

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE CHIRURGICHE

Ciclo XXXI

Settore Concorsuale di afferenza: 06/E1

Settore Scientifico disciplinare: MED/22

Terapie farmacologiche nell'attività degenerativa della metalloproteinasi-9 negli aneurismi dell'aorta addominale

Presentata da: Rodolfo Pini

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. Annalisa Patrizi

Chiar.mo Prof. Gianluca Faggioli

Esame finale anno 2019

INDICE

• ABSTRACT	pag. 3
• INTRODUZIONE	pag. 4
• BACKGROUND	pag. 6
• ENDPOINTS	pag. 7
• METODI	pag. 9
• RISULTATI	pag. 13
• DISCUSSIONE	pag. 16
• LIMITI	pag. 19
• CONCLUSIONI	pag. 19
• TABELLE	pag. 20
• FIGURE	pag. 22
• BIBLIOGRAFIA	pag. 24

ABSTRACT

Introduzione. Lo sviluppo degli aneurismi dell'aorta addominale (AAA) è da associarsi prevalentemente ad un'eccessiva proteolisi della matrice extracellulare (ECM), mediata da metallo-proteinasi (MMPs). Differenti farmaci hanno mostrato un'attività modulatoria rispetto alla produzione delle MMP-9, principalmente coinvolta nello sviluppo degli AAA, che potenzialmente possono influenzare la crescita dell'aneurisma stesso. Lo scopo dello studio è stato valutare influenza di differenti attività farmacologiche sulla produzione di MMP nei tessuti aortici di aneurismatici.

Metodi. Sono stati prelevati segmenti di parete aortica aneurismatica da pazienti portatori di AAA e sottoposti a trattamento chirurgico open. Da tali tessuti sono state ricavate le cellule staminali mesenchimali (CSM – identificate come maggiormente associate alla produzione di MMP-9) e saggiate per l'espressione genica di MMP-9 a livelli basali. Sono stati effettuate valutazioni di vitalità e espressione genica di MMP-9, mediante Real Time PCR in associazione a tre differenti farmaci: Pioglitazone, Sinvastatina e Doxiciolina, a differenti concentrazioni.

Risultati. Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale e sono stati utilizzati 12 prelievi da pazienti portatori di AAA. Da tutti i segmenti sono state ricavate CSM e saggiate mediante Real Time PCR. Nel campione basale in assenza di farmaco si è riscontrata un'iperespressione di MMP-9, 400 volte superiore rispetto ai controlli sani ($P=0.0001$). Tutti i farmaci testati si sono associati al mantenimento della vitalità cellulare testata e hanno dimostrato una significativa riduzione dell'espressione di MMP-9 ($P<0,001$) con valori risultanti dall'analisi della Real Time mediante il metodo comparativo del $2^{-\Delta Ct}$, di 0,46 per Pioglitazone (10 μM), 0,1 per Doxiciolina (25 μM) e 0,58 per Sinvastatina (10 μM)

Conclusioni.

L'attività farmacologica testata si è associata a una significativa riduzione dell'espressione di MMP-9 da parte delle CSM mantenendo la vitalità cellulare, questa valutazione pone le basi per un possibile studio in vivo delle differenti attività farmacologiche nel rallentamento dello sviluppo degli AAA.

Parole chiave: AAA; CSM; infiammazione; MMP-9; terapia farmacologica; pioglitazone; sinvastatina; doxaciolina.

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) identificando il loro ruolo nella patologia aneurismatica e saggiando tali differenti farmaci di differenti famiglie per valutare l'influenza nell'espressione genica di MMP-9.¹⁻³

L'aneurisma dell'aorta addominale (AAA) è una patologia caratterizzata dalla dilatazione focale e permanente dell'aorta (>50% del diametro normale), che porta al progressivo indebolimento della parete del vaso fino alla rottura. La formazione di un AAA è asintomatica, non si associa a segni o sintomi e la sua rottura presenta un alto tasso di mortalità. 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. In letteratura si sono identificati i meccanismi principalmente coinvolti nella formazione ad esso associati: processo infiammatorio, up-regolazione delle metalloproteasi (MMPs), stress ossidativo, ipossia e invecchiamento della parete vascolare.²⁻⁵

Le MMPs sono una famiglia di enzimi proteolitici, distinti in diverse classi in base al substrato della matrice extracellulare che degradano. 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. 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. È stato inoltre dimostrato che le gelatinasi sono necessarie per indurre sperimentalmente un AAA nel topo.⁶⁻⁹

Le MSC rivestono una notevole importanza nel campo terapeutico per la loro attività 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. Differenti elementi, tra cui l'invecchiamento e l'insorgenza di mutazioni o modificazioni epigenetiche a carico di MSCs, possono determinare un incremento dell'attività proteolitica e infiammatoria riscontrata nella parete vascolare aneurismatica.²⁻⁹

Lo studio che viene riportato si è quindi sviluppato in continuazione di un precedente studio di valutazione dell'attività delle CSM che ha evidenziato la loro attività nella produzione di MMP-9, andando attualmente a valutare possibili influenze farmacologiche su tali cellule nella regolazione genica per la produzione di MMP-9.

BACKGROUND

La presenza di MSCs nella parete vascolare è stata dimostrata in diverse esperienze associata a processi degenerativi. 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.⁹⁻¹⁵

Attualmente non esiste una terapia farmacologica specifica 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 correttivo per ridurre il rischio di rottura di tale aneurisma. 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. Le MMP rappresentano i mediatori molecolari coinvolti nella degradazione della matrice extracellulare (ECM). Contestualmente, l'infiammazione influenza ulteriormente il rimodellamento tissutale, in quanto i linfociti T, B e macrofagi migrano nel tessuto lesionato, rilasciando citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-6, TNF- α , etc) e MMPs.¹³⁻¹⁶

Oltre a cellule infiammatorie, le MMPs sono prodotte e rilasciate anche da MSCs a diversi livelli, come dimostrato da numerose esperienze. Infatti, MMPs in particolare MMP-2 e MT-MMP1 sono essenziali per la migrazione di MSCs e la capacità invasiva.¹⁷⁻²²

Data la completa assenza di possibili terapia mediche per rallentare o inibire la formazione degli AAA, numerosi studi osservazionali hanno cercato correlazioni tra l'evoluzione degli AAA e concomitanti terapie mediche.

In particolare la terapia antidiabetica del pioglitazone e delle statine si associano a un'attività antiinfiammatoria in grado di ridurre la produzione di MMP-9 da parte delle CSM. In maniera analoga un altro farmaco appartenente alla famiglia delle tetracicline, la doxazosina si è associata alla riduzione sierica dei valori delle MMP-9, lasciando ipotizzare un'azione diretta sulla parete dell'AAA.²³⁻²⁵

ENDPOINTS

1: isolamento di AAA-MSCs , caratterizzazione, valutazione della produzione di MMP-9 (Fase 1 studio precedentemente condotto)

- Isolamento di MSC da campioni di parete aortica aneurismatica prelevati durante trattamento chirurgico open di AAA
- Caratterizzazione morfologica, di antigeni e fattori di trascrizione delle MSC
- 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 di MSC e linfociti isolati da sangue periferico (PBMC) .
- modulazione dell'espressione di MMP-9 attraverso un approccio anti-infiammatorio mediante esposizione delle AAA-MSC alla citochina IL-10.²⁶⁻³⁶

2: valutazione dell'attività farmacologica sulle AAA-MSC (Fase 2 studio e elementi dell'attuale ricerca)

- Valutazione della vitalità cellulare a concentrazioni farmacologiche efficaci mediante colorazione con cristal violetto
- Valutazione attività del Pioglitazone nell'espressione genica di MMP-9 e PPAR- γ nelle AAA-MSC

- Valutazione attività della Sinvastatina nell'espressione genica delle MMP-9 nelle AAA-
MSC
- Valutazione dell'attività della doxiciclina nell'espressione genica delle MMP-9 nelle AAA-
MSC

MATERIALI E METODI

Popolazione dello studio

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico Locale (protocollo numero APP-13-01) e i pazienti arruolati hanno sottoscritto mediante un consenso informato la loro partecipazione allo studio.

I segmenti di AAA sono stati forniti dall'Unità di Chirurgia Vascolare dell'Università di Bologna, Policlinico S. Orsola-Malpighi. 12 campioni sono stati raccolti da pazienti sottoposti a trattamento chirurgico per riparazione di AAA (gruppo A). I dati demografici e fattori di rischio 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 effettuato mediante valutazioni istologiche e cellulari.³⁷⁻⁴¹

Isolamento di MSC da tessuto AAA

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 rotazione. Il risultante omogenato tissutale è stato filtrato utilizzando dei filtri a diametro decrescente (100-70-40µm) per eliminare i residui di non-tessuto digerito, poi centrifugato a 1200 rpm. La vitalità delle cellule è stata valutata mediante colorazione 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 MSC di 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.³⁷⁻⁴¹

Trattamenti farmacologici nelle AAA-MSC

La prima fase dello studio è stata mirata alla valutazione delle colture primarie delle AAA-MSC nel riprodurre la patogenesi dell'aneurisma in vitro. La seconda fase, descritta nella presente tesi, è stata indirizzata alla valutazione dell'efficacia di diversi trattamenti farmacologici sul modello cellulare in uso. A tal scopo, le AAA-MSC sono state staccate dalla fiasca di coltura mediante incubazione con tripsina, centrifugate a 1200 rpm per 5' e contate prima della semina con Trypan Blue; 80000 cellule/ml sono state seminate in piastre multipozzetto da 6 in duplicato, in modo da osservare la risposta al farmaco sia in termini di vitalità cellulare sia mediante analisi dell'espressione genica. Il giorno dopo la semina, le AAA-MSC sono state trattate con i farmaci selezionati, rispettando il seguente schema di trattamento:

Le condizioni di trattamento osservate sono state le seguenti:

1. **CTRL**: AAA-MSC coltivate in terreno tradizionale (DMEM+10% FBS)
2. **DMSO** (dimetil-solfossido): AAA-MSC coltivate in terreno tradizionale (DMEM+10% FBS) con aggiunta di DMSO, in quanto è il solvente in cui sono stati disciolti i farmaci, al momento della preparazione

FARMACO	CONCENTRAZIONE	DURATA
Pioglitazone	5-10-25 µM	24 h
Doxiciclina	10-25 µM	24 h
Simvastatina	10 µM	24 h

3. TRATTATO: AAA-MSC esposte alle diverse concentrazioni farmacologiche

Saggio di vitalità cellulare

La sopravvivenza cellulare rappresenta un indice importante nel valutare gli effetti della risposta ad un farmaco. Tale analisi è stata dunque effettuata nelle AAA-MSC dopo trattamento di 24 h con i farmaci testati. A tal scopo, al termine del trattamento il terreno è stato aspirato da ciascun pozzetto e, dopo un lavaggio con tampone fosfato salino (PBS), le cellule sono state fissate in formalina per 10' a temperatura ambiente. Successivamente, le cellule sono state incubate con il colorante cristalvioletto (1% in metanolo) per 20' in agitazione a temperatura ambiente, in modo da marcare le cellule vive e poter costruire una curva di crescita. Il colorante è stato poi estratto mediante acido acetico all'1% in acqua, trasferito in piastre multipozzetto da 96 e l'intensità del colorante è stata valutata mediante lettore di piastra alla lunghezza d'onda di 595 nm.

Analisi dell'espressione genica

Al termine del trattamento di 24 h, le AAA-MSC sono state processate per l'analisi dell'espressione genica. L'RNA totale è stato estratto dalle AAA-MSCs mediante omogeneizzazione della sospensione cellulare in TRIreagent (Life Technologies), in modo da rompere le membrane cellulari e favorire il rilascio dell'acido nucleico. Successivamente alla lisi, il cloroformio è stato aggiunto ai campioni di omogenato e agitato vigorosamente, per consentire la separazione delle due fasi. I campioni sono stati centrifugati a 12000 g, poi la fase acquosa contenente l'RNA è stata raccolta e trasferita in una nuova provetta. L'RNA è stato poi precipitato in alcool isopropilico, incubato a temperatura ambiente per 10 minuti e poi centrifugato. Il pellet visibile di RNA è stato infine lavato con etanolo al 75%, centrifugato e lasciato asciugare per dieci minuti. L'RNA è stato disciolto in acqua priva di RNAsi 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, ThermoFisher). La reazione di retrotrascrizione per la sintesi del cDNA è stata effettuata su tutti i campioni di RNA con un rapporto di assorbanza (260/280) tra 1.8-2.2. L'RNA totale è stato retro-trascritto in un volume finale di 20 µL utilizzando il kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies). La qPCR è stata eseguita mediante lo strumento Gene

Amp 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), usando la Sybr green Master Mix (Life Technologies) e coppie di primer specifici per i geni di interesse: MMP-9 FWD GAACCAATCTCACCGACAG, MMP-9 REV GCCACCCGAGTGTAACCAT, PPAR- γ FWD GTGGTAGGTAAGGAAGGGGC, REV GGCTGACTCTCGTTTGAGAA. Il gene codificante per l'enzima Gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) è stato utilizzato come housekeeping. L'analisi dei risultati è stata effettuata applicando l'algoritmo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$; i risultati sono stati espressi come aumento/diminuzione del trascritto rispetto al controllo trattato con il solo DMSO, veicolo del farmaco.³⁷⁻⁴¹

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), one-way ANOVA test 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

Popolazione dello studio

Le caratteristiche demografiche, i fattori di rischio, le co-morbidità e la terapia medica in atto dei pazienti inclusi nello studio sono riportati in tabella 1 e 2.

Caratteristiche istologiche della parete di AAA

Come precedentemente evidenziato nello studio in fase 1, la colorazione con ematossilina/eosina effettuata su sezioni di tessuto aortico dello spessore di 4 μm , ha mostrato le peculiari caratteristiche istologiche dell'aorta aneurismatica: perdita della struttura parietale, intenso focolaio infiammatorio e presenza di placche lipidiche (Figura 1).

Espressione marker mesenchimali nella parete AAA

Al fine di escludere l'origine emopoietica delle MSC isolate dalla parete vascolare delle biopsie AAA raccolte, nella fase 1 dello studio è stata osservata l'espressione dei marker mesenchimali CD44 e CD90 in situ; il dato ottenuto ha confermato l'esistenza di cellule stromali positive ai marker selezionati (Figura 2 a, b, c, d), consentendo pertanto di procedere con l'isolamento delle MSC e la loro caratterizzazione.

Espressione basale di MMP-9 nelle AAA-MSC

Considerato il decisivo ruolo di MMP-9 nella degradazione della matrice e dunque nel progressivo indebolimento della parete vascolare, ulteriore obiettivo dello studio precedente è stato analizzare l'espressione di MMP-9 nelle AAA-MSC. E' stato infatti dimostrato che le AAA-MSC esprimono elevati livelli di MMP-9, come risultato sia dall'analisi del trascritto tramite Real Time PCR (Figura 2), sia della proteina e della sua attività enzimatica (Ciavarella et al, 2015). Inoltre, lo studio precedentemente condotto ha dimostrato come un approccio anti-infiammatorio mediante somministrazione della citochina IL-10 abbia un'azione inibitoria sull'espressione genica di MMP-9. Tali dati, pubblicati nel 2015, costituiscono la premessa allo studio attuale volto a dimostrare

l'efficacia di diversi farmaci nel ridurre MMP-9 e dunque potenzialmente in grado di bloccare la degenerazione aneurismatica.

Trattamento farmacologico nelle AAA-MSC: analisi della vitalità cellulare

I dati ottenuti nella fase 1 dello studio hanno dimostrato che le colture primarie isolate dalla parete aneurismatica costituiscono un valido modello in vitro, in grado di mimare la patologia in esame. Sulla base di ciò, la seconda fase è stata indirizzata alla valutazione dell'efficacia farmacologica di pioglitazone, doxyciclina e simvastatina su tale modello cellulare. A tal scopo, le AAA-MSC sono state trattate con i suddetti farmaci per 24 ore e successivamente caratterizzate in base alla percentuale di sopravvivenza cellulare. A tal proposito è stato utilizzato il cristalvioletto, un colorante in grado di marcare le cellule rimaste adese al pozzetto e dunque di quantificare il numero di cellule vitali. I valori di assorbanza per ciascun campione sono stati confrontati rispetto alle AAA-MSC non trattate e in presenza del veicolo in cui i farmaci sono stati disciolti, il DMSO, in quanto tale reagente ha un grado di tossicità per le cellule. I dati ottenuti hanno mostrato un calo della sopravvivenza cellulare pari al 20%, rivelando dunque che nessuno dei farmaci causa una drastica riduzione della proliferazione cellulare alle dosi e ai tempi osservati, sebbene le differenze riscontrate tra i trattati e il controllo (dms) siano statisticamente significative. (Figura 3).

Effetto del pioglitazone sull'espressione genica di PPAR-g

Il pioglitazone è un farmaco agonista del PPAR- γ , fattore trascrizionale regolatore del differenziamento adipogenico e di cui è stato dimostrato un ruolo anti-infiammatorio. Considerato quindi il possibile ruolo terapeutico di tale fattore di trascrizione, ne abbiamo osservato l'espressione nel nostro modello cellulare di AAA-MSC. I risultati ottenuti hanno mostrato un aumento della trascrizione del PPAR- γ in risposta al trattamento con pioglitazone; in particolare, si osserva un aumento significativo a 5 e 25 μ M (1.475 ± 0.1 nel trattamento con 5 μ M e 2 ± 0.04 nel trattamento con 25 μ M rispetto al controllo dms 0.9 ± 0.03). (Figura 4 a).

Espressione genica di MMP-9 nelle AAA-MSC post-trattamento

Dopo aver verificato l'assenza di citotossicità del trattamento farmacologico sulle AAA-MSC, ai tempi e alle concentrazioni osservate, abbiamo analizzato l'espressione di MMP-9 nei diversi gruppi di trattamento. Come mostrato nel grafico in Figura 4b, dopo 24 ore di esposizione ai diversi farmaci, si osserva una significativa riduzione dei livelli trascrizionali di MMP-9 (Figura 3b). I valori risultanti dall'analisi della Real Time mediante il metodo comparativo del $2^{-\Delta Ct}$ sono riassunti in Tabella 3.

DISCUSSIONE

La parete arteriosa è un'entità dinamica costituita da differenti elementi cellulari, in grado di influenzare il processo di omeostasi del tessuto. L'alterazione dell'attività cellulare e molecolare può essere determinato da difetti genetici o fattori ambientali, portando così a disturbi vascolari. L'aorta addominale presenta caratteristiche morfologiche peculiari essendo caratterizzata da una diminuzione del contenuto di elastina corrispondente a un numero ridotto di unità lamellari rispetto al segmento toracico. La contestuale minor presenza di cellule muscolari lisce, rende l'aorta addominale maggiormente prona alla formazione di aneurismi.¹⁻⁸

Gli AAA sono una patologia degenerativa dell'aorta, determinata dalla proteolisi della matrice extracellulare, che porta alla diminuzione di elastina, collagene e proteine, che sono responsabili della resistenza e stabilità. Il turnover della matrice extracellulare è un processo fisiologico, necessario per il mantenimento della omeostasi del tessuto ed è determinato da enzimi proteolitici, tra cui le MMP. Un'iperattività di MMP può portare ad uno alto stato di degradazione della ECM che insieme alla riduzione delle cellule muscolari lisce porta alla riduzione della parete dei vasi.⁷⁻¹²

Le MSC possono essere isolate da diversi tessuti ed espanse in colture in vitro. Inoltre, le MSCs sono ipo-immunogeniche, possedendo la capacità di modulare negativamente la reazione immunitaria ed esercitare una funzione antinfiammatoria. Tale attività è mediata dal rilascio di citochine antinfiammatorie (TGF, IL-10), e di enzimi (IDO, NO) conducendo all'anergia cellulare e blocco del ciclo delle cellule T e B, inibizione di cellule NK. L' AAA costituisce un ideale modello patologico per eseguire valutazioni sulle caratteristiche e funzionalità di MSC. Abbiamo pertanto raccolto dodici campioni di tessuto aortico proveniente da pazienti sottoposti al trattamento chirurgico tradizionale per AAA. Nostri precedenti studi ci hanno permesso di constatare la presenza di MSC, valutata attraverso una immuno-colorazione per antigeni mesenchimali su sezioni di AAA. Accanto a cellule infiammatorie che invadono la parete dell'AAA, cellule positive per CD44 e CD90 potrebbero essere localizzate a livello della nicchia perivascolare. In seguito, abbiamo valutato la 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 hanno mostrato un tipico pattern di antigeni di superficie di cellule mesenchimali.⁴²⁻⁴⁸

Real Time qPCR è stato dimostrato che non esistono differenze significative tra soggetti sani e patologici. Si è valutata anche 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 importante nella degradazione della matrice extracellulare e quindi nell'origine e progressione di un AAA. 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 MSC) e la produzione di proteine sono stati osservati in AAA-MSC. 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 individuato in tessuti di AAA, che possono contenere differenti fonti cellulari di MMP, specialmente cellule infiammatorie, quali macrofagi.⁴²⁻⁴⁸

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.

Si è voluto quindi saggiare queste colture cellulate di MSC con differenti farmaci per valutare la loro influenza come modulatori nell'espressione di MMP-9. In primo luogo è stata valutata la vitalità cellulare in associazione con i differenti farmaci e si è confermata la vitalità delle MSC alle dosi di farmaci testati.

Secondariamente è stata effettuata la valutazione dell'espressione di MMP-9 nelle MSC di AAA che presentano una iperespressione di tali geni 400 volte superiori rispetto ai controlli sani. Il pioglitazone si è associato a una significativa riduzione dell'espressione di MMP-9, in maniera analoga la simvastatina testata ha dimostrato una forte riduzione nell'espressione di MMP-9.

La doxiaciclina è una tetraciclina che è già stata associata ad una inibizione dell'attività delle MMP. Studi laboratoristici sulla doxiaciclina hanno confermato che inibisce la crescita degli AAA in modelli animali rispetto al placebo, riduce le concentrazioni di MMP all'interno delle pareti di AAA e riduce le concentrazioni sieriche di MMP nei pazienti con AAA. Il ruolo diretto nelle cellule in grado di produrre direttamente MMP-9 è stato meno analizzato. Nel presente studio l'attività della doxiaciclina si è chiaramente associata a una forte riduzione nell'espressione di MMP-9 in maniera molto maggiore rispetto agli altri farmaci testati. La sua azione inibente si è dimostrata nelle diverse concentrazioni saggiate senza andare a influire sulla vitalità cellulare.

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 MSC peri-vascolari.

CONCLUSIONI

Il presente studio ha valutato le caratteristiche funzionali di un gruppo di MSC isolata da un'aorta affetta da AAA. Le AAA-MSC hanno dimostrato di iper-esprimere MMP-9 e il suo induttore EMMPRIN rispetto al confronto con MSCs isolate in parete aortica sana. Tale attività di iperespressione di MMP-9 si ritiene essere direttamente correlata con l'evoluzione degli AAA.

Sono state saggiate differenti terapie farmacologiche per ricercare una possibile influenza tra l'espressione di MMP-9 in MSC. Tutti i farmaci testati hanno dimostrato una significativa riduzione dell'espressione del gene di MMP-9 e l'attività associata a una maggiore riduzione si è riscontrata con la tetraciclina doxiciclina. Questo farmaco ha significativamente ridotto l'espressione di tale gene normalmente iperespresso in MSC.

Tali evidenze inducono a ipotizzare possibili nuove terapie mediche in grado di inibire la crescita degli AAA, in quanto per tale patologia non esiste ancora alcuna terapia medica efficace nell'inibire la crescita.

TABELLE

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 hemorrhage)

Tabella 3. Valori di espressione di MMP-9 valutati mediante Real Time PCR ed espressi relativamente al controllo DMSO.

Analisi dell'espressione genica nelle AAA-MSK. Le AAA-MSK sono state caratterizzate per l'espressione del PPAR- γ dopo 24 h di trattamento con pioglitazone e di MMP-9 dopo 24 h di trattamento con pioglitazone, doxiciclina e simvastatina. I valori sono espressi relativamente al DMSO (assenza di trattamento, presenza del DMSO in quanto solvente dei farmaci). L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA test.

Trattamento	Valore relativo al controllo DMSO	Significatività
PIOGLITAZONE 5 μM	0,82	*
PIOGLITAZONE 10 μM	0,46	***
DOXICICLINA 10 μM	0,23	****
DOXICICLINA 25 μM	0,10	****
SIMVASTATINA 10 μM	0,58	***

FIGURE

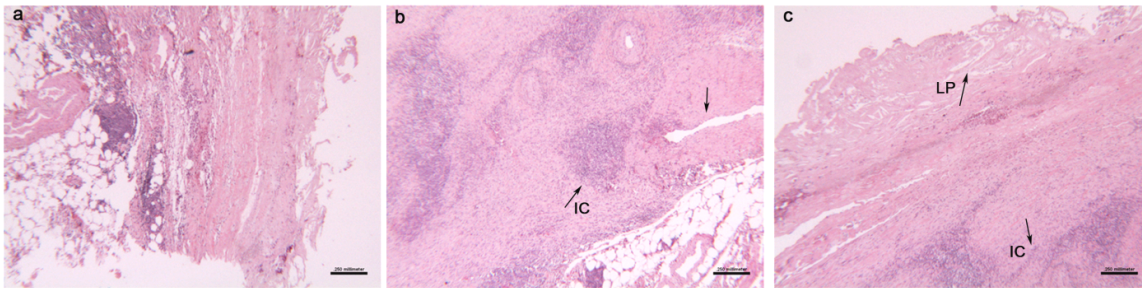


Figura 1

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.

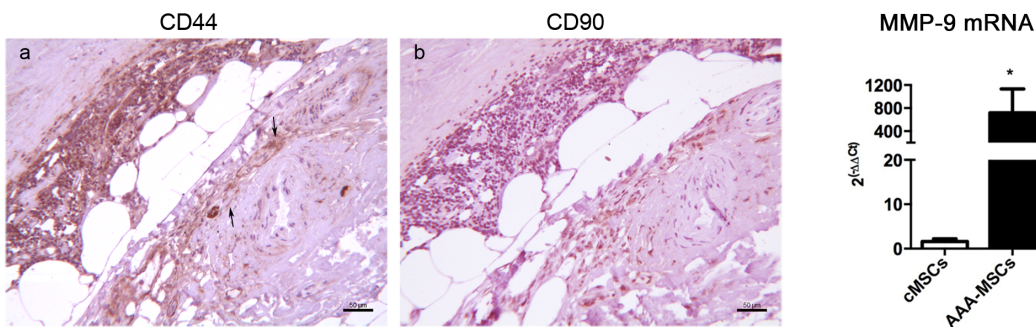


Figura 2

Identificazione cellule mesenchimali stromali (MSC) nel tessuto AAA. La reazione di immunohistochimica per CD44+ (a,c) e CD90+ (b, d) evidenzia la presenza di cellule con caratteristiche staminali nella parete AAA; (scale bar 50 μ m). Sulla destra, l'analisi dell'espressione del trascritto di MMP-9 nelle AAA-MSC (AAA-MSC) in confronto con le MSC isolate da parete vascolare sana (cMSC); * $p < 0.05$. Immagine modificata da Ciavarella et al, 2015.

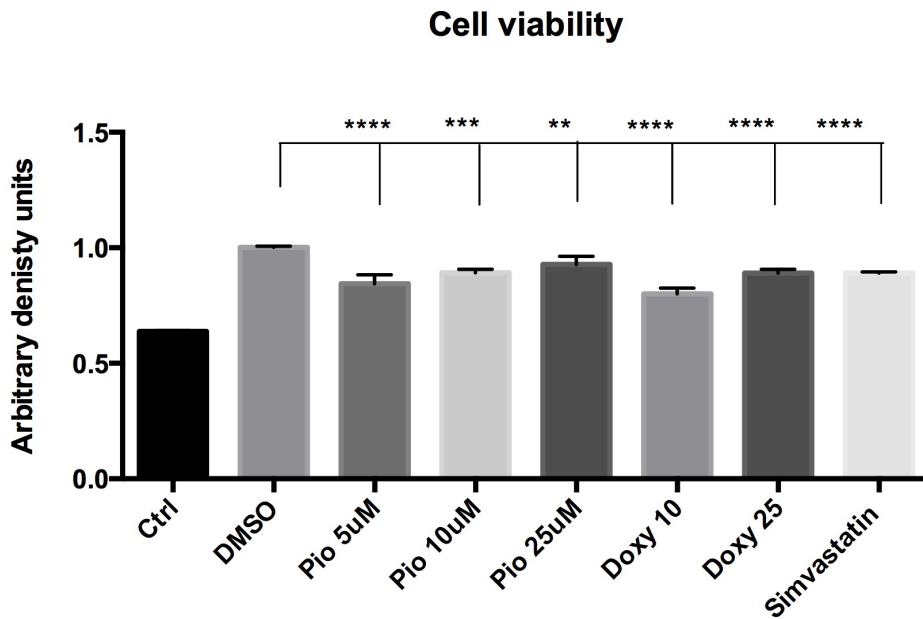
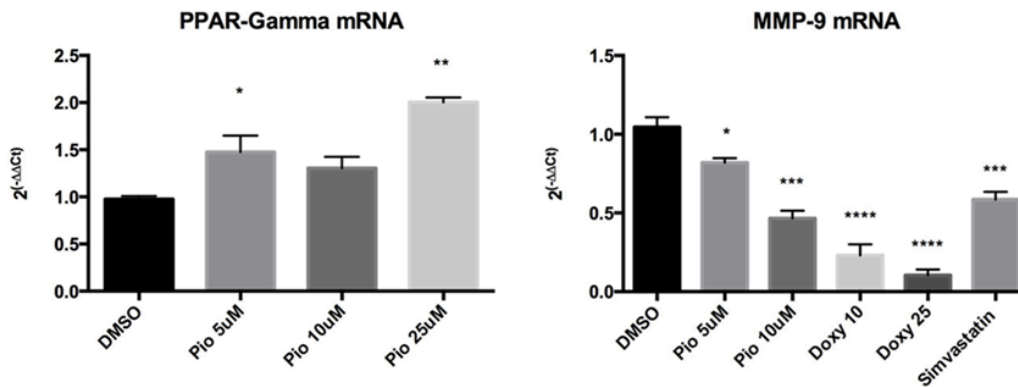


Figura 3.

Saggio di vitalità cellulare nelle AAA-MSK in risposta al trattamento farmacologico per 24 h.

I valori sono espressi relativamente al DMSO (assenza di trattamento, presenza del DMSO in quanto solvente dei farmaci). L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA test.



BIBLIOGRAFIA

1. Aggarwal, S., Qamar, A., Sharma, V., & Sharma, A. (2011). Abdominal aortic aneurysm: A comprehensive review. *Exp Clin Cardiol* 16(1), 11–15.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Cohen, M., A. Meisser, L. Haeggeli, P. Bischof. (2006). Involvement of MAPK pathway in TNF- α -induced MMP-9 expression in human trophoblastic cells. *Mol Hum Reprod* 12: 225–232.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Dominici M ,Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. (2006). Minimal

13. riteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315-7.
14. 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
15. 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.
16. Erices A, Conget P, Minguell JJ. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109(1):235-42.
17. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest energy of activated T cells. *Blood* 105:2821–7.
18. 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.
19. 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.
20. Goodell, M.A. (2003). Stem-cell “plasticity”: befuddled by the muddle. *Curr. Opin. Hematol.* 10, 208–213.
21. 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.
22. Holzapfel, 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.
23. Charolidi N, Pirianov G, Torsney E, Pearce S, Laing K, Nohturfft A, Cockerill GW Pioglitazone Identifies a New Target for Aneurysm Treatment: Role of Egr1 in an Experimental Murine Model of Aortic Aneurysm. *J Vasc Res.* 2015;52(2):81-93. doi: 10.1159/000430986. Epub 2015 Jun 20.
24. Wemmelund H, Høgh A, Hundborg HH, Thomsen RW, Johnsen SP, Lindholt JS Statin use and rupture of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg.* 2014 Jul;101(8):966-75. doi: 10.1002/bjs.9517. Epub 2014 May 21.
25. Baxter BT, Matsumura J, Curci J, McBride R, Blackwelder WC, Liu X, Larson L, Terrin ML; N-TA(3)CT Investigators. Non-invasive Treatment of Abdominal Aortic Aneurysm Clinical Trial (N-TA(3)CT): Design of a Phase IIb, placebo-controlled, double-blind, randomized clinical trial of doxycycline for the reduction of growth of

small abdominal aortic aneurysm. *Contemp Clin Trials*. 2016 May;48:91-8. doi: 10.1016/j.cct.2016.03.008. Epub 2016 Mar 25.

26. 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.

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

28. 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.

29. 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.

30. 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.

31. 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.

32. 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.

33. 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.

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

35. 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.

36. 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.

37. Pasquinelli G, Preda P, Gargiulo M, et al. (1993). An immunohistochemical study of inflammatory abdominal aortic aneurysms. *J Submicrosc Cytol Pathol* 25:103-112.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Wagenseil J. E., & Mecham R. P. (2009). Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev* 89, 957–989. doi:10.1152/physrev.00041.2008.
43. Walker DI, Bloor K, Williams G, Gillie I. (1972). Inflammatory aneurysms of the abdominal aorta. *Br J Surg* 59:609-614.
44. 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:e100
45. 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.
46. 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
47. 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.

48. 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).