Trasfusionale, DELL'Ospedale Universitario S. Orsola-Malpighi di Bologna.

Le PBMC sono state ottenute utilizzando un Ficoll-Histopaque centrifugazione a gradiente di densità. Le PMBC in sospensione, sono state recuperate e piastrate a una densità di $2,5 \times 10^6$ cellule/pozzetto su MSC feeder layer in RPMI 1640 (Lonza, Walkersville, MD, USA). Phyto-hemagglutinin (PHA; Sigma Aldrich) alla concentrazione di 5 $\mu\text{g/ml}$ è stato aggiunta alle colture di PBMC per attivare e stimolare la loro proliferazione. Il controllo positivo è stato rappresentato da PBMC attivate coltivate in assenza di MSC. Il controllo negativo era rappresentato da PBMC non attivate prive di PHA. Dopo 72h di co-coltura, le PBMC sono state recuperate e 1×10^5 cellule sono state trasferite in una piastra a 96 pozzetti per il 5-bromo-2'-deossiuridina (BrdU). BrdU è stato aggiunto a ciascuna condizione di coltura e dopo 4h è stata eseguita la valutazione della proliferazione di PBMC utilizzando la BrdU Assay kit (Roche Scienze Applicate) e secondo il protocollo del produttore. La restante parte di PBMC a seguito della co-coltura con cMSCs, è stata fissata con il 75% di etanolo a 4°C, colorate con ioduro di propidio (Beckman Coulter) a temperatura ambiente per 10 min per l'analisi del ciclo delle cellule mediante citometro di flusso. Per quanto riguarda l'alimentatore, AAA-MSCs e CMSC sono state tripsinizzate e una parte è stata elaborata per l'analisi di citofluorimetria HLA-G, mentre l'altro è stato designato per l'estrazione di RNA, cDNA di trascrizione inversa e qPCR per IL-10 e HLA-G mRNA, come descritto in precedenza.

Regolazione trascrizionale di MMP in AAA-MSC

Co-culture in vitro di AAA-MSCs e cMSC

In accordo con la proprietà riparativa di MSC, abbiamo indagato il potenziale contributo di cMSCs derivate da parete aortica sana, alla trascrizione di MMP da parte di AAA- MSCs. A questo scopo abbiamo testato due condizioni di coltura: 1) AAA-MSCs e MSCs seminate in rapporto 1:1; 2) AAA-MSCs coltivate utilizzando mezzi condizionati mediante

colture di cMSC, valutando anche un meccanismo paracrino. Dopo 72h, l'estrazione di RNA totale, la trascrizione inversa e qPCR sono state valutate per misurare i livelli di mRNA di MMP-2 e MMP-9.

Regolazione di MMP-9 mediante IL-10 aggiunta a colture AAA-MSC

IL-10 è un anti-citochina infiammatoria e ha dimostrato di down-disciplinare le MMP-9 (Roth e Fisher, 1999). Per questo motivo, abbiamo valutato gli effetti di IL-10 anche sulle AAA-MSCs. AAA-MSCs appartenenti a tre diversi campioni sono state seminate ad una densità di 60000/pozzetto in una piastra a 6 pozzetti e dopo 24h sono state esposte a IL-10 solubile (Sigma Aldrich, Italia) a 0-10-20 ng/mL, utilizzando DMEM privo di siero. Dopo 24h l'estrazione di RNA totale, sintesi di cDNA e qPCR sono stati eseguiti per quantificare la trascrizione di MMP-9.

Analisi statistica

L'analisi dei dati e la loro rappresentazione grafica è stata eseguita mediante il software statistico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc). I risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard e l'analisi statistica è stata valutata utilizzando il t test (per il confronto tra i due gruppi), test di ANOVA ad una e a due vie seguito dal post hoc test di Bonferroni (per il confronto tra più di due gruppi). I risultati sono stati considerati statisticamente significativi con un livello di confidenza del 95% (valore $p < 0.05$).

RISULTATI

Gruppi di studio

Lo studio ha coinvolto due gruppi di analisi:

gruppo 1 - 12 campioni di tessuto aortico prelevato da parete di AAA in corso di trattamento chirurgico open; gruppo 2 - 3 campioni di tessuto aortico prelevato da donatori sani. Le caratteristiche demografiche, i fattori di rischio, le co-morbidità e la terapia medica in atto del gruppo 1 sono riportate in tabella 1. I dati del gruppo 2 sono riportati in tabelle 2.

Caratteristiche istologiche della parete di AAA

Colorazione ematossilina/eosina è stata eseguita sulle sezioni di tessuto aortico, ricavate da pazienti portatori di AAA e sottoposti a chirurgia aortica tradizionale. Sono state evidenziate le tipiche alterazioni istologiche di un'aorta aneurismatica (figura 1). La caratteristica istologica distintiva dell'AAA è stata rappresentato dalla perdita completa dell'architettura vasale con impossibilità nell'individuazione dei tre strati tipici (tonaca intima, media e avventizia). Ciò è dovuto alla perdita del tono muscolare e di una esagerata attività proteolitica che promuove un'ampia degradazione mediale. La distruzione della tonaca media è un'altra tipica caratteristica istologica della AAA (figura 1). La triade istopatologica dell'AAA è stata completata dall'elevato grado di infiltrato infiammatorio identificato. Quest'ultimo aspetto può essere rivelato dalla presenza di molte cellule immunitarie, compresi i linfociti e macrofagi. In aggiunta, possono essere identificate le placche lipidiche/lesioni aterosclerotiche che colpiscono la parete di AAA (figura 1).

MSCs e malattie vascolari: identificazione primaria a livello di AAA

Il rilevamento in situ di MSCs positiva per antigeni CD44 e CD90

Dopo la digestione enzimatica e l'isolamento di cellule da tessuti aortici, abbiamo valutato la distribuzione di MSC nella parete arteriosa malata. Per questo scopo, abbiamo effettuato una colorazione immunohistochimica per i tipici markers mesenchimali su 4 µm di tessuti aortici, raccolti da pazienti portatori di AAA. Le cellule positive a CD44 e CD90 sono state identificate in corrispondenza dei vasa vasorum, indicando così la presenza di una popolazione di cellule di origine mesenchimale e con localizzazione nella nicchia perivascolare. CD44 viene anche evidenziato in cellule di natura infiammatoria. Risultato di immuno-colorazione in rappresentanza di CD44 e CD90 sono rappresentati nella figura 2.

L'espressione di MMP-9 in tessuto sano e parete di AAA

Il coinvolgimento di MMP-9 nel rimodellamento patologico di un AAA è stato dimostrato mediante quantificazione di mRNA con Real Time PCR. Come mostrato in Figura 3, la trascrizione di MMP-9 è aumentata in tessuti di AAA rispetto al confronto con l'aorta sana (33.2 ± 27 volte maggiore) anche se non significativamente.

Abbiamo eseguito la immuno-colorazione a 4 µm dei tessuti aortici, raccolti dal paziente con AAA e gruppi di controllo, utilizzando un anticorpo contro MMP-9. Vi è stata una vasta positività della parete vascolare malata per MMP, mentre nel tessuto aortico sano è risultata negativa. Più in dettaglio, MMP-9 potrebbe essere facilmente identificata in corrispondenza di infiltrato infiammatorio, come si vede nella figura 3. La concentrazione elevata di cellule infiammatorie è dovuto alla migrazione transmurale di cellule circolanti in risposta a fattori chemotattici; inoltre, cellule residenti vascolari contribuiscono grandemente alla secrezione di MMP, e MMP-9. In effetti, potremmo notare questo aspetto nella Figura 3, dove il segnale positivo è stato rilevato a livello di nicchia perivascolari

situato presso il vasa vasorum; inoltre, sono stati visualizzati a forma di fuso e hanno mostrato un pattern stromale e positività a MMP.

La localizzazione perivascolare di MMP-9, insieme all'aspetto di cellule fusiforme sottolinea l'appartenenza al tessuto stromale della parete aortica e costituiscono una chiara premessa riguardante l'esistenza nella parete vascolare MSCs (più evidenziato dall'espressione di CD44 e CD90) e la loro ipotetica partecipazione ai processi di malattia parietali.

Isolamento di MSC da umani sani e da AAA: recupero di cellule, caratterizzazione e saggi di funzione

Isolamento di MSC da umano sano e AAA

Come descritto nei materiali e metodi il tessuto aortico è stato sottoposto ad una digestione enzimatica, risultante in un tessuto omogeneo composto, attraverso la perdita di spazio e giunzioni aderenti che uniscono insieme le cellule delle pareti del vaso. Una quantità di circa 8×10^5 cellule sono state recuperate dalla digestione enzimatica di 2 cm² di sezioni di aorta aneurismatica. Questo recupero di cellule è stato ottenuto dai tessuti di tutti i pazienti arruolati. Le cellule sono state seminate in piastre di coltura DMEM 20% FBS e dopo 24-48h è stata osservata la comparsa di cellule aderenti alla coltura. Le AAA-MSCs nella coltura sono visualizzate con un tipico aspetto da fibroblasto con una cinetica di crescita simile a quella di donatori volontari sani (Valente et al, 2014). Le MSCs isolate da aorte sane crioconservate sono state utilizzate come controlli sani e sono definiti come controllo MSCs (cMSC). AAA-MSCs a sette giorni dalla semina, raggiunta la confluenza, sono state in vitro espansa per almeno 12-13 passaggi. Inoltre le AAA-MSCs, come cMSC,

mostravano un aspetto eterogeneo in corrispondenza di p0, costituito da diverse sottopopolazioni, e dopo 1-2 passaggi in coltura hanno iniziato ad assumere un fenotipo più omogeneo. Queste caratteristiche morfologiche sono mostrati nella Figura 4.

MSC immunofenotipo e profilo molecolare

Le AAA-MSCs sono state coltivate su un mono-strato e quando hanno raggiunto il terzo passaggio di cultura, sono state elaborate per caratterizzazione fenotipica e molecolare. L'Immuno-fenotipo è stato valutato utilizzando un pannello di anticorpi indirizzato contro antigeni specifici di superficie: CD44, CD73, CD90, CD146 e PDGFR- β (marcatori di origine mesenchimale); CD14, CD34 e CD45 (marcatori di cellule endoteliali e cellule ematopoietiche).

L'immuno-fenotipo di AAA-MSC è speculare alla nostra precedente osservazione su sano cMSC (Valente et al, 2014); infatti, come rivelato mediante citometria a flusso, AAA-MSCs esprime una tipica firma mesenchimale, con un profilo positivo per CD44, CD73, CD90, CD146 e PDGFR- β . D'altro canto, AAA-MSCs risulta negativo per CD14, CD34 e CD45, escludendo quindi di essere una MSC vascolare appartenenti al sistema ematopoietico e di classe endoteliali. L'elaborazione dei risultati della citometria di flusso è mostrata nella figura 5.

I pannelli che rappresentano l'elaborazioni della citometria di flusso provano una condivisa espressione dell'antigene superficiale tra soggetti sani e patologici, suggerendo un'origine comune per le due popolazioni cellulari.

Le AAA-MSC sono state caratterizzate anche per i geni NANOG, oct-4 e SOX-2. Questi sono peculiari fattori trascrizionali e come documentato dalla letteratura, costituiscono una

unità trascrizionale che regola i geni associati con lo sviluppo di cellule, l'attivazione di auto-rinnovamento e pathways pluripotenti.

La figura 6 riporta una rappresentazione di elettroforesi su gel di un'immagine di amplificazione genica mediante RT-PCR eseguita sul nostro modello AAA-MSCs. AAS-MSCs ha espresso tutti i geni esaminati, specialmente NANOG e oct-4, mentre un segnale più debole è stato rilevato in corrispondenza della banda di SOX-2. In aggiunta, per meglio valutare l'effetto della malattia vascolare su MSC abbiamo eseguito una analisi semi-quantitativa dei geni mediante qPCR su sano e AAA-MSCs. Come si osserva nella figura 6, la configurazione di espressione genetica è stata abbastanza simile tra soggetti sani e AAA MSCs, poiché la semi-analisi quantitativa non ha rivelato differenze significative.

L'analisi preliminare sul fenotipo di AAA-MSCs indica il mantenimento delle caratteristiche di base (morfologia, dinamica di crescita in colture in vitro, immunofenotipo e profilo genetico) rispetto a MSCs isolate da campioni sani campioni di aorta suggerendo così che la degradazione arteriosa e l'elevato grado di infiammazione non influenzano il fenotipo di MSCs.

Espressione di fattori molecolari per AAA: MMPs, TIMPS e l'EMMPRIN

MMP-2 e MMP-9 sono noti per essere regolatori positivi di rimodellamento e patologia vascolare e così abbiamo esplorato questo aspetto nel nostro modello di cellulare direttamente isolato da tessuto di aneurisma. MMP-2, MMP-9 e i loro rispettivi inibitori tissutali TIMP-2 E TIMP-1 sono state analizzate in AAA-MSCs rispetto al CMSC (Figura7). L'analisi semi-quantitative di MMP-2 e di MMP-9 mRNA con qPCR mostrava che MMP-9 è iper-espresso in AAA-MSc, in confronto alle cMSCs (449.2 volte maggiori rispetto ai sani MSCs aortica, $p=0.6608$, non accoppiata t test), considerando che MMP-2 era leggermente aumentato (2,4 volte superiore in AAA-MSCs, rispetto al CMSC; $p=0.0458$, non accoppiata t test). Inoltre, i livelli di trascrizione TIMP sono stati misurati:

non è stato registrato un aumento significativo dell mRNA di TIMP-1 in AAA MSCs (3,4 volte maggiore di CMSC), mentre TIMP-2 mRNA è risultata diminuita (0,55 volte inferiore in AAA MSCs di CMSC, $p=0.02$, non accoppiata t test). In aggiunta, abbiamo osservato una maggiore rapporto di MMPs/ TIMPs in AAA-MSCs confrontato con CMSC (figura 7), che rappresenta una anormale produzione di MMP e conseguente maggiore proteolisi. La analisi è stata completata con la quantificazione di un induttore di MMP, EMMPRIN e anche come CD147 (induttore metalloproteinasi matrice extracellulare), recentemente associati con malattie cardiovascolari. Un aumento di 2.6 volte dell'mRNA EMMPRIN è stato mostrato in AAA-MSCs, rispetto al cMSC (Figura XX) ($p=0.035$, non accoppiata t test).

Il Western blott ha dimostrato un aumento di proteina MMP-9 in AAA-MSCs rispetto al cMSC. Più specificatamente, un segnale intenso in corrispondenza delle bande di MMP-9 a 92 kDa e 82 kDa potrebbe essere rilevato in tutte le corsie che rappresentano AAA-MSCs, come mostrato in Figura 8; viceversa, un segnale debole è stato rilevato in campioni di cMSC. Questi risultati sulla espressione di proteine da AAA-MSC sono coerenti con le analisi sopra descritte sul tessuto AAA rivelando un segnale positivo MMP-9 in corrispondenza di cellule perivascolari e le stromali.

La figura 9 è rappresentante la zimografia alla gelatina eseguita su cMSC e AAA-MSC, per testare l'attività di MMP-2 e MMP-9. Secrezioni di MMP-9 è stata rilevata principalmente in AAA-MSCs (corsie 1-4), come riflesso dalle attività digestiva in corrispondenza di 92 kDa, anche se linea 4 ha visualizzato un segnale più debole. L'analisi densitometria indicava un aumento significativo di attività MMP-9 in AAA-MSC mezzi condizionati, in confronto a campioni di cMSC (Figura 9). Per quanto riguarda la secrezione di MMP-2, non abbiamo osservato differenze rilevanti tra soggetti sani e campioni AAA. Infatti, l'attività di degradazione di MMP-2 potrebbe essere ampiamente

osservati in AAA-MSCs e CMSC. Intensità di banda quantificata mediante densitometria sono stati normalizzati per cMSC.

L'attività immunomodulatoria di AAA-MSCs: co-cultura in vitro con PBMC attivati da PHA

Espressione di MSC coltivate in condizioni infiammatorie seguente a HLA-G e IL-10

La valutazione della funzione immunosoppressiva delle MSC è stata valutata in condizioni infiammatorie create attraverso co-culture di MSCs seminate su un pallone di coltura con substrato di alimentazione e con PBMC attivati con PHA. Real Time PCR eseguita su MSC dopo 72 h di co-cultura con PHA-PBMC ha rivelato una ridotta espressione di citochine immuno-modulatorie in AAA-MSCs, rispetto al CMSC.

In un primo momento, abbiamo analizzato mRNA di IL-10 che è diminuito in AAA-MSCs ($p=0.0386$, non accoppiata t test) (Figura 10).

Accanto a IL-10, l'analisi citometrica di flusso è stata saggiata per rilevare l'espressione HLA-G sulla superficie di MSC. La figura 10 ha confermato che HLA-G è stata espressa sulla superficie di cMSC, come previsto; è interessante notare che la sua espressione è risultata ancor prima di co-cultura con cellule infiammatorie. Al contrario, HLA-G non è stato rilevato sulla superficie di AAA-MSC (Figura 11). Di conseguenza con questa analisi, HLA-G è stata valutata anche attraverso qPCR ed è risulta in una diminuita, anche se non significativa, espressione di mRNA HLA-G in AAA-MSCs (4 volte diminuito in AAA-MSCs; anche se non sono state osservate differenze significative), in confronto cMSC esposto alla stessa condizione infiammatoria (figure 11).

Effetti MSC sul ciclo cellulare di PBMC

Come previsto, le cMSC sono state in grado di inibire la sintesi del DNA di PBMC-PHA attivati al contrario di AAA-MSCs.

Come osservato nel saggio di BrDU PHA-PBMC le cMSC coltivate con PHA-PBMC hanno dimostrato un basso tasso di proliferazione ($p < 0,05$, one-way ANOVA test) di PHA-PBMC, considerando che la velocità di proliferazione misurata sul PHA-PBMC coltivate con AAA-MSCs era più elevata ($p < 0,05$, one-way ANOVA test) e abbastanza paragonabili a PHA-PBMC coltivate da sole (Figura 12).

I dati ottenuti dal saggio degli immunomodulatori sono stati arricchiti con l'analisi del ciclo cellulare di PBMC. La figura 13 è una rappresentazione dell'analisi del ciclo delle cellule e mostra la percentuale di PBMC, misurata mediante citometria a flusso, per ciascuna condizione di coltura, in presenza di una MSC sana o patologica. Le PBMC non attivate sono state impostate come controllo di riferimento, indicato dalla concentrazione del 100% durante la fase quiescente G0/G1 fase quiescente (100%), mentre il PHA associato alle colture di PBMC stimola la loro progressione lungo il ciclo cellulare (le seguenti percentuali sono state osservate per ciascuna cella fase del ciclo: 65,9% \pm 1.6 in G0-G1; 15,2% \pm 0.9 nella fase S e 18,9% \pm 4,8 in G2/fase M). La presenza di cMSCs in colture con PHA PBMC riduce fortemente la percentuale di attività nel corso degli stadi del ciclo cellulare (fase S: 8,6% \pm 0,2 e G2/M fase: 1,3% \pm 0,2) e rafforza la loro stabilizzazione durante il G0-G1 (91,2% \pm 1.4). PHA-PBMC coltivate in presenza di AAA-MSCs non mostrano differenze significative rispetto a PHA-PBMC coltivate da sole; anzi, hanno un comportato principalmente concentrato durante il G2/M fase (14,2% \pm 1,5) di G0/G1 (74,4% \pm 5.4), mentre la quantità di cellule in fase S è stata leggermente superiore a PBMC coltivate con CMSC (10,5 % \pm 0.9).

Iperespressione di MMP-9 nelle AAA-MSCs: potenziali meccanismi per modulare l'espressione a livello trascrizionale

Influenza sulla trascrizione di MMP-9

Le MMPs sono iperesprese in un contesto infiammatorio e molti approcci anti-infiammatori possono essere applicati per regolare la loro espressione. Per questo scopo, abbiamo indagato sul potenziale delle cMSC per regolare la trascrizione di MMP delle AAA-MSCs, attraverso la secrezione di molecole immunomodulatorie. La trascrizione di MMP è stata valutata mediante qPCR e le MMP-9 sono state ridotte in seguito a co-cultura di cellule sane cMSC e AAA MSCs (un 80% di riduzione osservata in confronto a AAA-MSCs controllo; $p=0,004$, test t accoppiati) (Figura 12).

Effetto inibitorio di citochine antinfiammatorie sull'espressione di MMP-9: IL-10

IL-10 è un anti-citochina antiinfiammatoria, ordinariamente espressa da MSC umane e coinvolta nel meccanismo di immunomodulazione. Abbiamo osservato che l'aggiunta di composti solubili di IL-10 alle culture di AAA-MSC, alla concentrazione di 20 ng/ml, per 24 h, ha portato alla riduzione della trascrizione di MMP-9. Pertanto, un approccio anti-infiammatorio, indirizzato verso le AAA-MSCs, potrebbe essere sviluppato per ripristinare la loro funzione danneggiata. (0,2 volte è diminuito rispetto al controllo non trattato, $p=0,04$, test t accoppiati) (Figura 14).

DISCUSSIONE

La parete vascolare arteriosa rappresenta un'entità dinamica essendo realizzata da diversi tipi cellulari, ognuno dei quali è in grado di contribuire in maniera diversa al processo di omeostasi del tessuto. Un alterato funzionamento cellulare e molecolare può verificarsi in alcuni casi come, conseguenza di difetti genetici o fattori ambientali, portando così a disturbi vascolari. Le malattie dei vasi sanguigni hanno una localizzazione eterogenea lungo l'albero arterioso a seconda delle caratteristiche strutturali della parete vascolare, che a sua volta dipende dalla eterogeneità delle cellule residenti e dalle loro alterazioni patologiche. Alcuni segmenti vascolari sono più suscettibili a sviluppare malattie specifiche come per esempio l'aorta addominale. L'aorta può essere suddivisibile in segmenti differenti: aorta ascendente, arco aortico, aorta toracica discendente e aorta addominale. L'aorta addominale ha peculiari caratteristiche morfologiche, consistenti in una diminuzione del contenuto di elastina corrispondente a un numero ridotto di unità lamellari (28-32), in confronto al segmento toracico (55-60). Questo aspetto, insieme ad una ridotta presenza di cellule muscolari lisce, rende l'aorta addominale più suscettibile alla formazione di aneurismi (Rubicondo et al, 2008).

Gli aneurismi aortici addominali (AAAs) sono una patologia degenerativa dell'aorta, attribuita ad un'estesa proteolisi della matrice extracellulare, che porta alla diminuzione di elastina, collagene e proteine, che sono responsabili della resistenza alla trazione del vaso. Il turnover della matrice extracellulare è un processo fisiologico, necessario per il mantenimento della omeostasi del tessuto e mediato da enzimi proteolitici, tra cui le MMP sono le più caratterizzate e studiate (Ritardo et al, 2007). Un'iperattività di MMP può portare ad uno alto stato di degradazione della matrice extracellulare che insieme alla deplezione di cellule muscolari lisce porta alla riduzione della parete dei vasi.

La presenza di infiltrati infiammatori, composti da linfociti T, B e macrofagi, è riportata in tessuti aneurismatici. Gli AAAs si distinguono in aterosclerotici/degenerativi e infiammatori. Gli AAAs infiammatori sono associati con un più ampio processo infiammatorio e sono più evidenti i segni e sintomi che accompagnano la loro storia naturale. Gli aneurismi non - infiammatorio sono per la maggior parte legati alle complicazioni aterosclerotiche, anche se le attuali linee di ricerche sono indirizzate ad indagare la natura del rapporto fra lesioni aterosclerotiche, infiammazione ed AAA. (Tonar et al, 2010). La maggior parte degli autori concordano con la teoria che, questi aneurismi nascono come conseguenza di lesioni aterosclerotiche. Accanto a questa differenza, l'infiltrato infiammatorio è comunque rappresentato in tutte le forme di aneurisma e di recente è stata sollevata la possibilità di una risposta immuno-mediata per la genesi dell'aneurisma. Uno dei possibili meccanismi riportato è il cosiddetto mimetismo molecolare che consiste nella condivisione di epitopi comuni tra antigeni self ed antigeni esterni, provocando un'attivazione delle cellule T anche contro un antigene self (Ozsvath et al, 1996; Oleszak et al, 2004). La stessa parete vascolare, in particolare nelle componenti di elastina e collagene, sono state proposte come antigeni in grado di indurre l'attivazione delle cellule T. A questo proposito, una risposta antigene-mediata delle cellule T, è stata suggerita come causa di sviluppo di AAA; l' aneurisma potrebbe essere visto quindi come una malattia autoimmune (Hirose e Tilson, 2001). Da questo punto di vista il target della malattia infiammatoria potrebbe rappresentare una strategia promettente per monitorare/limitare l'espansione dell'aneurisma e ridurre i rischi di rottura.

Le MSCs possono essere facilmente isolate da diversi tessuti, come il midollo osseo (Friednstein et al, 1970; Castro-Malaspina et al, 1980), il tessuto adiposo (Zuk et al, 2002), il sangue del cordone ombelicale (Erices et al, 2000), la parete vascolare (Ergün et al, 2011) etc. Le MSCs possono essere facilmente isolate da tessuti umani e espanse in colture

in vitro. Le note proprietà delle MSC di multilinearità, differenziazione e potenziale proliferativo possono essere sfruttate per il trattamento di molte patologie, comprese le malattie cardiovascolari, neurologiche e i disturbi del tessuto connettivo (Barry e Murphy, 2004). Inoltre, le MSCs sono ipo-immunogeniche, risorsa importante per la medicina dei trapianti e la patologia di origine infiammatoria cronica, (es. Chron morbo, patologie autoimmuni, ecc.). Le MSCs possiedono infatti la capacità di modulare negativamente la reazione immunitaria ed esercitare una funzione antinfiammatoria (Barry e Murphy, 2004; Chamberlain et al, 2007). Questa proprietà viene effettuata attraverso diversi meccanismi, mediata dal rilascio di citochine antinfiammatorie (TGF, IL-10), e di enzimi (IDO, NO). Essa conduce all'anergia di cellule e blocco del ciclo delle cellule T e B, inibizione di cellule NK (citotossicità Le Blanc e Ringdén, 2007; Ryan et al, 2007). È chiaro che le MSCs possono essere efficacemente impiegate per molte applicazioni cliniche, anche se l'ottimizzazione e la standardizzazione dei protocolli di isolamento non sono state ancora stabilite. Diverse fonti di tessuto come pure le diverse età dei donatori determinano un alto grado di eterogeneità, in modo che le preparazioni di MSCs contengono diversi sottoinsiemi di celle in termini di differenziazione e stato proliferativo (Hart, 2014).

Meno è noto sui potenziali effetti collaterali o nella partecipazione delle MSC nell'innesco e progressione di malattia. Alcuni lavori della letteratura hanno sollevato questo problema, suggerendo che le MSC, sotto condizioni specifiche, possono subire una riduzione delle loro funzioni base, facendo riferimento al loro potenziale proliferativo, la differenziazione e la immuno-modulazione. In queste condizioni il comportamento delle MSCs può evolvere in direzione patologica, portando all'avvio o aggravamento del danno tissutale. Per esempio, le MSCs isolate da pazienti affetti da osteoartrosi hanno dimostrato un basso potenziale proliferativo e ridotta differenziazione adipogenica e condrogenica (Murphy et

al, 2002). Alcuni autori suggeriscono che un difetto di MSC e della loro attività di immunosoppressione potrebbe esercitare un ruolo cruciale nelle patologie infiammatorie.

Dato che molte malattie arteriose hanno una base infiammatoria, abbiamo trovato interessante lo studio di MSCs residenti di parete vascolare. Sono state scoperte cellule progenitrici endoteliali con proprietà di cellule mesenchimali localizzate al livello della tonaca avventiziale al confine con la tonaca media (Zengin et al, 2006). Il nostro gruppo di ricerca ha ottenuto un'esperienza in questo campo, isolando popolazioni di MSCs dalla parete vasale di donatori sani (Pasquinelli et al, 2007; Pasquinelli et al, 2010). È interessante notare che queste cellule presentano alta resistenza a condizioni stressanti. In una precedente pubblicazione (Valente et al, 2014) l'isolamento delle MSC da arterie crioconservate è stata eseguita con successo. Le arterie appartenenti a donatori sani sono state isolate dopo 5 anni di conservazione in azoto liquido. Le cellule sono state coltivate secondo condizioni standard (37°C; 5% di CO₂) e non ha mostrato segni di sofferenza, al contrario esse sono state caratterizzate esprimendo tipici marcatori di cellule mesenchimali. Queste Vascular-Wall MSCs (VW-MSCs) hanno proprietà adipogenica, osteogenica, condrogenica, angiogenica e presentano inoltre proprietà clonogenica e attività immunoregolatrice.

Studiare la resistenza e la gestione delle MSC nel malato vascolare rappresenta il passo successivo dei nostri studi.

A questo proposito, un AAA costituisce un ideale modello patologico per eseguire valutazioni sulle caratteristiche e funzionalità di MSCs. Abbiamo pertanto raccolto dodici campioni di tessuto aortico proveniente da pazienti sottoposti al trattamento chirurgico tradizionale per AAA.

La prima osservazione fatta consiste nel rilevamento in situ di MSCs, valutata attraverso una immuno-colorazione per antigeni mesenchimali su sezioni di AAA. Accanto alla

grande quantità di cellule infiammatorie che invadono la parete dell'AAA, cellule positive per CD44 e CD90 potrebbero essere localizzate a livello della nicchia perivascolare. In seguito, ci siamo concentrati sulla componente di MSC della parete aortica sana. Le MSC sane e patologiche (AAA-MSCs) sono state confrontate su diversi livelli: caratteristiche morfologiche in vitro, immunofenotipo e profilo molecolare. Un numero consistente di AAA-MSCs è stato ottenuto dai tessuti raccolti e tutti i campioni cellulari ha rivelato caratteristiche di base analoghe a quelle delle nostre precedenti osservazioni su CMSC. Le AAA-MSCs sono visualizzate con una tipica forma fibroblastica e con adesione alla materia plastica del substrato di coltura, che rappresenta una peculiarità di identificazione di MSC. Quindi, le AAA-MSCs hanno mostrato un tipico pattern di antigeni di superficie di cellule mesenchimali (come dimostrato mediante citometria di flusso: marcatori mesenchimali e pericitari CD44, CD90, CD73, CD146 e PDGFR-beta sono stati ampiamente espressi sulla superficie di AAA-MSC, mentre antigeni ematopoietici e antigeni endoteliali CD34, CD14 e CD44 non sono stati rilevati).

L'immunofenotipo di AAA-MSC è del tutto speculare con le cMSC, come abbiamo osservato per i marcatori stemness. Noi abbiamo analizzato i marcatori tipici delle cellule staminali embrionali, rappresentati da NANOG, Oct.4 e SOX-2 che possiedono un ruolo regolatorio; questi geni compongono un' unità trascrizionale che attiva a valle i geni coinvolti nella pluripotenza e auto-rinnovamento delle cellule staminali. Questo gruppo di marcatori stemness è espresso da AAA-MSC e ad una semi-analisi quantitativa mediante Real Time qPCR è stato dimostrato che non esistono differenze significative tra soggetti sani e patologici.

Abbiamo poi esplorato le AAA-MSC dal punto di vista funzionale, indagando l'espressione di MMP e la capacità di contrastare la reazione immunitaria.

MMP-9 è nota per essere una proteina inducibile, anzi la sua espressione in genere dipende da fattori esterni, come TNF- α . MMP-2 e MMP-9 hanno dimostrato svolgere un ruolo decisivo nella degradazione della matrice extracellulare e quindi nell'origine e progressione di un AAA (Tamarina et al, 1997; Longo et al, 2002). Sulla base di queste premesse, abbiamo valutato i livelli di espressione di MMP-2, MMP-9 e i loro rispettivi inibitori tissutali, TIMP-1 E TIMP-2. I risultati più rilevanti sono stati osservati per l'espressione di MMP-9, sia a livello di mRNA che di livelli di espressione di proteine: una prominente trascrizione di mRNA (400 volte maggiore di cMSC) e la produzione di proteine sono stati osservati in AAA-MSCs); i livelli di MMP-2 e TIMP son stati abbastanza simili tra i due gruppi del nostro studio. Secondo studi della letteratura, l'EMMPRIN è stato associato con la placca aterosclerotica (Yoon et al, 2005) e la patogenesi di aneurisma (Chen et al, 2009), come induttore di MMP. Ulteriore conferma dei dati ottenuti su MSCs vascolare, è derivata dall'analisi dell'espressione tissutale di MMP-9. Un aumento dell' mRNA di MMP-9 è stato registrato in tessuti di AAA, che possono contenere differenti fonti cellulari di MMP, specialmente cellule infiammatorie, quali macrofagi.

Efficacemente, l'immunocolorazione per MMP-9 ha etichettato molte cellule infiammatorie, ma sono state rilevate anche positività di popolazioni MSC a MMP-9 tra cellule perivascolari di vasa vasorum e le cellule stromali.

Al fine di chiarire il meccanismo che porta le MSC a questo fenotipo patologico degradativo, abbiamo testato le AAA-MSCs per la loro attività immunomodulatoria.

La premessa per la seconda fase dello studio, deriva dal vasto infiltrato infiammatorio osservato all'interno della parete aortica e l'ipotesi che le AAA-MSCs potrebbe aver perso la loro innata capacità di modulare la reazione immunitaria. L'incorporazione di BrdU e i saggi del ciclo cellulare con PBMC stimolati con PHA e coltivati in presenza di AAA-

MSCs, hanno indicato le cellule infiammatorie in corso di proliferazione nel ciclo cellulare; PHA-PBMCs non si arrestano alla fase G0/G1, come si verifica in presenza di CMSC. La continua proliferazione di PBMC-PHA potrebbe significare che le AAA-MSC si comportano come cellule quiescenti, in grado di arrestare la proliferazione di PHA-PBMC, il che può essere eventualmente spiegato con la ridotta espressione di IL-10 e HLA-G. La MSC con difettosa immunomodulazione potrebbe rappresentare un passo importante nella evoluzione AAA.

Le MMP possono essere regolate a molti livelli, compresa la trascrizione, così abbiamo valutato i possibili meccanismi di regolamentazione a livello di trascrizione per MMP-9. Esperimenti di co-coltura di MSCs sane e patologiche hanno evidenziato una significativa riduzione di trascrizione MMP-9, a seguito di un contatto diretto tra MSC sane e AAA-MSCs; una diminuzione, anche se meno evidente, è stata osservata in AAA-MSCs coltivate con cMSC in mezzi condizionati, suggerendo che il CMSC possono disciplinare mediatori patologici a livello di mRNA, anche in una maniera paracrina. Così abbiamo supposto il coinvolgimento di IL-10, ha dimostrato di inibire la trascrizione MMP-9 nella placenta umana (trofoblasto Roth e Fischer, 1999). Infatti, i dati preliminari hanno mostrato una regolazione trascrizionale negativa di MMP-9 in AAA-MSC esposti a IL-10, indicando che IL-10 potrebbe rappresentare una strategia chiave nel regolamento di MMP, oltre a ripristinare l'immunomediazione MSC (Rizzo et al, 2011).

LIMITI

Nella selezione del gruppo di controllo il numero dei soggetti è stato limitato (3 controlli sani vs 12 pazienti portatori di AAA) e inoltre non vi è parità di genere ed età col gruppo di studio. Per quanto riguarda il divario di età, non possiamo escludere che i nostri dati sull'iper-espressione di mRNA e attività di MMP-9 potrebbero essere il risultato del fisiologico processo di invecchiamento vascolare. I nostri controlli possono essere considerati come soggetti sani con nessun rischio cardiovascolare e come controlli negativi per espressione di mediatori molecolari di cellule MSCc perivascolari.

CONCLUSIONI

Il presente studio ha valutato le caratteristiche funzionali di un gruppo di MSC isolata da un'aorta affetta da AAA. I meccanismi molecolari coinvolti nel rimodellamento arterioso e nell'infiammazione cronica, caratteristica della malattia aneurismatica, non influenzano le proprietà di sopravvivenza/auto-rinnovamento delle MSC della nicchia vascolare. Nel frattempo, AAA-MSCs hanno funzioni difettose, in termini di turnover di ECM e di immuno-modulazione. Infatti, AAA-MSCs hanno dimostrato di iper-esprimere MMP-9 e il suo induttore EMMPRIN rispetto al confronto con MSCs isolate in parete aortica sana. Inoltre, le AAA-MSCs sono più deboli in termini di immunomodulatori rispetto alle cellule immunitarie. Questo è opposto a ciò che è stato documentato tra MSC isolate da aorta sana, suggerendo una chiara disfunzione MSC sotto il quadro patologico. D'altro canto, sia le MSCs che alcuni fattori solubili associati con attività anti-infiammatoria hanno mostrato di poter modulare negativamente l'MMP-9 a livello trascrizionale delle AAA-MSCs. Questi dati preliminari suggeriscono che la disfunzione di AAA-MSCs può essere risolta attraverso un approccio anti-infiammatorio. Sulla base di queste osservazioni, sarebbe di grande importanza esplorare i meccanismi e i bersagli molecolari in grado di ripristinare e migliorare l'immunomodulazione di AAA-MSCs. Approcci incentrati sulla funzione di MSC, volti a potenziare le loro capacità terapeutiche potrebbero rappresentare nuove strategie promettenti per monitorare la progressione di un aneurisma.

TABLES

Tabella 1

DAAA, aneurisma aortico addominale diametro; LDL e di lipoproteina a bassa densità; HDL, lipoproteina ad alta densità; CAD, la malattia delle arterie coronarie; COPD, malattia polmonare ostruttiva cronica; CVD, cerebro-vascolari malattia cronica; PAOD, arteriosa periferica malattia ostruttiva; CRF, insufficienza renale cronica.

Clinical characteristics of AAA patients (n=12)	
Age (mean \pm S.D.)	69.2 \pm 5
Sex	Males
DAAA (mean \pm S.D.)	73 \pm 3 mm
Colesterol (mean \pm S.D.)	158 \pm 25 mg/dl
LDL(mean \pm S.D.)	90 \pm 24 mg/dl
HDL(mean \pm S.D.)	49 \pm 8 mg/dl
Triglycerids (mean \pm S.D.)	100 \pm 31 mg/dl
Smoking (%)	42
Hypertension (%)	100
CAD (%)	25
COPD (%)	25
CVD (%)	17
PAOD (%)	33
CRF (%)	25
Statins (%)	75

Tabella 2

*I donatori morto in seguito emorragia cerebrale sono stati esclusi in quanto può comportare incremento di MMP e di interferire con la nostra analisi.

Basic characteristics of healthy donors (control group)	
Age (mean \pm S.D.)	25 \pm 6.5
Sex	F:M=2:1
Clinical data	No cardiovascular risk, absence of aortic dilation, *Main death cause: traumatic brain injury (excluded cerebral hemorrhagy)

FIGURES

Figure 1

H/E effettuata su tessuti prelevati da AAA mette in evidenza i principali tratti distintivi di un AAA: (a) disorganizzazione degli strati vascolari e degradazione della tonaca media; (b) infiltrato infiammatorio e formazione neo vessel (freccia); (c) presenza di placche di lipidi entro lo strato di intima. IC: cellule infiammatorie; LP: placca lipidica.

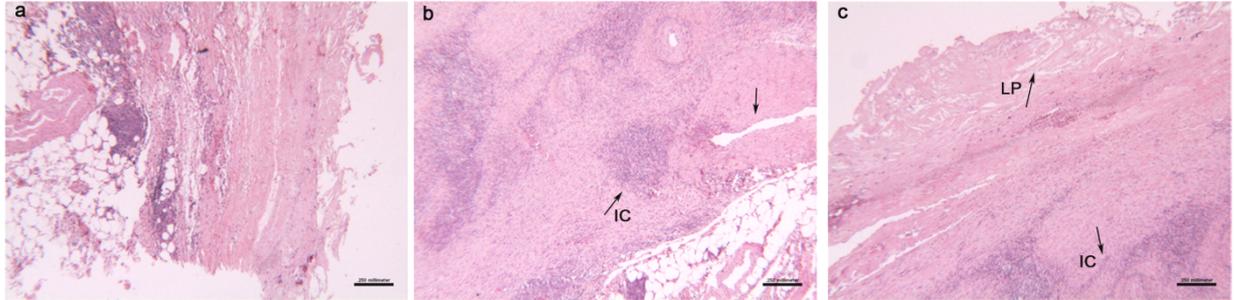


Figure 2

CD44+ (a,c) e CD90+ (b, d) evidenziano le popolazioni cellulari osservata in tessuto di AAA; accanto alle cellule di tipo infiammatorio mononucleare, CD44 viene espresso da cellule della nicchia perivascolari che esprimono anche CD90 molecola. (barra di scala indica 50 μ m).

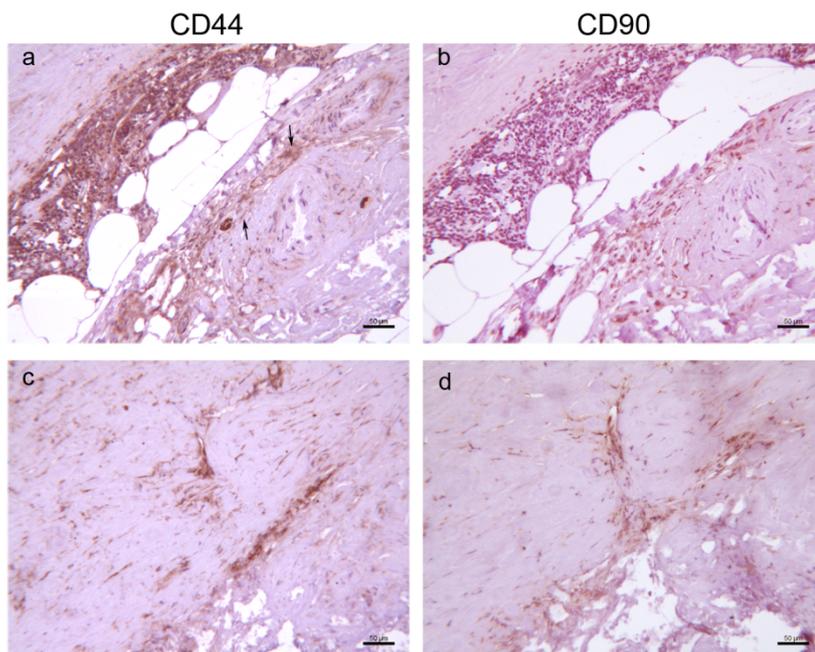


Figure 3

la trascrizione di mRNA di MMP-9 da sani e tessuto AAA, eseguita mediante qPCR. I risultati mostrano come piegare le differenze fra tessuto sano e malato rispetto. Il gene GUS è stato utilizzato come servizio di pulizie. MMP-9 espressione della proteina a livello della parete aortica: (b) sano tessuto aortico; (c), (d), (e) tessuto AAA (barra di scala indica 10 μ m)

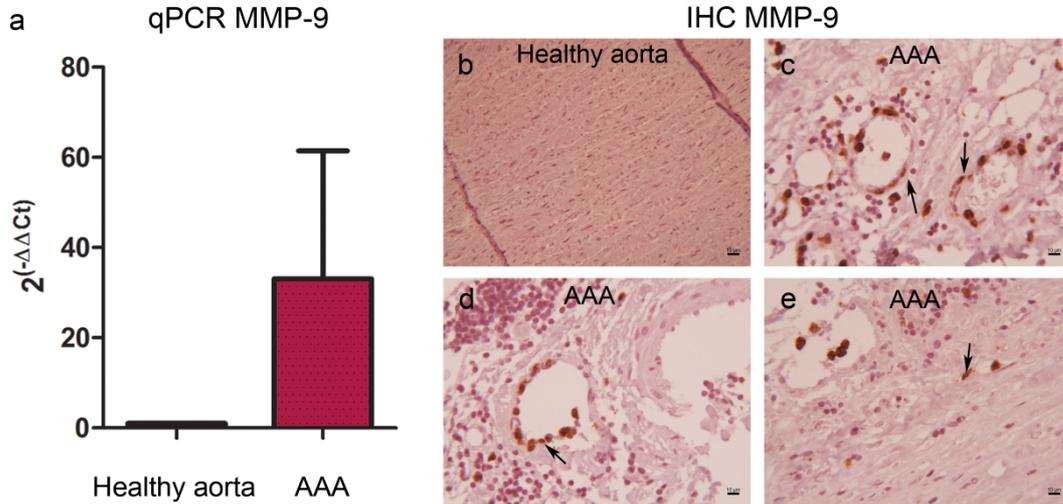


Figure 4

(a), (b) colture primarie eterogenee di AAA-MSCs, visualizzazione di morfologia di un tipico tipo fibroblasto e una con lunghi pseudopodi citoplasmatici (a, ingrandimento 100x; b, 200x di ingrandimento); (c), (d) AAA-MSCs confluenti, aspetto più omogeneo (c, ingrandimento 100x; d, 200x di ingrandimento).

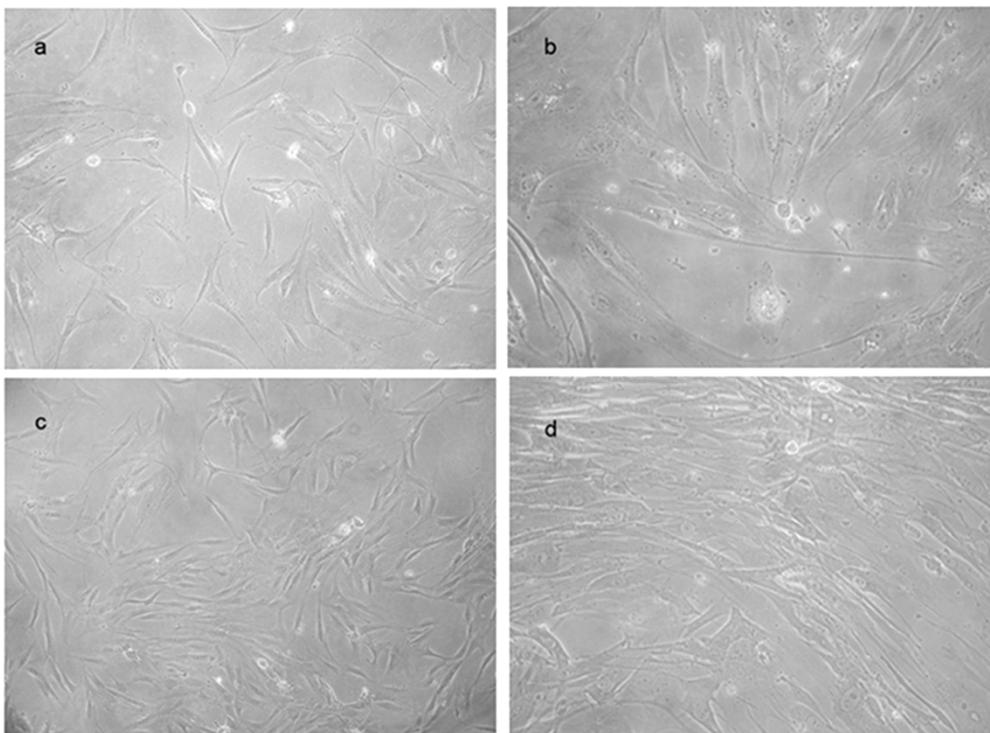


Figure 5

I pannelli che rappresentano l'elaborazioni della citometria di flusso provano una condivisa espressione dell'antigene superficiale tra soggetti sani e patologici, suggerendo un'origine comune per le due popolazioni cellulari.

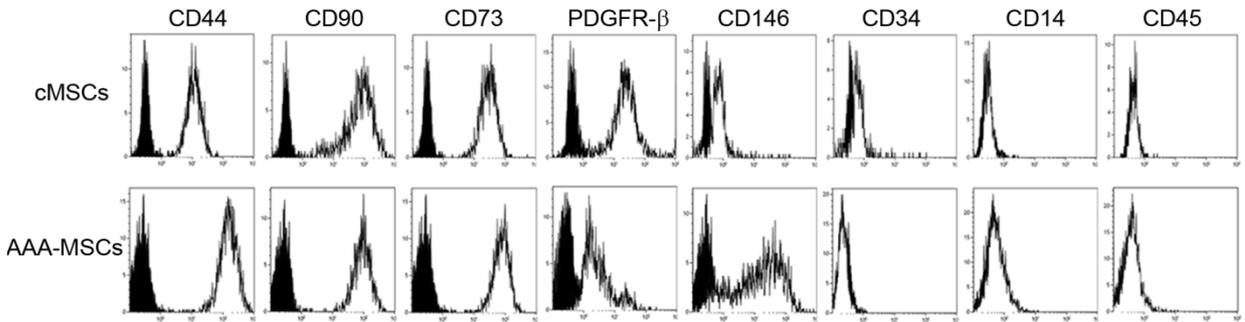


Figure 6

(a) Nanog (326 bp), Oct-4 (380-402 bp) e Sox-2 (208 bp) espressione in AAA-MSC mediante RT-PCR. (b) analisi semiquantitative di geni stemness AAA-MSCs rispetto al CMSC. I risultati sono espressi come variazione di piegatura rispetto al gruppo di controllo. I valori sono rappresentati come media \pm deviazione standard e sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato (* $p < 0,05$, non accoppiata t test).

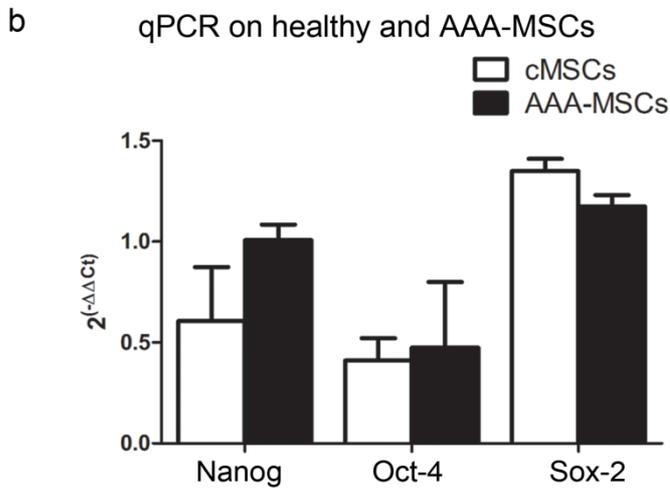
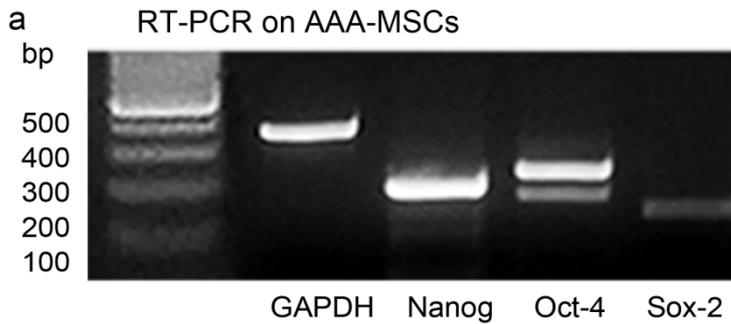


Figure 7

(a) relativa di espressione di mRNA di MMP-2, MMP-9, l'EMMPRIN, TIMP-1 E TIMP-2 in AAA-MSCs rispetto al CMSC. (b) MMP-9/TIMP-1 e di MMP-2/TIMP-2 rapporti. I risultati sono espressi come variazione di piegatura rispetto al CMSC. I valori sono rappresentati come media \pm deviazione standard e sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato (* $p < 0,05$, non accoppiata t test).

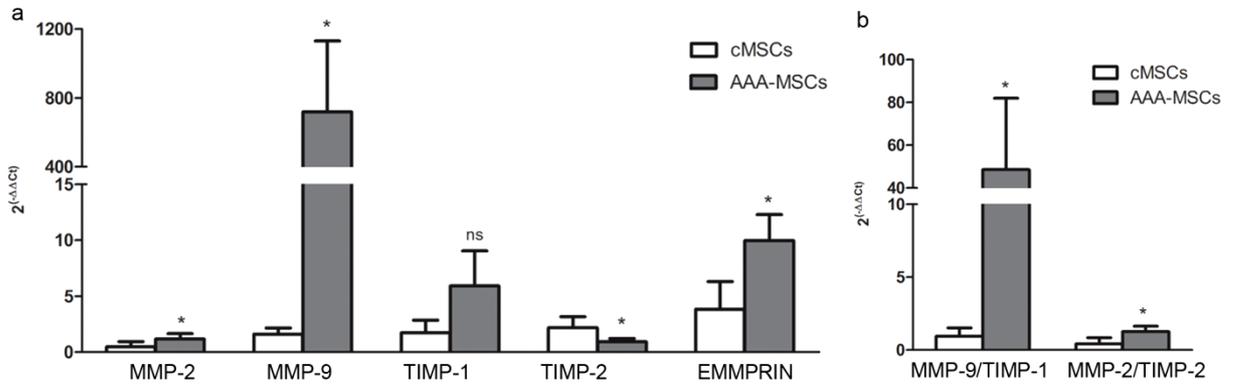


Figure 8

Immunoblot su AAA-MSCs e cMSCs lisati cellulari e bande quantificazione mediante densitometria ImageJ software.

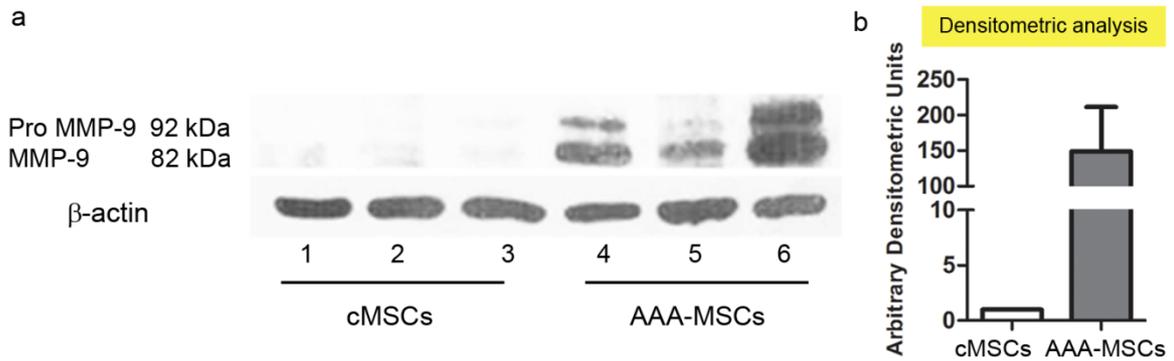


Figure 9

la zimografia alla gelatina eseguita su AAA-MSC cMSC e mezzi condizionati: MMP-9 a 92 kDa potrebbe essere rilevato solo in AAA-MSC corsia (corsie 1-4), considerando che MMP-2 era ampiamente identificato in corrispondenza di 72 e 62 kDa, in tutte le corsie, incluso CMSC (corsie 5-6); Corsia 7 si riferisce alla HCT116, utilizzata come riferimento per identificare bande di MMP.

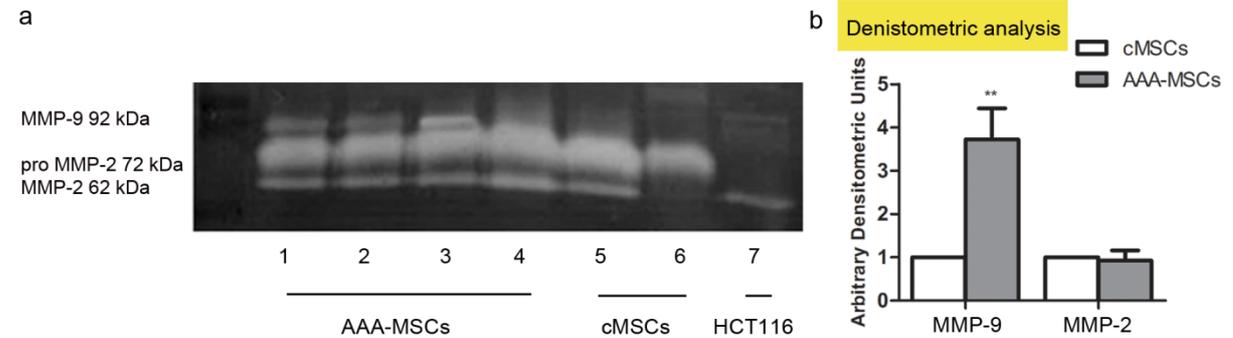


Figure 10

I risultati sono espressi come variazione di piegatura rispetto ai controlli (CMSC co-coltivate con PBMC attivate). I valori sono rappresentati come media \pm deviazione standard e sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti (* $p < 0,05$; spaiati t test).

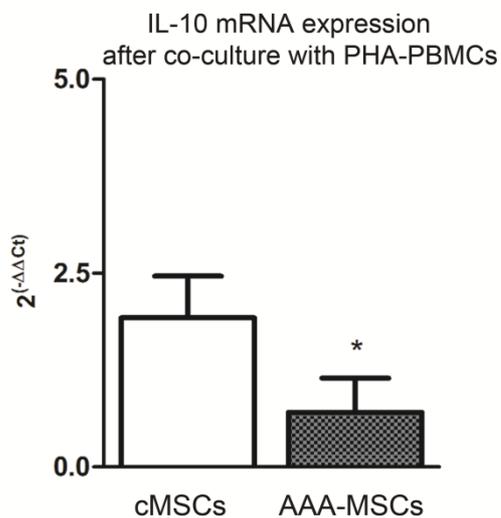


Figure 11

Espressione HLA-G su AAA-MSCs e CMSC, in condizioni basali (a) e dopo 72 h co-cultura con PBMC attivate (b). Gli istogrammi di colore viola si riferiscono a AAA-MSCs, mentre gli istogrammi bianchi sono indicati per CMSC. I risultati sono mostrati come un esempio rappresentativo di almeno tre esperimenti indipendenti. (c) HLA-G espressione di mRNA in AAA-MSCs confrontato con CMSC.

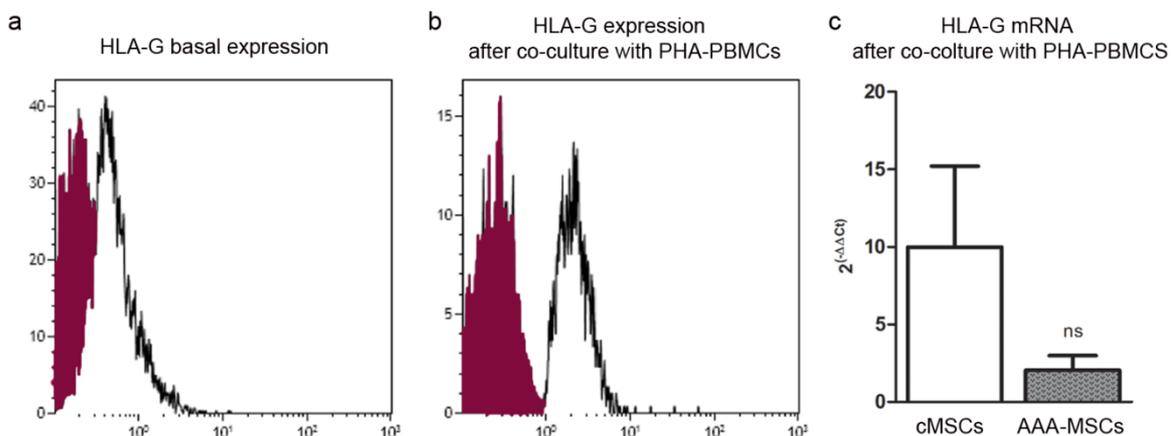


Figure 12

Come osservato nel saggio di BrDU PHA-PBMC le cMSC coltivate con PHA-PBMC hanno dimostrato un basso tasso di proliferazione ($p < 0,05$, one-way ANOVA test) di PHA-PBMC, considerando che la velocità di proliferazione misurata sul PHA-PBMC coltivate con AAA-MSCs era più elevata ($p < 0,05$, one-way ANOVA test) e abbastanza paragonabili a PHA-PBMC coltivate da sole

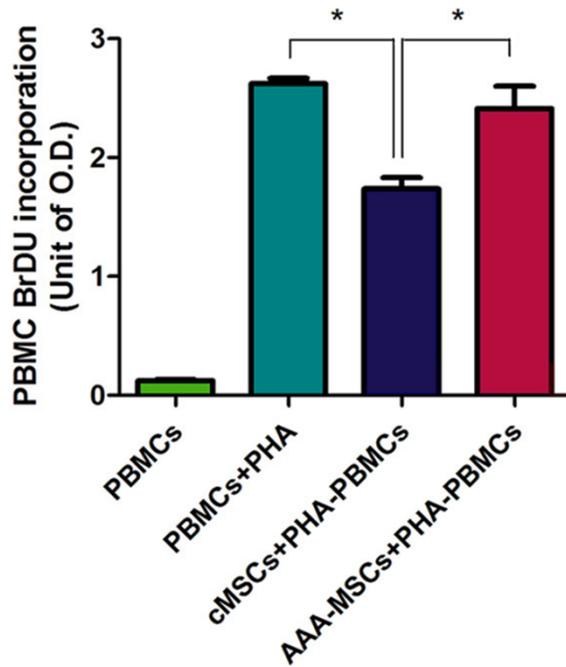
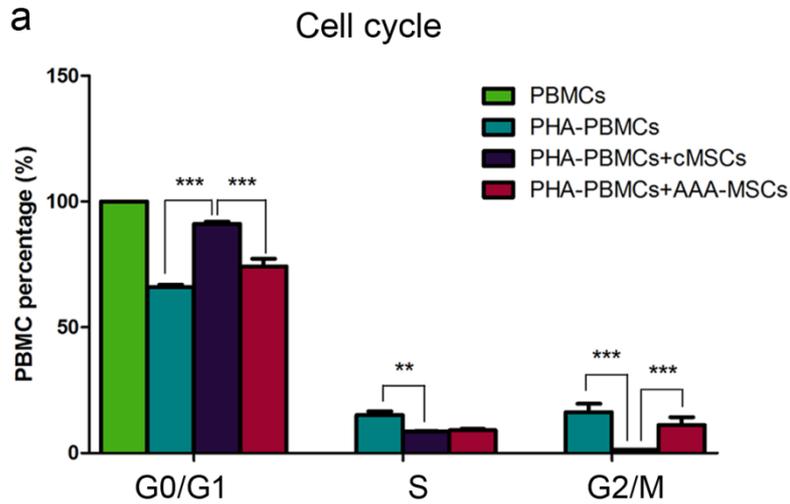


Figure 13

La presenza di cMSCs in colture con PHA PBMC riduce fortemente la percentuale di attività nel corso degli stadi del ciclo cellulare (fase S: $8,6\% \pm 0,2$ e G2/M fase: $1,3\% \pm 0,2$) e rafforza la loro stabilizzazione durante il G0-G1 ($91,2\% \pm 1,4$). PHA-PBMC coltivate in presenza di AAA-MSCs non mostrano differenze significative rispetto a PHA-PBMC coltivate da sole; anzi, hanno un comportamento principalmente concentrato durante il G2/M fase ($14,2\% \pm 1,5$) di G0/G1 ($74,4\% \pm 5,4$), mentre la quantità di cellule in fase S è stata leggermente superiore a PBMC coltivate con CMSC ($10,5\% \pm 0,9$)

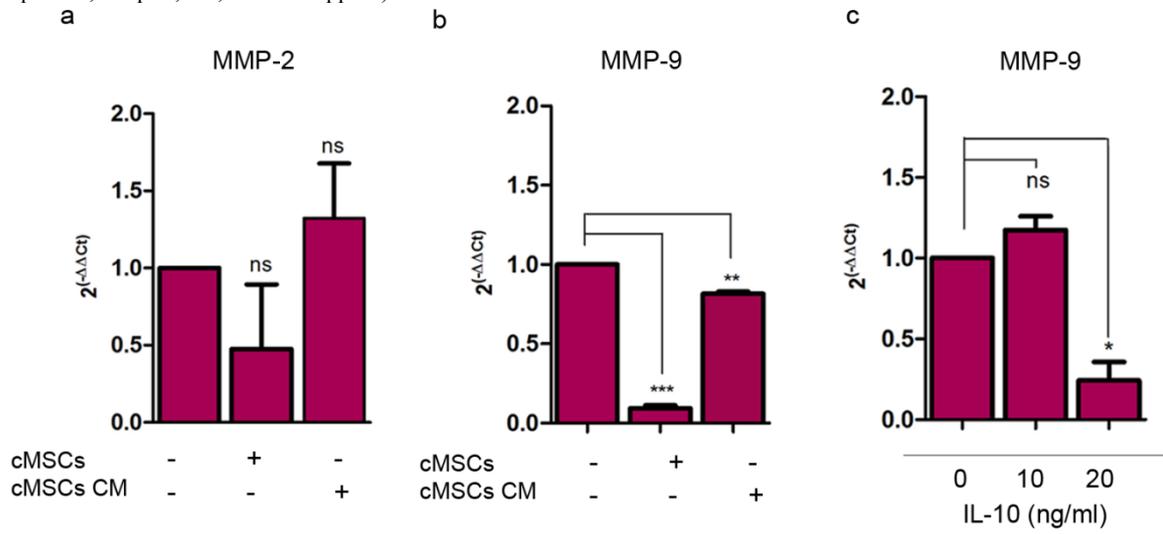


b PBMC Percentage

Culture condition	% G0/G1	% S	% G2/M
PBMCs	100	0	0
PHA-PBMCs	65.9 ± 1.6	15.1 ± 0.9	18.9 ± 4.8
PHA-PBMCs + cMSCs	91.2 ± 1.4	8.6 ± 0.2	1.3 ± 0.2
PHA-PBMCs + AAA-MSCs	74.4 ± 5.4	10.5 ± 0.9	14.2 ± 1.5

Figure 14

la trascrizione di MMP-2 (a) e di MMP-9 (b) in seguito a AAA-MSCs co-coltivate con MSCs e AAA-MSCs coltivate in presenza di mezzi condizionati. (c) La diminuzione di trascrizione di MMP-9 in AAA-MSCs esposti a citochina anti-infiammatoria IL-10. I risultati sono espressi come variazione rispetto ai non trattati AAA-MSCs. I valori sono rappresentati come media \pm deviazione standard e sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; test t accoppiati). CM: mezzi condizionati.



BIBLIOGRAPHY

Aggarwal, S., Qamar, A., Sharma, V., & Sharma, A. (2011). Abdominal aortic aneurysm: A comprehensive review. *Exp Clin Cardiol* 16(1), 11–15.

Barry, F. P., & Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 568–584. doi:10.1016/j.biocel.2003.11.001.

Barry, F., Boynton, R. E., Liu, B., & Murphy, J. M. (2001). Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res*. 268, 189–200.

Bazzoni, G., & Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 84, 869–901. doi:10.1152/physrev.00035.2003.

Biasetti J., Gasser T.C, Auer M., Hedin U., Labruto F. (2010). Hemodynamics of the normal aorta compared to fusiform and saccular abdominal aortic aneurysms with emphasis on a potential thrombus formation mechanism. *Ann Biomed Eng*, 38: 380–390.

Boyer, Laurie A. et al. (2005). Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 122(6), 947 – 956.

Brooks, A.R., Lelkes, P.I., Rubanyi, G.M. (2002). Gene expression profiling of human aortic endothelial cells exposed to disturbed flow and steady laminar flow. *Physiol Genomic* 9, 27–41.

Bunnell, B. a, Betancourt, A. M., & Sullivan, D. E. (2010). New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 1, 34. doi:10.1186/scrt34.

Caplan AI. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9:641–650.

Castro-Malaspina, B. H., Gay, E., Resnick, G., Broxmeyer, H. E., Meyers, P., & Moore, A. S. (1980). Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 56(2).

Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., & Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25, 2739–2749. doi:10.1634/stemcells.2007-0197.

Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643–655.

Chen XF, Wang JA, Hou J, Gui C, Tang LJ, Chen XQ et al. (2009). Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is present in smooth muscle cells of human aneurysmal aorta and is induced by angiotensin II in vitro. *Clin Sci* 116(11):819-826, doi: 10.1042/CS20080235.

Cohen, M., A. Meisser, L. Haenggeli, P. Bischof. (2006). Involvement of MAPK pathway in TNF- α -induced MMP-9 expression in human trophoblastic cells. *Mol Hum Reprod* 12: 225–232.

Cook CL, Weiser MCM, Schwartz PE, Jones CL, Majack RA. (1994). Developmentally timed expression of an embryonic growth phenotype in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 79:189–196.

Crawford JL, Stowe CL, Safi HJ, Hallman CH, Crawford ES. (1985). Inflammatory aneurysms of the aorta. *J Vasc Surg* 2:113–124.

Daley, W. P., Peters, S. B., & Larsen, M. (2008). Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci* 121, 255–264. doi:10.1242/jcs.006064.

Danese, S., M. Sans, F. Scaldaferrri, A. Sgambato, S. Rutella, A. Cittadini, J. M. Pique, J. Panes, J. A. Katz, A. Gasbarrini, and C. Fiocchi. (2006). TNF- α blockade down-regulates the CD40/CD40L pathway in the mucosal microcirculation: a novel anti-inflammatory mechanism of infliximab in Crohn's disease. *J Immunol* 176: 2617–2624.

Davani, S., Marandin, A., Mersin, N., Royer, B., Kantelip, B., Herve, P., Etievent, J. P., & Kantelip, J. P. (2003). Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation* 108, 11253–11258.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. (2000). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44:1928-42.

Deng, W., Obrocka, M., Fischer, I., & Prockop, D. J. (2001). In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 148–152.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, MagniMet al. (2002). Humanbonemarrow stromal cells suppress T lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99:3838– 43.

Djouad, F., Fritz, V., Apparailly, F., Louis-Plence, P., Bony, C., Sany, J et al. (2005). Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 52(5), 1595–1603. doi:10.1002/art.21012.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315-7.

Dubost C, Allary M, Oeconomos SN. (1952) Resection of an aneurysm of the abdominal aorta: Reestablishment of the Continuity by a Preserved Human Arterial Graft, with Result After Five Months. *AMA Arch Surg* 64(3):405-408. doi:10.1001/archsurg.1952.01260010419018.

Ergün, S., Tilki, D., & Klein, D. (2011). Vascular wall as a reservoir for different types of stem and progenitor cells. *Antioxid Redox Signal* 15(4), 981–995. doi:10.1089/ars.2010.3507.

Erices A, Conget P, Minguell JJ. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109(1):235-42.

Eyre ER, Paz MA, Gallop PM. (1984). Cross-linking in collagen and elastin. *Annu Rev Biochem* 53: 717–748.

Fini, ME, Cook, JR., Mohan, R., Brinckerhoff, CE. (1998). Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. In: Parks, WC.; Mecham, RP., editors. *Matrix Metalloproteinases*. New York: Academic; p. 299-356.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3:393–403.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4:267–274.

G. Martin. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 7634.

Gabison, E. E., Hoang-Xuan, T., Mauviel, A., & Menashi, S. (2005). EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie* 87, 361–368. doi:10.1016/j.biochi.2004.09.023.

Gasser, T. C., Ogden, R. W., & Holzapfel, G. a. (2006). Hyperelastic modelling of arterial layers with distributed collagen fibre orientations. *J R Soc Interface* 15–35. doi:10.1098/rsif.2005.0073.

Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 105:2821–7.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 74:111–122.

Gómez-Gavero MV, Lovell-Badge R, Fernández-Avilés F, Lara-Pezzi E. (2012). The vascular stem cell niche. *J Cardiovasc Transl Res* 5(5):618-30.

Goodell, M.A. (2003). Stem-cell “plasticity”: befuddled by the muddle. *Curr. Opin. Hematol.* 10, 208–213.

Hamano, K., T. S. Li, M. Takahashi, T. Kobayashi, B. Shirasawa, H. Ito, and N. Zempo. (2003). Enhanced tumor necrosis factor- expression in small sized abdominal aortic aneurysms. *World J Surg* 27: 476–480.

Hart, D.A. (2014). Why Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Heterogeneity in Specific Environments? – Implications for Tissue Engineering Applications Following Injury or Degeneration of Connective Tissues. *J. Biomed Sci Eng.* 7, 526-532.

Hingorani, A., E. Ascher, M. Scheinman, W. Yorkovich, P. DePippo, C. T. Ladoulis, and S. Salles-Cunha. (1998). The effect of tumor necrosis factor binding protein and interleukin-1 receptor antagonist on the development of abdominal aortic aneurysms in a rat model. *J Vasc Surg* 28: 522–526.

Hirose, H. and Tilson, M. D. (2001). Abdominal Aortic Aneurysm As an Autoimmune Disease. *Ann N Y Acad Sci* 947: 416–418. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03976.x.

Holzappel, G. A, Gasser, T. C., Ogden, R. W. (2000). A new constitutive framework for arterial wall mechanics and a comparative study of material models. *J Elasticity*, 61, 1–48.

Horwitz, E. M., Prockop, D. J., Fitzpatrick, L. A., Koo, W. W., Gordon, P. L., Neel, M., Sussman, M., Orchard, P., Marx, J. C., Pyeritz, R. E., & Brenner, M. K. (1999). Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 5, 309–313.

Jacob, M. P., Badier-Commander, C., Fontaine, V., Benazzoug, Y., Feldman, L., Michel, J. B. (2001). Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. *Pathologie-Biologie*, 49(01), 326–332. doi:10.1016/S0369-8114(01)00151-1.

Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R. et al. (2002a). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41–49.

Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M., Verfaillie, C.M. (2002b). Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp. Hematol.* 30, 896–904.

Jones, D. L., Wagers, A. J. (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9,11–21. doi:10.1038/nrm2319.

Juvonen, J., H. M. Surcel, J. Satta, A. M. Teppo, A. Bloigu, H. Syrjala, J. et al. (1997). Elevated circulating levels of inflammatory cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2843–2847.

Kapp, U., Mertelsmann, R. (2001). Plasticity of stem cells. *Ernst Schering Res Found Workshop* 1–17.

Karystinou A, Dell'Accio F, Kurth TB, Wackerhage H, Khan IM, Archer CW et al. (2009). Distinct mesenchymal progenitor cell subsets in the adult human synovium. *Rheumatology* 48(9):1057-64. doi: 10.1093/rheumatology/kep192. Epub 2009 Jul 14.

Koc, O. N., Day, J., Nieder, M., Gerson, S. L., Lazarus, H. M., & Krivit, W. (2002). Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant* 30, 215–222.

Koch AE, Haines GK, Rizzo RJ, et al. (1990) Human abdominal aortic aneurysms-immunophenotypic analysis suggesting an immunemediated response. *Am J Path* 137:1199-1213.

Kotze C. W. and Ahmed I. G. (2011). Etiology and Pathogenesis of Aortic Aneurysm, Etiology, Pathogenesis and Pathophysiology of Aortic Aneurysms and Aneurysm Rupture, Prof. Reinhart Grundmann (Ed.), ISBN: 978-953-307-523-5, InTech, doi: 10.5772/18257.

Lakshmipathy, U., Verfaillie, C. (2005). Stem cell plasticity. *Blood Reviews* 19, 29–38. doi:10.1016/j.blre.2004.03.001.

Latifi HR, Heiken JP. (1992). CT of inflammatory abdominal aortic aneurysm: development from an uncomplicated atherosclerotic aneurysm. *J Comput Assist Tomogr* 16,484-486.

Le Blanc, K., Ringdén, O. (2007). Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med* 262, 509–525. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01844.x

Le Rond S, Azema C, Krawice-Radanne I et al. (2006). Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immuno-suppressive/regulatory suppressive/regulatory T cells. *J Immunol* 176, 3266–3276.

Lehoux, S., Castier, Y., Tedgui, A. (2006). Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Int Med* 259, 381–392. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01624.x.

Li, B., Fu, J., Chen, P., Zhuang, W. (2010). Impairment in Immunomodulatory Function of Mesenchymal Stem Cells from Multiple Myeloma Patients. *Arch Med Res* 41(8), 623–633. doi:10.1016/j.arcmed.2010.11.008.

Li, Y.-S. J., Haga, J. H., & Chien, S. (2005). Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J Biomech* 38, 1949–1971. doi:10.1016/j.jbiomech.2004.09.030.

Lindholt JS, Vammen S, Fasting H, Henneberg EW, Heickendorff L. (2000). The plasma level of matrix metalloproteinase 9 may predict the natural history of small abdominal aortic aneurysms: a preliminary study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 20: 281–85.

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4):402-8.

Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. (2002) Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* 110(5):625-632.

Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2011). Extracellular Matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, 1–24. doi:10.1101/cshperspect.a005058.

M. Evans and M. Kaufman. (1981). *Nature* 292, 154.

Malek, A.M., Alper, S.L., Izumo, S. (1999). Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 282, 2035–2042.

Mannello F. (2006). Multipotent mesenchymal stromal cell recruitment, migration, and differentiation: what have matrix metalloproteinases got to do with it? *Stem Cells*. 24:1904-1907.

Matsuki, T., K. Isoda, R. Horai, A. Nakajima, Y. Aizawa, K. Suzuki, F. et al (2005). Involvement of tumor necrosis factor in the development of T cell-dependent aortitis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Circulation* 112: 1323–1331.

McElreavey, K.D., Irvine, A.I., Ennis, K.T., McLean, W.H. (1991). Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem. Soc. Trans* 19, 29S.

McGregor JC, Pollock JG, Anton HC. (1975). The value of ultrasonography in the diagnosis of abdominal aortic aneurysm. *Scott Med J* 20: 133–37.

McMaster MT, Librach CL, Zhou Y et al. (1995). Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol* 154:3771–3778.

Meshorer E., Misteli T. (2006). Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(7):540-6.

Michel, J. B., Martin-Ventura, J. L., Egido, J., Sakalihasan, N., Treska, V., Lindholt, J. et al. (2011). Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res* 90, 18–27. doi:10.1093/cvr/cvq337.

Murphy, J. M., Dixon, K., Beck, S., Fabian, D., Feldman, A., & Barry, F. (2002). Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 46(3), 704–713. doi:10.1002/art.10118

Nishikawa D.C, Martin Jakt L., Era T. (2007) Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology. *Nat Rev MolCell Biol* 8, 502-507 doi:10.1038/nrm2189

Nitecki SS, Hallett JW Jr, Stanson AW, et al. (1996). Inflammatory abdominal aortic aneurysms: new clinical implications from a case control study. *J Vasc Surg* 23:860-869.

O'Connor, T. P., Crystal, R. G. (2006). Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders, *Nat Rev Gen* 7, 261–276 doi:10.1038/nrg182

Oleszak EL, Chang JR, Friedman H, Katsetos CD, Platsoucas CD. (2004). Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis. *Clin Microbiol Rev* 17:174 –207.

Ozsvath K. J., Hirose, H., Xia, S. and Tilson, M. D. (1996). Molecular Mimicry in Human Aortic Aneurysmal Diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 800: 288–293. doi: 10.1111/j.1749-6632.1996.tb33335.x.

Paravastu SCV, Jayarajasingam R, Cottam R, Palfreyman SJ, Michaels JA, Thomas SM. (2014). Endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. *Cochrane Database Syst Rev*, Issue 1. Art. No.: CD004178. doi: 10.1002/14651858.CD004178.pub2.

Parodi JC, Palmaz JC, Barone HD. (1991). Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 5: 491–99.

Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 4:617–629.

Pasquinelli G, Preda P, Gargiulo M, et al. (1993). An immunohistochemical study of inflammatory abdominal aortic aneurysms. *J Submicrosc Cytol Pathol* 25:103-112.

Pasquinelli G, Tazzari PL, Vaselli C, Foroni L, Buzzi M, Storci G et al. (2007). Thoracic aortas from multiorgan donors are suitable for obtaining resident angiogenic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 25: 1627–1634.

Pasquinelli, G., Tazzari, P. L., Vaselli, C., Foroni, L., Buzzi, M., Storci, G et al. (2007). Thoracic aortas from multiorgan donors are suitable for obtaining resident angiogenic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 25, 1627–1634. doi:10.1634/stemcells.2006-0731.

Pennell RC, Hollier LH, Lie JT, Bernatz PE, Joyce JW, Pairolero PC, Cherry KJ, Hallett JW. (1985). Inflammatory abdominal aortic aneurysms: a thirty-year review. *J Vasc Surg* 2(6):859–869.

Pfeffer, K. (2003). Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14: 185–191.

Pittenger, M. F., Mackay, a M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D. et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147. doi:10.1126/science.284.5411.143

Praillet C, Grimaud JA, Lortat-Jacob H. (1998). Les protéoglycannes. I. Molécules aux multiples fonctions ... futures molécules thérapeu- tiques ? *M/S* 14: 412-20.

Psaltis, P. J., Harbuzariu, A., Delacroix, S., Holroyd, E. W., Simari, R. D. (2011). Resident vascular progenitor cells - diverse origins, phenotype and function. *J Cardiovasc Transl Res* 4(2), 161–176. doi:10.1007/s12265-010-9248-9.

Raffetto, J. D., & Khalil, R. A. (2008). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 75(2), 346–359. doi:10.1016/j.bcp.2007.07.004.

Resnick, N., Yahav, H., & Shay-Salit, a. (2003). Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol* 81, 177–199.

Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* 18, 399–404.

Ries, C., Egea, V., Karow, M., Kolb, H., Jochum, M., Neth, P. (2007). MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: Differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* 109, 4055–4063. doi:10.1182/blood-2006-10-051060.

Ross R. (1973).The elastic fiber. *J Histochem Cytochem* 21, 199–208.

Roth, I., & Fisher, S. J. (1999). IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion. *Dev Biol* 205(1), 194–204. doi:10.1006/dbio.1998.9122.

Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C et al. (1997). Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 94: 11520–11525.

Ruddy, J. M., Jones, J. a., Spinale, F. G., Ikonomidis, J. S. (2008). Regional heterogeneity within the aorta: Relevance to aneurysm disease. *Thorac Cardiovasc Surg* 136(5), 1123–1130. doi:10.1016/j.jtcvs.2008.06.027.

Ryan, J. M., Barry, F., Murphy, J. M., & Mahon, B. P. (2007). Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 149, 353–363. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03422.x.

S.M. Arribas, A. Hinek, M.C. Gonzalez. (2006) Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther* 111 771–791.

Sakalihan N, Limet R, Defawe OD. (2005). Abdominal aortic aneurysm. *Lancet* 365(9470):1577-89.

Sanchez-Ramos, J. R. (2002). Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res* 69, 880–893.

Sarén P, Welgus HG, Kovanen PT. (1996). TNF- α and IL-1 β selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol* 157(9):4159-65.

Sasaguri Y, Murahashi N, Sugama K, Kato S, Hiraoka K, Satoh T, Isomoto H, Morimatsu M. (1994). Development-related changes in matrix metalloproteinase expression in human aortic smooth muscle cells. *Lab Invest* 71:261–269.

Sato K, Ozaki K, Oh I et al. (2007). Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109:228–34.

Satoh, H., M. Nakamura, M. Satoh, T. Nakajima, H. Izumoto, C. Maesawa et al. (2004). Expression and localization of tumour necrosis factor- α and its converting enzyme in human abdominal aortic aneurysm. *Clin. Sci.* 106: 301–306.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7–25.

Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L. et al. (2008). Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells* 26, 212–222. doi:10.1634/stemcells.2007-0554.

Shi, M., Liu, Z. W., & Wang, F. S. (2011). Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 164, 1–8. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04327.x

SilvaWAJr, Covas DT, Panepucci RA, et al. (2003). The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 21:661- 669.

Simmons, P. J., Torok-Storb, B. (1991). Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78, 55–62.

Singer, N.G.; Caplan, A.I.(2011). Mesenchymal stem cells: Mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol* 6, 457–478.

Sternlicht, M., & Werb, Z. (2009). How Matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Biol* 463–516. doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.463.

Sterpetti AV, Cucina A, D'Angelo LS, Cardillo B, Cavallaro A. (1993). Shear stress modulates the proliferation rate, protein synthesis, and mitogenic activity of arterial smooth muscle cells. *Surgery* 113, 691–699.

Sterpetti AV, Hunter WJ, Feldhaus RJ, et al. (1989). Inflammatory aneurysms of the abdominal aorta: incidence, pathologic, and etiologic considerations. *J Vasc Surg* 9:643-650.

Tamarina NA, McMillan WD, Shively VP, Pearce WH. (1997). Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery* 122(2):264-272.

Tang, T., Boyle, J. R., Dixon, a K., Varty, K. (2005). Inflammatory abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 29, 353–362. doi:10.1016/j.ejvs.2004.12.009.

Taylor, S. M., Jones, P. A. (1982). Changes in phenotypic expression in embryonic and adult cells treated with 5-azacytidine. *J Cell Physiol* 111, 187–194.

Thomson, J. a, Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. a, Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 1145–1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145.

Thomson, J. a, Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. a, & Hearn, J. P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci* 92, 7844–7848. doi:PMC41242.

Tonar, Z., Witter, K., Křížková, V., Eberlová, L., Kočová, J., Moláček, J., et al. (2010). Stereological tools for quantitative microscopy of the aortic wall with focus on the abdominal aortic aneurysm. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education* 926–935.

Uccelli A., Moretta L., Pistoia V. (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immy* 8, 726-736. doi:10.1038/nri2395

Valente S., Alviano F., Ciavarella C., Buzzi M., Ricci F., Tazzari P. L et al. (2014). Human cadaver multipotent stromal/stem cells isolated from arteries stored in liquid nitrogen for 5 years. *Stem Cell Res Ther* 5(1), 8.

Wagenseil J. E., & Mecham R. P. (2009). Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev* 89, 957–989. doi:10.1152/physrev.00041.2008.

Walker DI, Bloor K, Williams G, Gillie I. (1972). Inflammatory aneurysms of the abdominal aorta. *Br J Surg* 59:609-614.

Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 5:e10088.

Visse, R., Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92, 827–839. doi:10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D.

Xia S, Ozsvath K, Hirose H, Tilson MD. (1996). Partial amino acid sequence of a novel 40-kDa human aortic protein, with vitronectin-like, fibrinogen-like, and calcium binding domains: aortic aneurysm associated protein-40 (AAAP-40) [human MAGP-3, proposed]. *Biochem Biophys Res Commun* 219:36–39.

Yoon YW, Kwon HM, Hwang KC, Choi EY, Hong BK, Kim D et al. (2005). Upstream regulation of matrix metalloproteinase by EMMPRIN; extracellular matrix metalloproteinase inducer in advanced atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 180 37–44.

Yoshida Y, Sue W, Okano M, Oyama T, Yamane T, Mitsumata M. (1990). The effects of augmented hemodynamic forces on the progression and topography of atherosclerotic plaques. *Ann. NY Acad. Sci.* 598, 256–273. (doi:10.1111/j.1749-6632.1990.tb42298.x).

Zengin, E., Chalajour, F., Gehling, U. M., Ito, W. D., Treede, H., Lauke, H et al. (2006). Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* 133, 1543–1551. doi:10.1242/dev.02315.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H et al. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13

