



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA**

in

**MEDICINA TRASLAZIONALE DELLO SVILUPPO E  
DELL'INVECCHIAMENTO ATTIVO**

**CURRICULUM**

**GESTIONE INTEGRATA DELLA FRAGILITÀ, DELLE CONDIZIONI  
CRONICHE E DELLE MULTIMORBIDITÀ**

**(XXXI CICLO)**

***RUOLO DEL RUXOLITINIB NEL CROSS-TALK TRA CELLULE STAMINALI  
MESENCHIMALI E MICROAMBIENTE MIDOLLARE NELLA MIELOFIBROSI***

Coordinatore Dottorato: **Chiar.mo Prof. Corrado RUBINO**

Relatore: **Chiar.mo Prof. Carmine SELLERI**

Candidato: **Luigi MARINO**

Anno Accademico 2017-2018

## **RIASSUNTO**

### ***Introduzione***

Le cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells, MSC) sono una delle popolazioni di cellule staminali adulte più studiate e meglio caratterizzate. Sono considerate delle ottime candidate nell'ambito della medicina rigenerativa, soprattutto grazie alle loro proprietà immunomodulatorie e al loro emergente ruolo nella comunicazione intercellulare. Nell'ambito della nicchia emopoietica del midollo osseo, oltre che come costituenti cellulari, esse svolgono un ruolo fondamentale nel mantenere l'equilibrio fisiologico della nicchia stessa, svolgendo attività di promozione e regolazione sulle cellule staminali emopoietiche attivando la proliferazione e il processo di "homing" a livello midollare di queste ultime.

### ***Metodi***

In questo lavoro di tesi, l'attenzione è stata focalizzata sul meccanismo di internalizzazione e rilascio da MSC del Ruxolitinib, un farmaco attualmente commercializzato da NOVARTIS Pharma e inibitore di JAK1/2. Nel dettaglio, MSC primarie umane sono state isolate da midollo osseo (BMMSC) di cinque pazienti con diagnosi istologica e molecolare (mutazione del gene che codifica per il recettore Janus Kinasi 2, nello specifico la mutazione *JAK2 V617F*) di Mielofibrosi Idiopatica o Policitemia Vera, valutando poi, in un sistema *in vitro*, l'effetto anti-proliferativo dei medium di coltura condizionati con Ruxolitinib su cellule immortalizzate SET-2 carrier per la mutazione *JAK2 V617F* ed esprimenti il recettore di staminalità emopoietica CD34. Successivamente, è stato poi predisposto un sistema di co-coltura di BMMSC e cellule della linea SET-2 trattate o non con Ruxolitinib in differenti rapporti (1:20, 1:100 e 1:1000), con relativa valutazione del potenziale proliferativo della linea SET-2.

### ***Risultati***

Negli esperimenti eseguiti, è stato dimostrato che le MSC sono in grado di incorporare e rilasciare Ruxolitinib nei medium di coltura. Inoltre, è stato dimostrato che i medium di coltura condizionati hanno un'attività anti-proliferativa sulle cellule SET-2 maggiore rispetto al solo farmaco aggiunto ai mezzi di coltura. In un sistema *in vitro* di co-coltura, è stato poi dimostrato che l'attività di proliferazione delle cellule SET-2 diminuisce all'aumentare del rapporto MSC trattate con Ruxolitinib/SET-2, e che le BMMSC trattate con Ruxolitinib hanno un effetto anti-proliferativo sulle cellule della linea SET-2 maggiore rispetto alle BMMSC non trattate con il farmaco.

### ***Conclusioni***

Le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo sono risultate essere in grado di acquisire e rilasciare Ruxolitinib, che, una volta rilasciato all'esterno, aumenta l'effetto anti-proliferativo del farmaco su cellule della linea cellulare stabilizzata SET-2 presentante la mutazione *JAK2 V617F*. Tale proprietà contribuisce ad amplificare nel tempo l'effetto farmacologico del Ruxolitinib nel trattamento di soggetti con Mielofibrosi Idiopatica e Policitemia Vera.

**INDICE**

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>Le cellule staminali</b> .....	<b>6</b>
1.1.1	Le cellule staminali embrionali (ES).....	8
1.1.2	Le cellule staminali adulte .....	10
1.1.2.1	Le cellule staminali mesenchimali (MSC) .....	13
1.1.2.1.1	MSC isolate da midollo osseo (Bone Marrow MSC, BMMSC).....	15
1.1.2.1.2	Proprietà e funzioni .....	16
<b>1.2</b>	<b>Le Neoplasie Mieloproliferative Croniche</b> .....	<b>20</b>
1.2.1	La Mielofibrosi.....	21
1.2.2	La Policitemia Vera.....	26
1.2.3	La via di segnalazione JAK-STAT .....	27
1.2.4	Ruxolitinib e Studi COMFORT .....	29
1.2.4.1	Risultati studi COMFORT-I e COMFORT-II.....	31
<b>2</b>	<b>SCOPO DEL LAVORO</b> .....	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Ruxolitinib</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>Cellule staminali mesenchimali umane isolate da midollo osseo (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMMSC)</b> .....	<b>34</b>
3.2.1	Prelievo campioni midollari .....	34
3.2.1.1	Isolamento BMMSC.....	35
3.2.2	Coltura ed espansione .....	35
3.2.3	Crioconservazione.....	37
3.2.3.1	Congelamento .....	37
3.2.3.2	Scongelamento .....	38
3.2.4	Caratterizzazione.....	38
3.2.4.1	Marcatori di mesenchimalità in citofluorimetria.....	38
<b>3.3</b>	<b>Linea cellulare stabilizzata SET-2</b> .....	<b>40</b>
<b>3.4</b>	<b>Valutazione in vitro dell'uptake e del rilascio di Ruxolitinib dalle BMMSC</b>	<b>41</b>
<b>3.5</b>	<b>Metodica di estrazione di Ruxolitinib in HPLC</b> .....	<b>43</b>
3.5.1	Procedura analitica .....	43
<b>3.6</b>	<b>Valutazione in vitro del potenziale anti-proliferativo di Ruxolitinib puro e del medium condizionato ottenuto da MSCs-Ruxo su linea cellulare SET-2</b> .....	<b>45</b>

---

<b>3.7</b>	<b>Valutazione in vitro del potenziale inibitorio delle BM-MSCs trattate con Ruxolitinib sulla proliferazione di cellule della linea cellulare SET-2.....</b>	<b>46</b>
<b>3.8</b>	<b>Analisi statistica .....</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>RISULTATI.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Caratterizzazione delle BMMSC primarie e della linea cellulare stabilizzata SET-2.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2</b>	<b>Valutazione in vitro dell'uptake e del rilascio di Ruxolitinib dalle BMMSC</b>	<b>50</b>
<b>4.3</b>	<b>Valutazione in vitro del potenziale anti-proliferativo di Ruxolitinib puro e del medium condizionato ottenuto da MSCs-Ruxo su linea cellulare SET-2.....</b>	<b>53</b>
<b>4.4</b>	<b>Valutazione in vitro del potenziale inibitorio delle BM-MSCs trattate con Ruxolitinib sulla proliferazione di cellule della linea cellulare SET-2.....</b>	<b>56</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUZIONE

### 1.1 *Le cellule staminali*

Una cellula staminale è una cellula non terminalmente differenziata, in grado di originare dopo mitosi una cellula con carattere indifferenziato (mantenendo stabile e disponibile la riserva di cellule staminali) e una cellula *impegnata* o “*committed*” che può intraprendere un percorso differenziativo (*divisione asimmetrica*). Il “*commitment*” o *determinazione* implica un cambiamento stabile della cellula dovuto a variazioni nell’espressione genica, a cui farà seguito il *differenziamento*, ossia la maturazione di una cellula da uno stato indifferenziato a una forma differenziata e matura con funzioni specializzate.

Il differenziamento si verifica grazie a una combinazione di fattori ambientali, quali interazioni cellulari o con la matrice extracellulare, o è innescato da molecole secrete; la nicchia staminale, ad esempio, fornisce i fattori ambientali adatti a mantenere lo stato indifferenziato, il self-renewal e i determinanti citoplasmatici. In molti casi, la cellula staminale rimane all’interno di un ambiente specifico definito *nicchia staminale* (Spradling et al., 2001), mentre la cellula “*committed*” lo abbandona. L’identità di una cellula staminale è controllata da accessibilità al genoma e fattori trascrizionali specifici; dal loro bilanciamento dipende il destino che la cellula intraprenderà.

Le proprietà fondamentali di una cellula staminale sono quindi la capacità di autorinnovarsi ad ogni divisione (*autorigenrazione* o “*self-renewal*”) e quella di generare diversi tipi cellulari andando incontro a processi di differenziamento (*potenziale differenziativo*). Tali caratteristiche sono fondamentali nei processi di sviluppo embrionale e, nella vita adulta, nella generazione e nel mantenimento dei tessuti (Weissman, 2000).

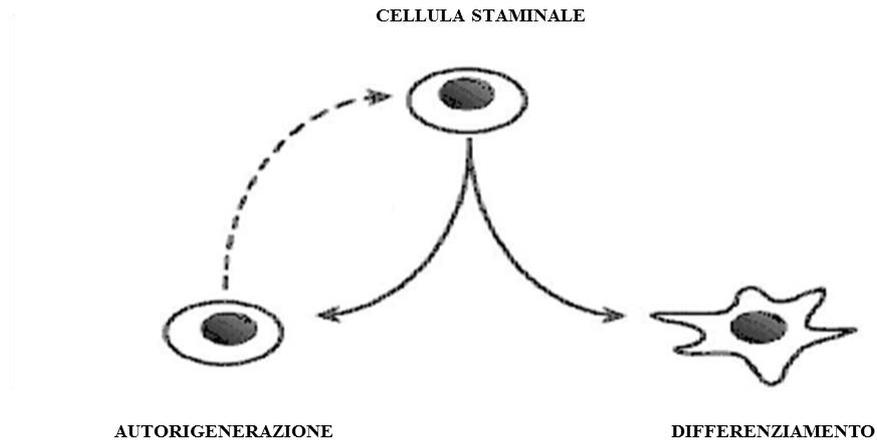


Figura 1.1 - Proprietà tipiche di una cellula staminale: autorigenerazione e differenziamento.

Tale definizione non permette, però, di distinguere tra le varie tipologie di cellule staminali, quali le cellule staminali embrionali, fetali ed adulte. È perciò necessario, nel definire una cellula staminale, considerare alcune sue caratteristiche.

L'*autorigenerazione* o "*self-renewal*" è una proprietà mantenuta in modo indefinito solamente dalle cellule staminali embrionali, che in coltura sono in grado di espandersi indefinitamente mantenendo uno stato indifferenziato (Thomson et al., 1998).

Le cellule staminali adulte, invece, dopo un determinato numero di divisioni, vanno incontro ad un processo di arresto della crescita, probabilmente dovuto al progressivo accorciamento dei telomeri che avviene ad ogni successiva divisione cellulare. Tale fenomeno è noto come *senescenza replicativa* (Stenderup et al., 2003; Zimmermann et al., 2003).

La *plasticità o potenziale differenziativo* (o "*potency*"), ossia la capacità di una particolare cellula staminale di generare numerosi differenti tipi cellulari differenziati, è espressa in modo diverso a seconda dell'origine delle varie cellule staminali (embrionale o adulta) e ne permette la classificazione in diversi gruppi (Eckfeldt et al., 2005; Jaenisch and Young, 2008) di seguito elencati:

- *Cellule staminali totipotenti*. Sono in grado di dare origine ad ogni tipo cellulare di un individuo, inclusi gli annessi embrionali; le uniche cellule

totipotenti sono lo zigote e i primi blastomeri, che si formano prima della compattazione nell'embrione di mammifero;

- *Cellule staminali pluripotenti*: Sono in grado di originare tutti i tipi cellulari e tutti i tessuti di un organismo, derivati dai tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma e endoderma), ad esclusione degli annessi embrionali. Tali cellule, definite cellule staminali embrionali (ES) (Thomson et al., 1998), sono presenti precocemente nello sviluppo embrionale, e corrispondono alle cellule della massa cellulare interna della blastocisti dei mammiferi. Altri esempi di cellule staminali pluripotenti sono le cellule germinali embrionali (EG) derivate dalle cellule germinali primordiali (PGC) (Shamblott et al., 1998), le cellule del carcinoma embrionale (EG), derivate dal teratocarcinoma (Graham, 1977), e le cellule pluripotenti indotte (iPS), derivate da cellule anche terminalmente differenziate e riprogrammate alla pluripotenza *in vitro* (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007; Okita et al., 2007; Yu et al., 2007);
- *Cellule staminali multipotenti*: Presentano un grado di differenziamento maggiore rispetto alle precedenti, e sono in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari del tessuto di appartenenza o, comunque, a tipi cellulari in genere ristretti ad un particolare foglietto embrionale. Vengono considerate tali le cellule staminali adulte o somatiche, come, ad esempio, le cellule staminali ematopoietiche (HSC) e le cellule staminali mesenchimali (MSC);
- *Cellule staminali unipotenti*: Sono coinvolte nella rigenerazione di un particolare tipo cellulare; un tipico esempio è costituito dalle cellule staminali spermatogoniali o spermatogoni in grado di generare solo spermatozoi (Boiani and Schoeler, 2005).

### 1.1.1 *Le cellule staminali embrionali (ES)*

Le cellule staminali embrionali umane sono state ottenute per la prima volta a partire dalla massa cellulare interna della blastocisti (ICM) nel 1998 da Thomson e colleghi (Thomson et al., 1998); l'ICM, isolata e coltivata *in vitro*, dà origine a

colture di ES, in grado di autorinnovarsi in modo illimitato e di differenziare in cellule appartenenti ai tre foglietti embrionali e alle cellule germinali.

La blastocisti corrisponde a uno stadio precoce dello sviluppo embrionale che, nell'uomo, viene raggiunto il quinto giorno dopo la fecondazione quando, in seguito alla segmentazione e alla formazione della morula, ha inizio una secrezione di liquidi che individuano una cavità, detta appunto cavità della blastocisti. Al momento dell'impianto nell'utero, la blastocisti matura si presenta come una sfera cava costituita da uno strato esterno di rivestimento, il trofoblasto o trofoectoderma, che darà origine alle strutture extraembrionali, e dalla ICM, costituita da cellule pluripotenti che, attraverso il processo di gastrulazione, daranno origine ai tre foglietti embrionali, ectoderma, mesoderma ed endoderma, dai quali avranno origine tutti i tessuti dell'organismo.



Figura 1.2 - Blastocisti con visibile massa cellulare interna (indicata dalla freccia) e trofoectoderma.

Le ES vengono coltivate *in vitro* su un feeder layer di fibroblasti embrionali murini irradiati (MEF) o in presenza di sostanze che consentono il loro mantenimento in uno stato indifferenziato (ad esempio in presenza di LIF, Leukemia Inhibitory Factor). In queste condizioni colturali, tali cellule sono in grado di autorigenerarsi attraverso un numero indeterminato di divisioni simmetriche, dimostrando di possedere un'elevata attività telomerasica, e mantenendo un normale cariotipo diploide. Esprimono fattori trascrizionali in grado di mantenere tale stato indifferenziato e proliferativo (Oct4, Sox2 e Nanog).

Venendo meno le condizioni colturali sopra descritte, le ES sono in grado di differenziare spontaneamente in coltura dando origine a corpi embrioidi (o “embryoid bodies”), ossia strutture tridimensionali contenenti cellule derivanti da tutti e tre i foglietti embrionali, dalle quali è possibile guidare il differenziamento verso il tipo cellulare desiderato. Infatti, nelle opportune condizioni di coltura, le ES sono in grado di differenziare e dare origine a tipi cellulari e tessuti maturi caratteristici di ciascun foglietto embrionale. Inoltre, queste cellule possiedono la capacità di integrarsi in tutti i tessuti fetali se reintrodotte in un embrione, generando una chimera, e sono anche in grado di colonizzare la linea germinale, producendo ovociti e spermatozoi. Infine, se inoculate in un topo immunodeficiente (SCID, Severe Combined Immuno Deficiency), le ES danno origine a teratomi, ossia tumori caratterizzati dalla presenza di cellule differenziate appartenenti a tutti e tre i foglietti embrionali.

Le caratteristiche e le straordinarie potenzialità delle ES hanno aperto la strada ad un loro possibile utilizzo per la riparazione e la rigenerazione tissutale; vi sono però alcune importanti caratteristiche che ne limitano l’utilizzo a scopo terapeutico. Primo fra tutti la legislazione vigente in molti Paesi, tra cui l’Italia, che vieta la sperimentazione sugli embrioni umani per motivi etici e morali. Altre importanti limitazioni concernono la sicurezza nell’utilizzo delle ES nei pazienti, in quanto *in vivo* possono andare incontro a proliferazione incontrollata e formazione di teratomi. In ultima analisi c’è l’elevato rischio di scatenare una risposta immunitaria nei pazienti dovuto all’utilizzo eterologo di tali cellule.

### *1.1.2 Le cellule staminali adulte*

Le cellule staminali adulte includono cellule staminali residenti in tutti i tessuti adulti in particolari ambienti, denominati “nicchie delle cellule staminali” (Schofield, 1978), e sono responsabili della rigenerazione e del mantenimento dei tessuti dopo la nascita. Le cellule staminali adulte comprendono anche le staminali fetali, che derivano da annessi extraembrionali e dal cordone ombelicale.

Le cellule staminali adulte, definite anche cellule staminali somatiche, condividono le caratteristiche proprie delle staminali, e sono quindi in grado di autorigenerarsi e di differenziare in cellule tipiche del tessuto di appartenenza in risposta a lesioni tissutali o al normale turnover cellulare (Watt and Hogan, 2010). Le cellule staminali adulte sono state scoperte negli anni '60 attraverso studi su cellule del midollo osseo (Pillow et al., 1966; Gatti et al., 1968), ed in seguito individuate in vari tessuti ed organi di derivazione ectodermica, mesodermica ed endodermica: cervello (Johansson et al., 1999), midollo osseo (cellule staminali ematopoietiche, Till and McCulloch EA, 1961; cellule staminali mesenchimali, Friedstein, 1980), sangue periferico (Siena et al., 1989), polpa dentale (Miura et al., 2003), midollo spinale (Kalyani et al., 1998), vasi sanguigni (Asahara et al., 1997), muscolo scheletrico (Schulz, 1996), epitelio della cute (Ghazizadeh and Taichman, 2001), sistema digerente (Slack, 2000), cornea (Daniels et al., 2001), fegato (Alison, 1998), pancreas (Cornelius et al., 1997) e molte altre sedi corporee in continua scoperta.

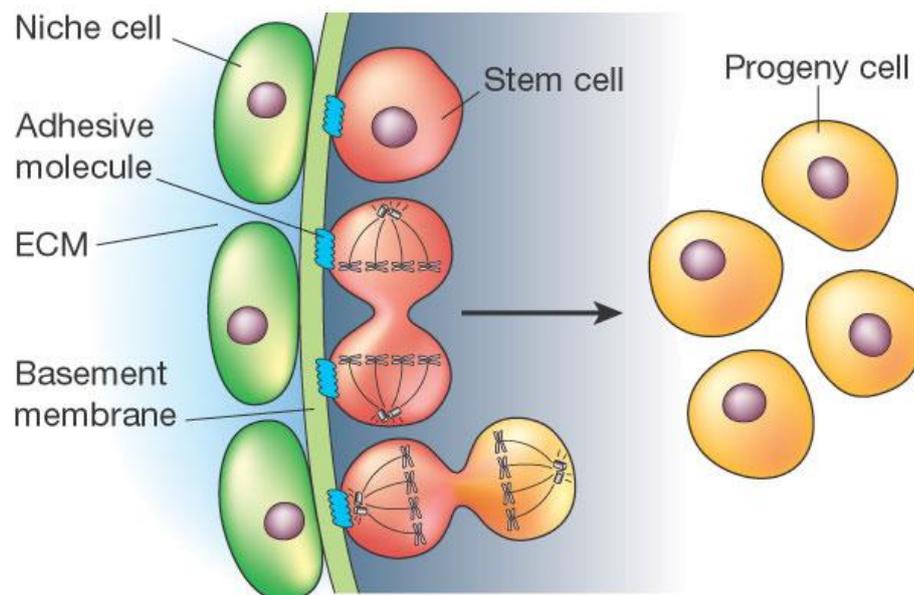


Figura 1.3 – Le nicchie delle cellule staminali. (Spradling et al., 2001)

Le nicchie staminali sono state definite “microambienti regolativi”, in quanto consentono la proliferazione controllata delle staminali all’interno di esse, e il differenziamento controllato della progenie cellulare che si allontana dalla nicchia.

Tali compiti di controllo e regolazione sono svolti dalle cellule che compongono la nicchia, che interagiscono con le staminali tramite interazione diretta (molecole di adesione) o secrezione di fattori paracrini, in grado di mantenere le cellule in uno stato non impegnato (Moore and Lemischka, 2006; Jones and Wagers, 2008). Quando una cellula staminale intraprende il cammino differenziativo genera una o più cellule intermedie, denominate progenitori o precursori cellulari, prima di raggiungere lo stato differenziato maturo. Queste cellule intermedie sono cellule residenti nei tessuti adulti e fetali, destinate (“committed”) ad un particolare tipo di differenziamento, in grado di dividersi poche volte prima del differenziamento; sono denominate anche cellule amplificanti in transito (“transient amplifying cells”), poiché solitamente si dividono durante la migrazione dalla nicchia staminale.

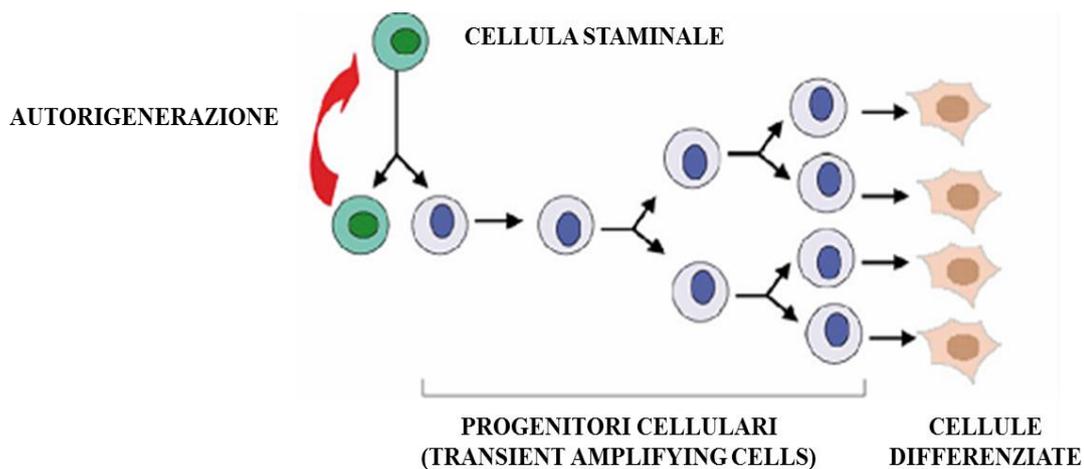


Figura 1.4 - Possibili destini della cellula “figlia” di una cellula staminale in divisione: autorigenerazione o differenziamento.

A differenza di quando avviene nel caso delle ES, l’utilizzo delle cellule staminali adulte non comporta problemi etici, e tali cellule sono facilmente ottenibili. Le cellule staminali adulte più studiate e meglio caratterizzate sono le cellule staminali ematopoietiche (HSC) e le cellule staminali mesenchimali (MSC).

### 1.1.2.1 Le cellule staminali mesenchimali (MSC)

Le MSC sono state inizialmente individuate grazie agli esperimenti di Friedenstein nel midollo osseo umano, che hanno portato al loro isolamento e purificazione (Friedenstein et al., 1968; Caplan, 1991; Schipani and Kronenberg, 2009). Sono da tempo note come supporto indispensabile all'ematopoiesi (Dexter et al., 1984), attraverso la creazione di un microambiente adatto ai processi di differenziamento delle HSC (Gartner and Kaplan, 1980); solo successivamente è stato determinato che esse sono in grado di originare vari tipi cellulari appartenenti al lignaggio mesenchimale, contribuendo all'accrescimento, al rinnovo e alla riparazione di tessuti di tale origine, quali l'osso, la cartilagine, il muscolo, i legamenti, i tendini e il tessuto adiposo (Pittenger et al., 1999). Sono perciò cellule staminali multipotenti in grado di autorigenerarsi e differenziare in osteociti (Caplan, 1994), condrociti (Johnstone et al., 1998) e adipociti (Justesen et al., 2002). Infatti, nell'adulto le MSC sono presenti principalmente a livello del midollo osseo, ma anche liquido sinoviale, tessuto muscolare e adiposo (Jorgensen et al., 2004), sangue periferico (Kassis et al. 2006), sangue di cordone ombelicale (Rosada et al., 2003), e denti decidui (Miura et al., 2003).

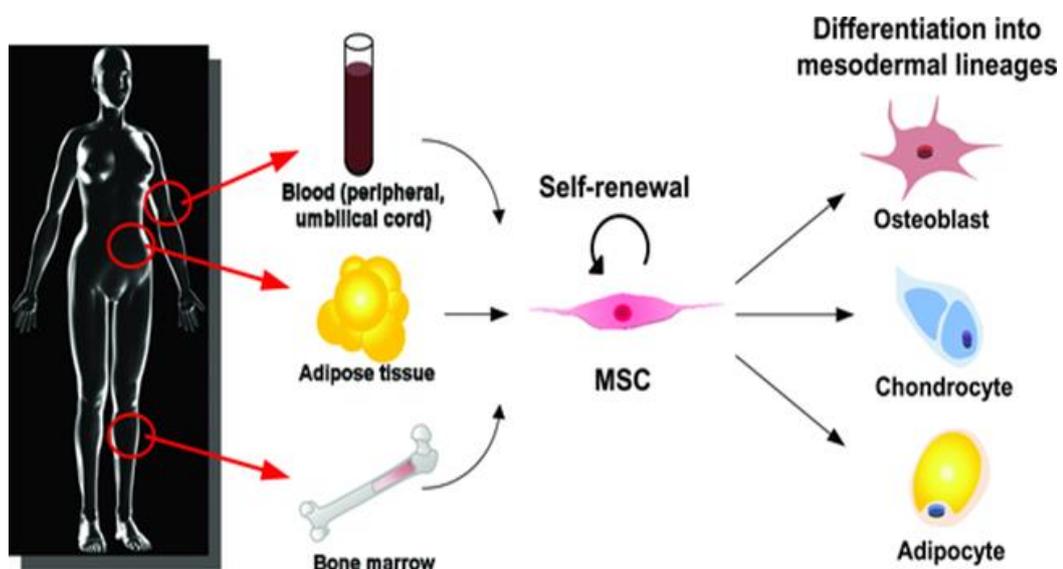


Figura 1.5 – Le cellule staminali mesenchimali. (Katsuda et al., 2013)

È però noto che la loro disponibilità nell'organismo cambia drammaticamente con l'aumentare dell'età (Caplan, 2004), diminuendo la loro quantità di uno o due ordini di grandezza nel corso della vita di un individuo. Le MSC sono state recentemente associate al normale accrescimento ed aumento delle dimensioni corporee e ad eventi di riparazione nel corpo umano, processi che coinvolgono la diretta conversione delle MSC in fenotipi differenziativi. Per questo motivo, è stato ipotizzato che la loro perdita di capacità differenziativa e la loro diminuzione in numero possano essere una componente del normale invecchiamento. Infatti, un invecchiamento precoce patologico quale la progeria di Hutchinson-Gilford sembra essere causata dall'incapacità delle MSC di differenziarsi in alcuni tipi cellulari, quali le cellule adipose (Scaffidi and Mistelli, 2008).

Le MSC sono definite dalla loro comune origine mesodermica; originano infatti dal mesenchima, il tessuto connettivo embrionale, derivato dal mesoderma, che darà origine al tessuto connettivo ed ematopoietico. La presenza di queste cellule nel sangue circolante ha suggerito la possibile esistenza di un esteso network di cellule staminali mesenchimali nel corpo, continuamente rifornito da cellule mesenchimali mobilizzate dal midollo osseo a seconda delle necessità (Kassem et al., 2004). Una più recente teoria è che siano in realtà le pareti dei capillari e dei vasi sanguigni di tutto l'organismo a fornire una riserva di cellule progenitrici, principalmente periciti, che potrebbero essere all'origine delle cellule staminali mesenchimali e delle altre cellule staminali adulte (Crisan et al., 2008; Crisan et al., 2009).

Fin dalla loro scoperta le cellule staminali mesenchimali sono state indicate con diversi nomi. Mancando, però, un preciso criterio di definizione e caratterizzazione delle MSC, la *International Society for Cellular Therapy (ISCT)* ha suggerito che la popolazione chiamata MSC dovesse possedere necessariamente le seguenti tre caratteristiche per definirsi tale (Horwitz et al., 2005; Dominici M. et al., 2006):

- aderenza alla plastica in condizioni colturali standard;
- espressione in più del 95% delle cellule degli antigeni CD105, CD73, CD90 e espressione nulla o inferiore al 2% dei seguenti marcatori ematopoietici: CD45, CD34, CD133, CD14 (o CD11b), CD79 (o CD19), HLA-DR;

- capacità differenziativa *in vitro* in osteoblasti, adipociti e condroblasti.

#### 1.1.2.1.1 MSC isolate da midollo osseo (*Bone Marrow MSC, BMMSC*)

Il midollo osseo rappresenta la principale fonte di MSC, ma il recupero di MSC da questa fonte prevede una procedura invasiva quale l'agoaspirato midollare. Inoltre, le MSC presenti nel midollo osseo diminuiscono in numero e riducono il loro potenziale differenziativo con l'aumentare dell'età dell'individuo (Nishida et al., 1999; Mueller and Glowacki, 2001; Stenderup et al., 2003).

La presenza di cellule staminali non ematopoietiche all'interno del midollo osseo fu suggerita per la prima volta circa 130 anni fa al patologo tedesco Cohnheim, il quale ipotizzò che il midollo osseo potesse essere una fonte di fibroblasti, contribuendo alla riparazione dei danni tissutali in molti tessuti periferici (Prockop et al, 1997). Negli anni '70, Friedenstein ne dimostrò l'esistenza per la prima volta; egli infatti isolò dal midollo osseo di ratto cellule con morfologia fibroblastoide dotate di potenziale clonogenico *in vitro* (Friedenstein et al., 1970; Friedenstein, 1980). Le MSC furono ottenute mediante semina del midollo intero di ratto in camere di coltura, scarto delle cellule non aderenti, e isolamento di cellule dalla morfologia fibroblastoide in grado di crescere aderendo alla plastica e formare colonie. Friedenstein dimostrò che tali cellule possono ricostruire un microambiente ematopoietico in trapianti sottocutanei e rigenerare tessuto osseo eterotopico in trapianti seriali, dando così prova delle loro capacità di autorigenerazione. Negli anni successivi, molti laboratori sono stati in grado di isolare tali cellule secondo il protocollo di Friedenstein anche dal midollo osseo umano, dimostrando che possono essere espanse in coltura e differenziate *in vitro* in varie tipologie cellulari appartenenti al lignaggio mesengenic.

Da un punto di vista morfologico e immunofenotipico, le MSC isolate da midollo osseo hanno una morfologia fibroblastoide, crescono in specifiche condizioni di coltura, non esprimono marcatori ematopoietici (come il CD34, il CD133, il CD45), risultano positive a marcatori mesenchimali (CD44, CD105, CD73, CD90), esprimono l'HLA I ma non l'HLA-DR, inoltre, queste cellule esprimono

marcatori pericitari quali l' $\alpha$ -SMA, il PDGFR- $\beta$  e il CD146 che sottolineano la loro possibile origine perivascolare (Crisan et al., 2008; Crisan et al., 2009).

#### *1.1.2.1.2 Proprietà e funzioni*

In seguito alla descrizione della multipotenza e della capacità differenziativa delle MSC, tale popolazione cellulare è divenuta una delle più studiate tra le cellule staminali adulte o somatiche. Molti studi hanno messo in evidenza che, oltre alle loro capacità differenziative, le MSC sono in grado di modulare il sistema immunitario (*proprietà immunomodulatorie* – Aggarwal and Pittenger., 2005; Keating et al., 2006) e di secernere molecole e fattori che inducono o assistono nel processo di riparazione tissutale (*azione paracrina* – Caplan and Dennis, 2006; Du et al., 2013). Infatti, sebbene alcuni studi preclinici *in vivo* dimostrino che le MSC sono in grado di migrare e risiedere in vari tessuti, in particolare in siti di infiammazione (Devine et al., 2003), altri suggeriscono che la migrazione delle MSC nei tessuti danneggiati non sia necessaria affinché esse possano svolgere le loro funzioni terapeutiche. Infatti, con l'eccezione della formazione della cartilagine e dell'osso (Lipscomb, 2001), il differenziamento delle MSC *in vivo* in tipi cellulari multipli appare essere un evento raro o non documentato, nonostante il loro effetto benefico in seguito a trapianto in diversi modelli di patologie come infarto del miocardio, sclerosi multipla, o morbo di Crohn (Timmers et al., 2007; Dalal et al., 2012). Scoperte recenti indicano infatti che le MSC mediano i loro effetti clinici benefici nella rigenerazione tissutale tramite un'azione paracrina piuttosto che attraverso interazioni cellulari o il transdifferenziamento (Timmers et al., 2007; Lee et al., 2009; Zanotti et al., 2013).

Per quanto riguarda le proprietà immunomodulatorie, una serie di esperimenti ha evidenziato che le MSC sono in grado di inibire l'attivazione e la proliferazione dei linfociti T (Di Nicola et al., 2002; Barthlomew et al., 2002; Le Blanc et al., 2003). I meccanismi di questo fenomeno non sono completamente noti: si pensa che l'inibizione della reazione immune possa essere legata ai livelli di espressione degli antigeni di classe II del sistema maggiore di istocompatibilità (MHC) e delle

molecole costimolatorie. Le MSC, infatti, esprimono l'MHC di classe I ma non esprimono l'MHC di classe II e le molecole costimolatorie come il CD80, il CD86 e il CD40; questo fenotipo è considerato non immunogenico. Le proprietà immunosoppressive delle MSC e la loro bassa immunogenicità rendono queste cellule candidate per la terapia delle complicanze immunologiche, che insorgono dopo trapianto allogenico di cellule ematopoietiche, quali la GVHD (Le Blanc et al. 2003; Le Blanc et al., 2008).

Un recente studio propone che le MSC vengano attivate da stimoli infiammatori e siano in grado di indurre due tipi di risposte a feedback negativo che contribuiscono a reprimere il fenomeno infiammatorio in fasi precoci del suo sviluppo. Infatti, le MSC attivate secernono PGE2, che è in grado di spingere i macrofagi infiammatori residenti di tipo M1 verso il differenziamento nel fenotipo antinfiammatorio M2. Inoltre, le MSC secernono TSG-6, che, interagendo con i macrofagi residenti nel sito di infiammazione, è in grado di downregolare la segnalazione TLR2/NFκ-B, portando perciò ad una diminuzione nella secrezione di mediatori pro-infiammatori da parte dei macrofagi (Prockop, 2013).

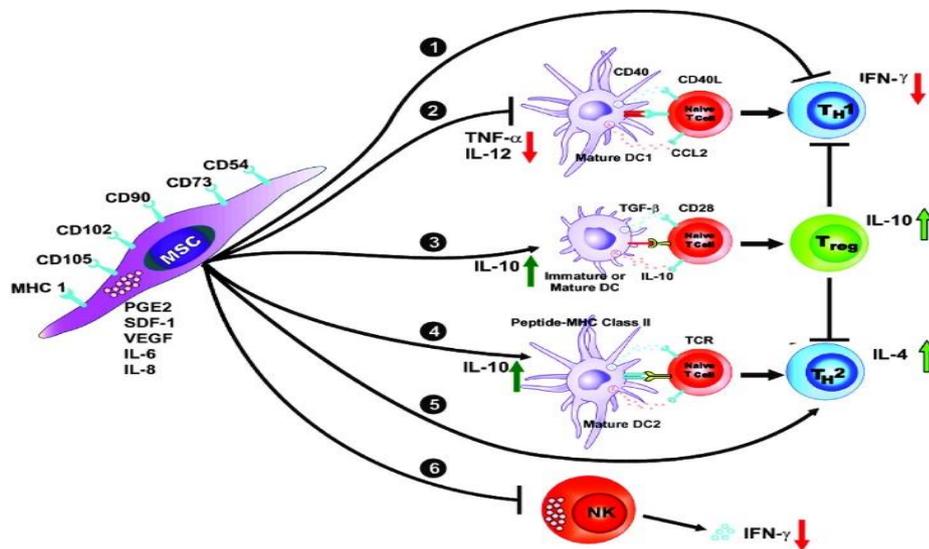


Figura 1.6 - Proprietà immunomodulatorie delle MSC. (Aggarwal and Pittenger, 2005).

Per quanto riguarda la rigenerazione tissutale, in molti modelli animali le MSC si sono rivelate capaci di promuovere la rigenerazione di organi e tessuti senza che esse siano state rinvenute in tali tessuti in seguito al trapianto (Li et al., 2002; Siegel et al., 2012). Tali studi supportano l'ipotesi dell'azione paracrina delle MSC, ossia

che la secrezione di molecole bioattive (quali fattori di crescita, citochine e chemochine) da parte delle MSC promuova la formazione di un microambiente rigenerativo, e induca le cellule staminali residenti al differenziamento. Alcuni esperimenti dimostrano che i surnatanti prelevati da colture di MSC, da soli sono sufficienti ad indurre la risposta terapeutica con effetti duraturi in alcuni modelli di patologia, come, ad esempio, il danno polmonare (Waszak et al., 2012), renale (van Koppen et al., 2012) ed epatico (van Poll et al., 2008; Du et al., 2013). In particolare, in un modello di danno epatico acuto indotto da D-galattosammina, il trattamento con il surnatante derivato da colture di MSC è in grado di indurre la sopravvivenza degli epatociti, aumentando il numero di epatociti in proliferazione e riducendo del 90% la loro apoptosi (van Poll et al., 2008).

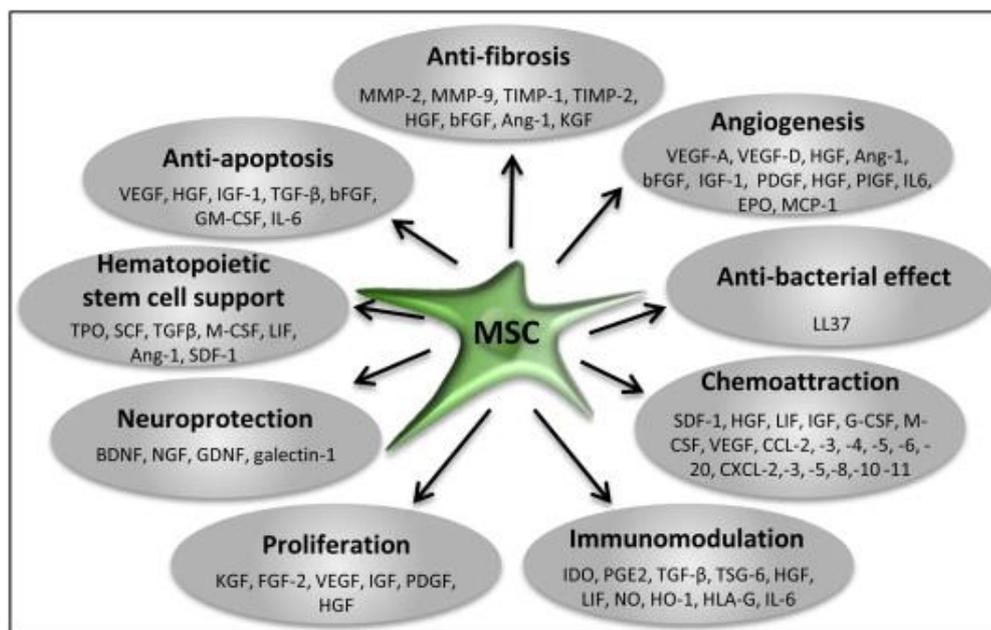


Figura 1.7 - Il secretoma delle MSC. (Maumus et al., 2013).

Alla luce di questi dati, risulta perciò evidente che le attività di immunomodulazione e azione paracrina svolte dal secretoma delle MSC agiscono in modo cooperativo al fine di creare un microambiente tissutale favorevole ai processi di riparazione e rigenerazione (Lavoie et al., 2013). Nel decennio passato molti studi sono stati effettuati con il fine di caratterizzare il secretoma delle MSC ed è emerso che esso contiene molti fattori coinvolti nell'attenuazione del danno tissutale, nell'inibizione del rimodellamento fibrotico e dell'apoptosi, nella

promozione dell'angiogenesi, nella stimolazione del reclutamento e della proliferazione di cellule staminali endogene e nel ridurre i fenomeni infiammatori (Maumus et al., 2013).

## ***1.2 Le Neoplasie Mieloproliferative Croniche***

Le Neoplasie Mieloproliferative croniche rappresentano un gruppo di disordini ematologici che originano dalla trasformazione neoplastica di una cellula staminale pluripotente e caratterizzati dalla proliferazione clonale di uno o più progenitori emopoietici nel midollo osseo e in sedi extramidollari (Vannucchi et al., 2009)

Nel 1951 W. Dameshek ha raggruppato sotto il termine di malattie mieloproliferative croniche quattro disordini tra loro correlati fisiopatologicamente e clinicamente: la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Essenziale (TE), la Mielofibrosi cronica idiopatica (IMF) e la Leucemia mieloide cronica (CML) (Dameshek 1951). Successivamente, nel 2001 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (World Health Organization, WHO) ha incluso sotto il termine di malattie mieloproliferative croniche Philadelphia negative (Ph-) (volessimo specificare che si tratta di Philadelphia negative?) (MPDc) anche entità meno frequenti come la leucemia neutrofilica cronica (CNL), la sindrome ipereosinofila (HES), la leucemia eosinofila cronica (CEL) e la mastocitosi sistemica (SMCD) (Vardiman et al., 2002).

Le malattie mieloproliferative croniche sono malattie relativamente comuni, ad appannaggio soprattutto dell'età adulta e avanzata, con tassi di incidenza compresi tra 3.5 e 12.6 nuovi casi per 100.000 abitanti l'anno. Inoltre, l'incidenza sembra in rapida evoluzione, da un lato a causa del progressivo aumentare dell'età, dall'altro in virtù dell'affinamento delle tecniche diagnostiche.

Evidenze sperimentali descrivono nella patogenesi delle diverse malattie il coinvolgimento di geni di fusione ad attività tirosin-chinasica che, come *BCR-ABL*, sono implicati in vie di traduzione del segnale aberranti. Altre osservazioni nei vari sottotipi di malattia mostrano l'ipersensibilità delle cellule mieloidi a fattori di crescita e citochine, incremento dell'espressione del fattore antiapoptotico Bcl-XL e attivazione di STAT3 o STAT5, elementi a valle della via di segnalazione tirosin chinasica (Cross and Reiter 2002; Delhommeau et al., 2006; Cross et al., 2008).

Da un punto di vista biologico, gli elementi che accomunano queste patologie sono il coinvolgimento di un progenitore emopoietico multipotente, la predominanza del clone neoplastico sui progenitori ematopoietici non trasformati, l'eccessiva proliferazione di una o più linee cellulari emopoietiche in assenza di uno stimolo noto, la crescita *in vitro* di colonie indipendentemente dalla presenza di fattori di crescita (EPO, IL-3, SCF, GM-CSF, IGF-1), l'emopoiesi extramidollare, alterazioni sempre più profonde dei processi non solo maturativi ma anche di quelli inerenti la differenziazione cellulare, col risultato finale di un incremento progressivo della componente cellulare blastica fino alla possibile configurazione di un quadro midollare e periferico sovrapponibile a quello della leucemia acuta (Spivak et al., 2003).

La patogenesi molecolare di questi disordini è stata ulteriormente definita nel 2005 con la scoperta della prima alterazione genetica ricorrente, che consiste in una mutazione puntiforme G>T alla posizione 1849 nell'esone 14 del gene *JAK2*, caratterizzata dalla sostituzione di una valina con una fenilalanina nel codone 617 (V617F). In seguito, sono state scoperte la mutazione del gene *MPL* (recettore per la trombopoietina) rappresentata dalla sostituzione nucleotidica W>L/K/A al codone 515 e le mutazioni, inserzioni o delezioni nell'esone 12 del gene *JAK2*. La maggior parte dei pazienti con PV risulta positivo per la mutazione V617F del gene *JAK2* (circa il 95%) o recante anomalie nell'esone 12 (circa il 2%), mentre mutazioni di *MPL* non sono ancora state riscontrate in questo tipo di disordine. Soltanto il 60% dei pazienti con TE e MF presenta la mutazione *JAK2* V617F e in circa l'8% si riscontra la mutazione *MPL* W515K/L/A o altre infrequenti mutazioni. TE e MF sembrano non coinvolte da anomalie nell'esone 12 (Levine and Gilliland 2007).

### 1.2.1 La Mielofibrosi

La mielofibrosi (MF) presenta un'incidenza di 0,5-1,3 casi su 100.000 all'anno. L'età media alla diagnosi è di 60 anni e sono colpiti in ugual misura i due sessi (Cervantes et al., 2008). La malattia può presentarsi come tale, ed allora si parla di

Mielofibrosi Primaria (PMF) (Mesa et al., 2007), oppure può presentarsi come evoluzione di una precedente PV o TE ed è quindi detta “secondaria”. La mutazione *JAK2* V617F è riscontrata nel 50-60% dei casi e la sua espressione omozigote si associa più frequentemente ad anomalie citogenetiche, peggiorando la prognosi. Come nella TE, anche nella mielofibrosi la mutazione del gene che codifica per la proteina Calreticulina (*CALR*) è la seconda più frequente mutazione (20-30% dei casi), mentre la mutazione del gene che codifica per *MPL* riguarda circa il 7-10% dei pazienti. Ne deriva che in un 10-20% dei pazienti con diagnosi di mielofibrosi non vengono attualmente rilevate mutazioni e questi casi sono definiti “triplici negativi”.

Il quadro clinico è caratterizzato da: splenomegalia, leucoeritroblastosi (presenza di elementi mieloidi immaturi e eritroblasti in circolo), anisopoichilocitosi delle emazie con dacriociti, fibrosi midollare di entità variabile, fino alla fibrosi serrata e alla osteosclerosi, ed emopoiesi extramidollare, prevalentemente a carico di milza e fegato, ma potenzialmente presente in qualsiasi organo (Barosi 2003; Tefferi 2003; Tefferi 2006). Circa il 20% dei pazienti è asintomatico alla diagnosi; gli esami ematologici possono mostrare anemia, piastrinosi o piastrinopenia e leucopenia o leucocitosi di entità variabili, anche modeste. La maggior parte dei casi viene invece diagnosticata in una fase più avanzata della malattia, quando i sintomi e le alterazioni ematologiche diventano più evidenti. La fibrosi midollare si aggrava e si osservano una progressiva splenomegalia ed epatomegalia dovute all'ematopoiesi extramidollare, con marcata anemia e leucocitosi, e generalmente piastrinopenia. Possono comparire blasti nel sangue periferico, e la malattia può evolvere in una leucemia mieloide acuta. La Mielofibrosi è caratterizzata da un'elevata proliferazione cellulare, che rende ragione dell'aumento numerico delle cellule mature delle diverse serie emopoietiche nel sangue periferico, e da alterazioni del processo maturativo, in particolare a carico della linea megacariocitaria. Il clone megacariocitario rilascerebbe stimoli fibrogenici che sarebbero alla base dell'aumento della deposizione di fibre nel microambiente midollare.

La Mielofibrosi è causata da un'alterazione clonale della cellula staminale pluripotente. Il midollo dei pazienti con MF mostra un aumento del numero di cellule stromali, dei livelli di proteine della matrice extracellulare, dell'angiogenesi e dell'osteosclerosi, oltre alla alterazione dei livelli di varie citochine intra ed extracellulari (Martyre et al., 1994; Martyre et al., 1997).

La fibrosi midollare è una condizione patologica caratterizzata dalla aumentata deposizione di proteine della matrice extracellulare nel midollo osseo. Queste proteine si organizzano in fibre, il cui aumento determina la perdita della funzione ematopoietica del midollo. L'emopoiesi extramidollare, che si sviluppa in sedi eterotopiche, in particolare la milza e il fegato, non ha però il significato di emopoiesi "vicariante" o sostituiva quella midollare. Le citochine coinvolte nello sviluppo della fibrosi sono il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita dei fibroblasti (b-FGF), il fattore piastrinico 4, il fattore di crescita e trasformazione  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), la  $\beta$ -tromboglobulina, la calmodulina, l'interleuchina-1 (IL-1) e il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF). Queste citochine sono prodotte principalmente da due popolazioni cellulari: megacariociti e monociti. Infatti, si suppone che i megacariociti rivestano un ruolo importante nella patogenesi della mielofibrosi, in quanto i pazienti presentano una loro iperplasia, displasia o necrosi midollare, e si ha inoltre aumento degli stessi e dei loro precursori in circolo. Inoltre, sia i megacariociti sia le piastrine presentano un aumentato contenuto e anomalie di produzione e secrezione di PDGF, fattore piastrinico 4, TGF- $\beta$ , b-FGF e calmodulina, tutti contenuti nei granuli  $\alpha$ . La frammentazione e/o la lisi del citoplasma dei megacariociti provoca il rilascio nel microambiente midollare di queste molecole, dove esplicano i loro effetti (Villevall et al., 1997; Taskin et al., 1998; Vannucchi et al., 2005). Comunque, la fibrosi non dipende solo dall'accumulo di collagene, ma anche dall'equilibrio che si stabilisce fra produzione e distruzione. La sintesi di collagene di tipo III è predominante, soprattutto negli stadi precoci, e comporta il rilascio in circolo del peptide aminoterminale della molecola di procollagene. Questi peptidi, detti PC III, possono essere dosati, ed è possibile che i loro livelli riflettano la sintesi di collagene più fedelmente del contenuto totale in collagene del midollo osseo. Nelle fasi più

avanzate della malattia la fibrosi è caratterizzata anche da un'umentata deposizione di fibronectina, tenascina e citronectrina, fino a quadri di vera osteomielosclerosi.

Sui progenitori ematopoietici in particolare agli stadi precoci, il TGF- $\beta$  agisce regolandone negativamente la proliferazione: è stato dimostrato che l'espressione del recettore del TGF- $\beta$  di tipo II è ridotta nelle cellule CD34<sup>+</sup> dei pazienti con MF (Le Bousse-Kerdiles et al., 1996).

La calmodulina è una proteina legante il calcio che, in sede extracellulare, agisce da mitogeno per vari tipi cellulari fra cui i fibroblasti; l'escrezione urinaria della calmodulina è significativamente aumentata in questi pazienti rispetto a quelli affetti da altre sindromi mieloproliferative in assenza di fibrosi.

Nel midollo dei pazienti con MF i monociti sono aumentati di numero e nel siero si trovano alti livelli del fattore stimolante le colonie macrofagiche (M-CSF), una citochina implicata nella proliferazione e differenziazione dei macrofagi (Gilbert et al., 1989).

Non è conosciuta una specifica anomalia cariotipica che abbia permesso di focalizzare l'attenzione su un gene importante per la patogenesi della MF. Tre difetti citogenetici costituiscono tuttavia il 65% delle anomalie riscontrate alla diagnosi: delezione del braccio lungo del cromosoma 13, correlata ad una precoce trasformazione leucemica (Mesa et al., 2009); delezione del braccio lungo del cromosoma 20; e trisomia parziale del braccio lungo del cromosoma 1 (Reilly 2002). La trisomia del cromosoma 8 e la delezione del braccio corto del cromosoma 12 sembrano avere un significato prognostico negativo importante (Tefferi, 2010). Numerosi geni oncosoppressori possono quindi essere coinvolti, fra cui quello del retinoblastoma (RB-1; locus, 13q14) e per il quale la perdita dell'eterozigosi è stata riscontrata nel 23% dei pazienti con PMF. La presenza di alterazioni cromosomiche è stata associata ad una prognosi infausta in numerosi studi (Dupriez et al., 1996). La risposta alla terapia infatti sembra essere inferiore nei pazienti con anomalie del cariotipo.

Durante il corso della malattia possono essere acquisite altre alterazioni citogenetiche che possono essere responsabili della progressione verso la fase

leucemica: in particolare, la mutazione del gene p53, la perdita dell'omozigosi del gene p16 e anomalie molecolari che coinvolgono i proto-oncogeni della famiglia RAS.

La presenza nel sangue periferico di cellule progenitrici ematopoietiche è una caratteristica comune delle sindromi mieloproliferative, ma in particolare riguarda la MF. Le cellule più rappresentate sono le cellule CD34<sup>+</sup>, di cui è presente un numero molto maggiore rispetto alle altre Neoplasie Mieloproliferative Croniche Ph negative. Analizzando questa popolazione cellulare utilizzando altri marcatori di superficie, come il CD38, è emerso che le cellule CD34<sup>+</sup> che lasciano il midollo dei pazienti con MF hanno diversi livelli di differenziazione, in quanto il CD38 è scarsamente espresso sulle cellule ematopoietiche dotate di alto potenziale di autorigenerazione e di capacità differenziativa. Invece, nella MF, il CD38 risulta coespresso con il CD34 nelle cellule in circolo in percentuale molto variabile, dal 23 al 99% (Barosi et al., 2001).

Il numero delle cellule CD34<sup>+</sup> circolanti è un parametro importante per la diagnosi di MF: è stato dimostrato che il numero di queste cellule è 360 volte più alto nei pazienti affetti dalla patologia rispetto alla popolazione sana, e da 18 a 30 volte maggiore rispetto ai casi di PV e TE. La soglia di  $15 \times 10^6$  cellule/L permette di discriminare i casi di MF non in terapia citoreducitiva rispetto alle altre Neoplasie Mieloproliferative Croniche Ph negative con un valore predittivo positivo del 98,4% e negativo dell'85%. Inoltre, il numero di cellule CD34<sup>+</sup> correla con la progressione della malattia ed è un marcatore di metaplasia mieloide (Barosi et al., 2001). Rispetto ai controlli, nei pazienti con MF primaria sono presenti in circolo molte più cellule pluripotenti, in particolare le unità formanti le colonie CFU-MK (megacariocitarie), e in misura minore CFU-GM (granulo-monocitarie), BFU-E (unità formanti i bursts eritrocitari), CFU-GEMM (granulocitarie, eritroidi, monocitarie, megacariocitarie).

### 1.2.2 *La Policitemia Vera*

La Policitemia Vera (PV) è una malattia mieloproliferativa cronica caratterizzata dall'incremento assoluto della massa eritrocitaria, spesso accompagnata da leucocitosi, trombocitosi e splenomegalia, da un quadro di pannielosi con iperplasia eritroide, granulocitaria e megacariocitaria, dall'indipendenza dell'iperplasia eritroide dal fisiologico fattore di crescita, eritropoietina (EPO) e dalla mutazione V617F (95% dei casi) o da mutazioni rare localizzate nell'esone 12 del gene di *JAK2*. L'incidenza della PV è stimata fra 2,3 e 2,8 per 100.000 persone all'anno, con un rapporto maschi/femmine di circa 1,2:1. La prevalenza in Italia è di circa 30 casi per 100.000 persone (Ruggeri et al., 2003). La stima è probabilmente conservativa perché la PV è più frequente nell'età avanzata e non include alcuni casi con malattia iniziale.

Nel 1974, Prchal et al. (Prchal et al., 1974) hanno riportato per la prima volta che le colture di cellule emopoietiche di pazienti con PV formavano colonie eritroidi *in vitro* anche in assenza dell'aggiunta di EPO al terreno di coltura. Questo effetto è stato definito "endogenous (or EPO-independent) erythroid colonies (EEC)".

Nel 2005, differenti gruppi di ricerca hanno descritto la mutazione V617F del gene *JAK2*. Attualmente, la mutazione V617F, e altre mutazioni più rare nell'esone 12 di *JAK2*, sono considerate marcatori della malattia ed un possibile bersaglio per trattamenti mirati, anche se il ruolo di *JAK2* mutato come unico evento patogenetico della PV è dibattuto e attualmente oggetto di ulteriori studi.

Nello studio ECLAP, il principale fattore di rischio associato all'evoluzione mielofibrotica della PV è stato la durata della malattia. (Marchioli et al., 2005). La trasformazione in leucemia acuta può essere preceduta o meno da una fase spenta di mielofibrosi ed è di regola mieloide con esito quasi sempre fatale. Nello studio ECLAP, fattori di rischio riconosciuti per evoluzione in leucemia acuta e mielofibrosi sono stati l'età, la durata della malattia, la leucocitosi e l'utilizzo di farmaci alchilanti (non idrossiurea da sola), pipobromano o di fosforo radioattivo (Tefferi et al., 2013).

Non è chiaro se il carico allelico di *JAK2* mutato abbia un ruolo patogenetico nelle trombosi della PV. Attualmente la percentuale dei pazienti che sviluppano dopo la

diagnosi complicazioni cardiovascolari è dimezzata in confronto a quanto osservato nello studio ECLAP, che ha arruolato pazienti con diagnosi precedente alla scoperta della mutazione di *JAK2* (2005). È probabile che tale riduzione sia da ascrivere a una più precoce diagnosi, ad una migliore gestione dei fattori di rischio CV, all'utilizzo di aspirina e all'osservazione più accurata della soglia terapeutica dell'ematocrito con salassi e chemioterapia (Marchioli et al., 2013; Barbui et al., 2015).

### *1.2.3 La via di segnalazione JAK-STAT*

Le Janus Kinasi (JAK) sono una famiglia di tirosin chinasi non recettoriali che in risposta a stimolazione da parte di citochine trasducono un segnale attraverso la via JAK-STAT. Le JAK hanno una dimensione variabile tra i 120 e i 140 kDa e presentano sette domini di omologia JAK conservati (JH, JAK Homology): le due regioni JH carbossil terminali rappresentano i domini chinasi e pseudochinasi (JH1 e JH2), i quattro domini JH amino terminali (metà di JH4, JH5, JH6 e JH7) costituiscono il dominio FERM che media l'associazione dei recettori, mentre il restante dominio SH2 (costituito da JH3 e metà di JH4) presenta funzione non nota. In modo simile alle altre tirosin chinasi, l'attivazione è iniziata dalla fosforilazione di tirosine specifiche nel loop di inattivazione, dopodiché l'associazione delle JAK avviene su domini box1/box2 ricchi in prolina vicini alla membrana.

La famiglia delle JAK chinasi presenta quattro membri: JAK1, JAK2, JAK3 e la tirosin chinasi TYK2. Quest'ultima è solitamente associata ai recettori citochinici per Interferon (IFN) tipo I, IL-6 e IL-10, svolgendo un ruolo nella risposta immunitaria di tipo Th2 e contribuendo all'effetto letale delle endotossine attraverso un pathway STAT-1 indipendente. JAK1 è associata a recettori dell'IFN di tipo I e di tipo II, ai recettori di IL-2 e IL-6. JAK2 invece è implicata nella risposta alle famiglie di recettori a singola catena (Epo-R, GH-R, PL-3) ed IL-3, oltre che alla famiglia del recettore dell'IFN. JAK3 infine, è una tirosin chinasi specifica dei leucociti e si associa esclusivamente con la catena del recettore

dell'IL-2: questa catena costituisce una componente importante dei recettori di diverse citochine linfotropiche, incluse IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21, e mutazioni in questa catena o in JAK3 portano a severe immunodeficienze combinate.

Le proteine trasduttrici dei segnali e attivatrici della trascrizione (STAT, Signal Transducers and Activator of Transcription) sono proteine che presentano fra di loro alti livelli di omologia in alcune regioni, tra le quali il dominio SRC2 (SH2) essenziale per la dimerizzazione delle proteine STAT, il dominio di legame al DNA ed un dominio di trans-attivazione posto all'estremità carbossil terminale. Nell'uomo sono state identificate sette STAT: STAT1, 2, 3, 4, STAT5A/B e STAT6. La via di segnalazione JAK/STAT rappresenta una via di trasduzione del segnale condivisa da numerose citochine, che in seguito al legame con una o più subunità del proprio recettore ne inducono la dimerizzazione, portando all'avvicinamento delle JAK ad esso costitutivamente associate ed alla loro attivazione per trans-fosforilazione. In seguito alla loro attivazione, le JAK fosforilano i residui di tirosina presenti sulla coda citoplasmatica dei recettori citochinici creando dei siti di reclutamento per le STAT: queste proteine citoplasmatiche vengono poi fosforilate dalle JAK chinasi ed in seguito a dimerizzazione traslocano a livello nucleare, dove agiscono come fattori di trascrizione promuovendo l'espressione di geni specifici. La via di segnalazione JAK/STAT è principalmente coinvolta nella trasmissione di segnali di sopravvivenza o apoptosi, proliferazione o differenziamento cellulare. Questa via di segnalazione svolge inoltre un ruolo preponderante nel controllo delle risposte immunitarie e nel differenziamento delle diverse popolazioni leucocitarie nelle rispettive sottopopolazioni in funzione del contesto in cui si trovano. Alterazioni di questa via sono riscontrabili in molti disordini immuni, infiammatori e disordini ematopoietici di natura neoplastica.

Recenti studi hanno suggerito il coinvolgimento della via di segnalazione costituita dalle proteine JAK/STAT, attraverso l'attivazione costitutiva di STAT5 sia nelle cellule CD34<sup>+</sup> sia nei megacariociti (Komura et al., 2005). Recentemente è stata descritta una mutazione somatica nell'esone 14 del gene *JAK2*, che codifica per una proteina con attività tirosin-chinasica associata al dominio citoplasmatico di

molti recettori per citochine. Questa mutazione coinvolge il nucleotide 1849 e consiste nella sostituzione di una guanina con una timina, che origina un codone codificante una valina invece di uno per la fenilalanina (*JAK2* V617F). La sostituzione aminoacidica cade all'interno del dominio pseudo-chinasico della proteina, che esplica un'attività di controllo auto-inibitorio su *JAK2*. La mutazione comporta la perdita di questa auto-inibizione e quindi un'attivazione costitutiva di *JAK2* e di tutta la cascata di segnalazione a valle. Vari esperimenti hanno dimostrato che la mutazione *JAK2*V617F provoca la crescita cellulare indipendente da fattori di crescita e una ipersensibilità verso i fattori di crescita, come dimostra anche la crescita di colonie eritroidi spontanee (BFU-E) in pazienti con PV. Questa mutazione può pertanto rappresentare il primo marker molecolare della MF, anche se la maggior frequenza con cui si riscontra nella PV suggerisce che vi siano altre possibili alterazioni metaboliche e molecolari alla base della patogenesi di questa malattia (Baxter et al., 2005; James et al., 2005; Kralovics et al., 2005; Levine et al., 2005).

#### 1.2.4 *Ruxolitinib e Studi COMFORT*

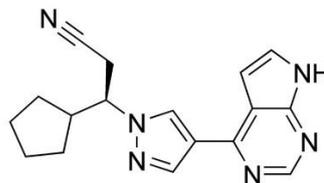


Figura 1.9: Struttura chimica di Ruxolitinib

Ruxolitinib è un inibitore selettivo di *JAK1* e *JAK2*.

Ruxolitinib è stato approvato nel 2011 dalla US Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento della MF a rischio Intermedio-alto. Più recentemente, anche la Health Canada e la European Commission ne hanno consentito l'utilizzo per il trattamento della mielofibrosi accompagnata da splenomegalia e sintomi sistemici legati alla malattia.

Gli Studi COMFORT I e II (COntrolled MyeloFibrosis study with Oral JAK2 Inhibitor Treatment) sono stati condotti per valutare l'efficacia e la sicurezza del farmaco nel trattamento della mielofibrosi primitiva (MFI) o secondaria (MF post-PV e MF post-TE). Lo studio COMFORT-I era un studio in doppio cieco controllato con il placebo; il COMFORT-II, invece, era uno studio aperto che metteva a confronto l'efficacia e la sicurezza di Ruxolitinib verso la miglior terapia attualmente disponibile in commercio per il trattamento della mielofibrosi. In entrambi gli studi è stato riscontrato che i pazienti che ricevevano Ruxolitinib mostravano riduzioni rapide e durevoli delle dimensioni della milza, miglioramenti dei sintomi costituzionali associati alla malattia e, in generale, miglioramenti notevoli della qualità di vita. Al contrario, i pazienti all'interno degli stessi studi ma nei gruppi di controllo (con placebo o con BAT), avevano generalmente aumenti della splenomegalia e peggioramento dei sintomi costituzionali legati alla malattia. Lo studio COMFORT-I è stato condotto prevalentemente negli U.S.A. ed ha avuto lo scopo di confrontare l'efficacia e la sicurezza del nuovo farmaco JAK1/JAK2 inibitore somministrato alle dosi di 15-20 mg BID, con placebo, in una coorte di 309 pazienti [Harrison et al., 2012]. L'endpoint primario dello studio era la valutazione della riduzione delle dimensioni spleniche > del 35%, dal basale alla Settimana 24, misurato con tecniche di imaging o con l'esame obiettivo ogni 12 settimane, fino alla Settimana 72. Tra gli endpoints secondari si collocavano il mantenimento nel tempo di tale riduzione e la percentuale di soggetti che raggiungevano > 50% di riduzione dei sintomi costituzionali dal baseline alla settimana 24 di trattamento.

Lo studio COMFORT II, condotto sia negli U.S.A. che in Europa su 219 pazienti, era uno studio randomizzato di fase III, in doppio cieco, con inibitore JAK1/JAK2 (INCB018424) orale, verso la miglior terapia allora disponibile in commercio (best available therapy, BAT), in pazienti con mielofibrosi primaria (MF), mielofibrosi post-policitemia vera o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. La "Best available therapy, BAT" includeva i migliori agenti disponibili in commercio per il trattamento della MF (in monoterapia o in combinazione) oppure la sola osservazione. Anche in questo studio l'endpoint primario era la diminuzione del

volume della milza > del 35%, dal basale alla Settimana 48, misurato con tecniche di imaging quali MRI o 60 TC ogni 12 settimane fino alla Settimana 72. Tra gli endpoints secondari erano la sopravvivenza libera da leucemia, la sopravvivenza globale, quella libera da progressione e la durata del mantenimento di una riduzione > 35% rispetto al basale del volume della milza.

#### *1.2.4.1 Risultati studi COMFORT-I e COMFORT-II*

Le analisi degli studi COMFORT-I e COMFORT-II sono state effettuate quando tutti i pazienti arruolati nei due protocolli sono giunti alla settimana 24 (data cut-off, 2 Novembre 2010) [Verstovsek et al., 2012] di arruolamento per lo studio COMFORT-I ed alla settimana 48 (data cut-off 4 Gennaio 2011) [Harrison et al., 2012] per lo studio COMFORT-II. Nell'analisi dei dati relativi al follow-up a tre anni dello studio COMFORT-II, i pazienti trattati con Ruxolitinib avevano ottenuto un vantaggio per quanto riguarda la sopravvivenza globale rispetto ai pazienti che avevano ricevuto la terapia tradizionale. In particolare, il 51,4% dei pazienti trattati con Ruxolitinib aveva conseguito una riduzione  $\geq 35\%$  delle dimensioni della milza rispetto ai valori basali. I pazienti avevano continuato a mantenere la risposta splenica, con una riduzione mediana delle dimensioni della milza. Complessivamente 191 pazienti sono stati esposti a Ruxolitinib entro la data di cut-off, 146 pazienti sono stati inizialmente randomizzati al trattamento con 62 Ruxolitinib e 45 pazienti sono passati a Ruxolitinib dopo essere stati inizialmente assegnati al braccio con la terapia tradizionale. È stata osservata, inoltre, una riduzione del rischio di morte del 52% nel braccio con Ruxolitinib rispetto alla terapia tradizionale (HR=0,48; IC al 95%, 0,28-0,85; p=0,009) e la probabilità stimata di sopravvivenza globale era significativamente maggiore con Ruxolitinib rispetto alla terapia tradizionale (rispettivamente 81% rispetto al 61%) a 144 settimane.

## 2 SCOPO DEL LAVORO

I processi di rimodellamento e omeostasi del microambiente midollare sono fisiologicamente regolati da numerosi segnali intrinseci ed estrinseci comprendenti sia segnali cellulari sia regolatori umorali generati dalla nicchia emopoietica. Oltre che dalle cellule staminali emopoietiche, la nicchia emopoietica è composta da fibroblasti, osteociti e adipociti derivanti da cellule staminali mesenchimali, di origine mesodermica. Queste cellule interagiscono con le cellule staminali emopoietiche attraverso molecole di adesione all'interno e nelle vicinanze della superficie dell'endosteo e dello spazio perivascolare, regolandone le capacità di self-renewal e differenziazione.

È plausibile pensare che l'attivazione costitutiva di JAK2, in pazienti con Mielofibrosi e Policitemia Vera, comporti, nelle cellule staminali emopoietiche CD34<sup>+</sup>, la perdita dell'equilibrio fisiologicamente presente nel microambiente della nicchia emopoietica, per "overgrowth" delle stesse cellule staminali emopoietiche. Questo evento potrebbe causare l'attivazione aberrante di pathway di segnale nelle cellule staminali mesenchimali della nicchia emopoietica con conseguente fibrosi midollare. Ad oggi scarsi, o quasi nulle, sono le informazioni che riguardano le interazioni tra le cellule staminali/stromali mesenchimali residenti nel midollo osseo e il Ruxolitinib. Per contro, una grossa mole di dati dimostra come cellule ematiche anomale immature presenti in diverse forme di mielofibrosi residenti o non nel midollo osseo siano sensibili al Ruxolitinib, mostrando sensibilità al farmaco, efficace nel migliorare il decorso clinico della patologia mielofibrotica.

Sulla base delle evidenze presenti in letteratura, abbiamo ipotizzato che le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo possano svolgere un duplice ruolo nel controllo della tossicità del farmaco, dipendente dalla loro capacità di sequestrarlo e rilasciarlo nel microambiente. Per dimostrare tale ipotesi, abbiamo investigato *in vitro* la capacità modulatoria sull'effetto inibitorio del Ruxolitinib delle BMMSC isolate da pazienti con Mielofibrosi e Policitemia Vera su cellule di una linea cellulare stabilizzata immatura (SET-2) portante la mutazione *JAK V617F* ed

esprime il marcatore staminale emopoietico CD34. Inoltre, nell'ipotesi che le BMMSC possano comportarsi da "reservoir" per Ruxolitinib nella nicchia emopoietica, è stata investigata l'azione inibente la crescita su cellule SET-2 in colture con BMMSC primarie. Per lo sviluppo del progetto di ricerca si è fatto riferimento a modelli sperimentali già validati, corredandoli di ulteriori approfondimenti in relazione agli obiettivi di studio prefissati.

Il lavoro svolto si è articolato nei seguenti quattro punti:

- *Ottenimento ed espansione fino al terzo passaggio in piastra di linee cellulari di BMMSC primarie da midollo osseo di pazienti con MF o PV, con diagnosi istologica e presenza della mutazione JAK2 V617F.*
- *Valutazione in vitro dell'up-take e del rilascio di Ruxolitinib da parte delle BMMSC e mediante estrazione dai surnatanti colturali con quantizzazione del farmaco tramite High Performance Liquid Chromatography (HPLC);*
- *Valutazione in vitro del potenziale anti-proliferativo di Ruxolitinib puro e del medium condizionato ottenuto da MSC trattate con Ruxolitinib su linea cellulare immortalizzata SET-2.*
- *Valutazione in vitro del potenziale inibitorio delle BMMSC trattate o non con Ruxolitinib sulla proliferazione di cellule immortalizzate SET-2 a differenti rapporti di semina BMMSC/SET-2.*

### 3 MATERIALI E METODI

#### 3.1 Ruxolitinib

Ruxolitinib puro (10 mg) è stato fornito da Novartis Pharma. Il liofilizzato è stato risospeso in DMSO, come suggerito da Novartis, alla concentrazione di 50 µg/mL. Successive diluizioni in DMSO, sono state effettuate fino ad ottenere la concentrazione di utilizzo di 5 µg/mL.

#### 3.2 Cellule staminali mesenchimali umane isolate da midollo osseo (*Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMMSC*)

Tutte le operazioni di manipolazione delle cellule sono state condotte in condizioni di sterilità utilizzando una cappa a flusso laminare.

##### 3.2.1 Prelievo campioni midollari

Il sangue di midollo osseo per l'isolamento delle MSC, in seguito alla sottoscrizione di consenso informato, è stato ottenuto da agoaspirati midollari di soggetti con precedente diagnosi di MF o PV con mutazione *JAK2 V617F* e conferma di diagnosi istologica, non in fase di terapia attiva con Ruxolitinib.

ID	Sesso	Età (anni)	Codice Lab	Diagnosi
L.D.C.	F	86	BMSC201673	MILOFIBROSI <i>JAK2+</i>
R.D.M.	F	44	BMSC201684	MILOFIBROSI <i>JAK2+</i>
V.R.	M	48	BMSC201764	POLICITEMIA VERA <i>JAK2+</i>
G.M.	M	68	BMSC201775	MILOFIBROSI <i>JAK2+</i>
D.V.G.	M	55	BMSC201806	POLICITEMIA VERA <i>JAK2+</i>

Tabella I: Caratteristiche e diagnosi dei pazienti donatori di midollo osseo

### 3.2.1.1 *Isolamento BMMSC*

Da 5 mL di sangue midollare collezionato in Vacutainer eparinizzato, 200  $\mu$ L sono stati utilizzati per l'esame emocromocitometrico al fine di verificare la concentrazione di cellule mononucleate, le quali, tra le altre, comprendono le cellule staminali mesenchimali. In base ai risultati dell'esame, il midollo intero è stato seminato ad una densità di 50.000 cellule mononucleate/cm<sup>2</sup> in terreno di crescita completo, formulato come segue: alpha-MEM con L-Glutamina (Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification; Corning) supplementato con il 10% di siero (Fetal Bovine Serum - FBS; Corning) e antibiotico-antimicotico (Biowest). Trascorse 72 ore dalla semina, il terreno di coltura è stato rimosso, le cellule lavate con soluzione tampone isotonica (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PBS; Corning) e successivamente è stato aggiunto terreno alpha-MEM completo fresco. Le cellule sono state mantenute in coltura e osservate al microscopio ottico a contrasto di fase (Eurotek INV-100T) per visualizzare la formazione di colonie di cellule staminali mesenchimali. Trascorsi 14 giorni dalla semina, le colonie di BMMSC sono state staccate dalla plastica e le cellule contate secondo la procedura descritta di seguito (paragrafo 3.2.2 "Coltura ed espansione") ed infine riseminate su un'adeguata superficie di coltura in base al numero di cellule ottenute, ad una densità di 4.000 cellule/cm<sup>2</sup>, in terreno alpha-MEM completo.

### 3.2.2 *Coltura ed espansione*

Le cellule sono state seminate in flask da 175 cm<sup>2</sup> di superficie (BD Falcon) ad una densità di 4.000 cellule/cm<sup>2</sup> in medium di coltura alpha-MEM completo.

Per permettere la crescita, le colture cellulari sono state incubate a 37°C in un'atmosfera umidificata contenente il 5% di CO<sub>2</sub>; il terreno di coltura alpha-MEM completo è stato cambiato due volte a settimana. Le colture cellulari sono state espanse fino al passaggio 3 (P3), passaggio precoce scelto arbitrariamente,

poiché permette di ottenere un buon numero di cellule per poi poter procedere con gli esperimenti prefissati.

Le cellule, una volta raggiunta la confluenza del 90-95% in ogni flask, sono state raccolte e successivamente riseminate ad una densità 4.000 cellule/cm<sup>2</sup> secondo la seguente procedura:

- aggiunta di Trypsin/EDTA 0.025% (Biowest, 4,5 mL/Flask) e successiva incubazione a 37°C per 7 minuti per permettere l'azione dell'enzima e il conseguente distacco delle cellule aderenti dalla plastica;
- aggiunta di 7 mL di PBS per ogni flask, per permettere il lavaggio e la raccolta delle cellule, e successivo trasferimento in una Falcon da 50 mL (BD Falcon);
- ulteriore lavaggio della flask con 10 mL di PBS per raccogliere eventuali cellule residue;
- centrifugazione delle cellule a 1300 RPM per 10 minuti per permettere la loro deposizione sul fondo del tubo;
- eliminazione del surnatante per rovesciamento del tubo e successiva risospensione delle cellule in PBS per la conta cellulare.

Le cellule sono state contate utilizzando una Camera di Burker, secondo la seguente procedura:

- risospensione del pellet cellulare in un adeguato volume di PBS;
- prelievo di 10 µl della sospensione cellulare e caricamento nella Camera di Burker;
- conta cellulare al microscopio ottico a contrasto di fase di tre quadranti della Camera e successiva conta media;
- calcolo del numero totale di cellule moltiplicando il numero ottenuto per il fattore di diluizione della camera (10<sup>3</sup>), per il fattore di diluizione della sospensione cellulare e per il volume totale iniziale;
- la diluizione iniziale in PBS è stata eseguita in modo da avere una conta di circa 50 cellule per quadrante; se la sospensione cellulare risultava essere maggiormente concentrata, è stata effettuata una diluizione ulteriore per poter ottenere una conta affidabile;

- centrifugazione delle cellule risospese in PBS a 1300 RPM per 10 minuti, scarto del surnatante per rovesciamento del tubo e risospensione del pellet cellulare in un adeguato volume di terreno alpha-MEM completo;
- semina in flask (T75 cm<sup>2</sup> o T175 cm<sup>2</sup>) alla densità di 4.000 cellule/cm<sup>2</sup>.

### 3.2.3 Crioconservazione

#### 3.2.3.1 Congelamento

Le cellule sono state staccate dalla plastica, raccolte e contante in Camera di Burker secondo la procedura descritta in precedenza. In seguito, le cellule sono state nuovamente centrifugate a 1300 RPM per 10 minuti e risospese in una soluzione di risospensione precedentemente conservata a 4°C e composta nel seguente modo: 50% soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) + 50% HSA 200 mg/L (Human Serum Albumin, Istituto Grifols, S.A.). Quest'ultima e tutte le seguenti operazioni sono state effettuate in ghiaccio.

Le cellule sono state risospese in modo che, alla fine della procedura, ogni criotubo da 2 mL contenesse al massimo 750 µl di una soluzione di risospensione contenente al massimo 1x10<sup>6</sup> cellule. La sospensione cellulare preparata in questo modo è stata trasferita nel criotubo, al quale sono stati aggiunti 750 µl di una soluzione di congelamento precedentemente conservata a 4°C e composta nel seguente modo: 30% di soluzione fisiologica, 50% di HSA e 20% di dimetilsolfossido (DMSO). La concentrazione finale all'interno del criotubo è stata quindi del 10% per il DMSO e del 50% per l'albumina. I criotubi sono stati trasferiti a -80°C all'interno di Cryo Freezing container (NALGENE) contenenti isopropanolo, per una discesa graduale della temperatura e preservazione della vitalità cellulare. Trascorse 24 ore, i criotubi sono stati trasferiti in box adatti mantenuti a -80°C in appositi congelatori fino al loro utilizzo.

### 3.2.3.2 *Scongelamento*

I criotubi contenenti le cellule congelate sono stati prelevati dai congelatori e scongelati in un bagnetto a 37°C; la sospensione cellulare è stata quindi trasferita in tubi da 15 mL ed una soluzione di scongelamento (10 mL per ogni criotubo, composta da alpha-MEM al 10% di FBS) è stata aggiunta goccia a goccia. Si è proceduto alla centrifugazione a 1300 RPM per 10 minuti; il surnatante è stato scartato per rovesciamento del tubo e la sospensione cellulare risospesa in un adeguato volume di PBS per effettuare la conta cellulare in camera di Burker secondo la procedura precedentemente descritta. Infine, le cellule sono state seminate in condizioni di coltura standard. Trascorse 24 ore dalla semina, il terreno è stato sostituito con terreno alpha-MEM completo fresco, al fine di eliminare ogni traccia di DMSO eventualmente rilasciato dalle cellule precedentemente scongelate.

### 3.2.4 *Caratterizzazione*

Le MSC sono state caratterizzate in base all'espressione di marcatori di superficie specifici valutati attraverso citofluorimetria a flusso laminare in multiparametrica con strumento BD FACSVersè.

#### 3.2.4.1 *Marcatori di mesenchimalità in citofluorimetria*

In base alle linee guida stabilite dalla ISCT, la caratterizzazione citofluorimetrica delle MSC è stata effettuata investigando l'espressione di marcatori mesenchimali quali il CD105, il CD73 e il CD90, e la mancata espressione del marcatore del compartimento ematopoietico CD34 e dei marcatori CD45, HLA-DR e CD14.

Gli anticorpi monoclonali utilizzati sono stati: CD105-PE, CD90-FITC, CD45-PE-Cy7, CD34-PE-Cy7, e CD14-PE-Cy7 (Beckman Coulter, BC); e CD73-APC (Miltenyi Biotech). Come controlli Isotipici sono stati usati: IgG-FITC, IgG-PE, IgG-PE-Cy7, e IgG-APC (Beckman Coulter, BC).

Lo staining è stato effettuato seguendo tale procedura:

- Sono state preparate due mix di anticorpi  
Mix 1: CD90-FITC (2,5  $\mu$ l), CD105-PE (10  $\mu$ l), CD73-APC (5  $\mu$ l), CD45-PE-Cy7 (10  $\mu$ l)  
Mix 2: HLA-DR-FITC (10  $\mu$ l), CD3- PE (10  $\mu$ l), CD14-PE-Cy7 (10  $\mu$ l).
- Sono stati allestiti 4 tubi per l'analisi contenenti 100.000 BMMSC per ogni linea cellulare, in un volume finale di 200  $\mu$ l in PBS;
- In 2 tubi separati sono state aggiunte le due mix di anticorpi (27,5  $\mu$ l della mix 1 e 30  $\mu$ l della mix 2), mentre nel terzo tubo sono state aggiunte cellule non marcate da utilizzare come controllo negativo e nel quarto tubo le cellule sono state marcate con il controllo isotipico;
- incubazione al buio per 30 minuti a temperatura ambiente;
- lavaggio con aggiunta di 1 mL di PBS e successiva centrifugazione a 1300 RPM per 10 minuti in modo da eliminare l'anticorpo in eccesso non legatosi;
- eliminazione del surnatante e aggiunta di 400  $\mu$ l di PBS per risospendere il pellet di cellule marcate.

I campioni sono stati successivamente acquisiti al citofluorimetro BD FACSVeSe ed analizzati con software di analisi BD FACSuite.

### 3.3 *Linea cellulare stabilizzata SET-2*

La linea cellulare SET-2 (ACC-608) è stata acquistata dai laboratori della DSMZ company. Tale linea è stata isolata da sangue periferico di una paziente femmina di 71 anni alla quale era stata diagnosticata una trombocitemia essenziale. In letteratura tali cellule sono state descritte come portanti la mutazione JAK2 V617F. il loro assetto immunofenotipico è il seguente: CD3-, CD4+, CD7+, CD13+, CD14-, CD15-, CD19-, CD33+, CD34+, CD38+, CD42-, CD71+, HLA-DR+.

La linea cellulare stabilizzata SET-2 è stata scongelata ed espansa seguendo le indicazioni fornite dalla DSMZ company. Brevemente, le cellule scongelate in RPMI completo v/v, così formulato: RPMI 1640 con L-Glutamina supplementato con il 20% di siero (Fetal Bovine Serum - FBS; Corning) e antibiotico (penicillina-streptomicina-amfotericina B rispettivamente nelle seguenti proporzioni 100 U/mL, 100 Ig/mL, e 0.25 Ig/mL; Biowest), sono state coltivate in piastra da 12 pozzi ad una concentrazione di  $1,2 \times 10^6$  cellule/pozzo/1,5 mL di terreno RPMI completo. Due volte a settimana le cellule sono state splittate 1 a 2, fino al raggiungimento di un ingente numero al fine di poterle utilizzare negli esperimenti. Le restanti cellule sono state congelate seguendo le istruzioni fornite dalla DSMZ company.

### 3.4 Valutazione *in vitro* dell'uptake e del rilascio di Ruxolitinib dalle BMMSC

Per valutare se le BMMSC siano state in grado di captare e rilasciare il farmaco, si è effettuata un'analisi *in vitro*. Alle BMMSC in P3 dopo 72 ore di coltura successive alla loro semina è stato aggiunto Ruxolitinib alla concentrazione di 5 µg/mL (MSCs-Ruxo); le stesse linee cellulari sono state coltivate anche in assenza del trattamento con Ruxolitinib (controlli negativi). Dopo 30 minuti dall'aggiunta di Ruxolitinib, una aliquota del mezzo è stata prelevata dalle colture trattate e dai controlli negativi, e conservata per analisi in HPLC. Le cellule sono poi state mantenute in coltura per altre 24 ore e al termine dell'incubazione con o senza Ruxolitinib, prima di staccare le cellule, il medium condizionato (CM) e il solo medium colturale senza Ruxolitinib sono stati raccolti in Falcon da 50 mL per il saggio funzionale di proliferazione (CCK-8 assay, paragrafo 3.6) e per analisi HPLC.

Le cellule BMMSC sono state staccate mediante la seguente procedura:

- lavaggio delle cellule adese con PBS per 3 volte consecutive (per eliminare eventuali residui di Ruxolitinib)
- aggiunta di Trypsin/EDTA 0.025% (Biowest, 4,5 mL /Flask) e successiva incubazione a 37°C per 7 minuti per permettere l'azione dell'enzima e il conseguente distacco delle cellule aderenti dalla plastica;
- aggiunta di 3 mL di alpha-MEM completo per ogni flask, per permettere il lavaggio e la raccolta delle cellule, e successivo trasferimento delle cellule così ottenute in un tubo da 50 mL (BD Falcon);
- ulteriore lavaggio della flask con 3 mL di alpha-MEM completo per raccogliere eventuali cellule residue;
- centrifugazione delle cellule a 1300 RPM per 10 minuti per permettere la loro deposizione sul fondo del tubo;
- raccolta per rovesciamento del tubo in un nuovo tubo del surnatante per analisi HPLC (gli ultimi due punti sono stati ripetuti 3 volte al fine di essere sicuri di allontanare tutto il Ruxolitinib precedentemente aggiunto)
- successiva risospensione delle cellule in alpha-MEM completo per la conta cellulare.

Le cellule sono state contate utilizzando una Camera di Burker, come precedentemente descritto. Si è infine proceduto alla semina a passaggio 4 sia delle BMMSC trattate con Ruxolitinib sia delle BMMSC non trattate con il farmaco, in tre dish da 9,6 cm<sup>2</sup> (BD) alla densità di 4.000 cellule/cm<sup>2</sup>. Dopo 24, 48 e 72 ore di coltura, i medium condizionati con Ruxolitinib e i medium delle colture libere da Ruxolitinib sono stati raccolti ed ognuno è stato utilizzato per testare l'assorbimento di membrana ed il rilascio di Ruxolitinib nel CM mediante metodica HPLC. Si è proceduto inoltre, a 48 e 72 ore dalla semina a P4 e dopo raccolta dei medium di coltura, a tripsinizzare le BMMSC trattate e non con Ruxolitinib, e a lisarle in una soluzione composta da alpha-MEM completo privo di siero con 0,1% sodio dodecilsolfato (SDS), in un volume finale di in 300 µL, mediante l'utilizzo di un sonicatore (Qsonica modello Q700) impostato come segue: Amplitude 10, Process time 30 sec, Pulse-ON time 5 sec, Pulse-OFF time 30 sec. Tutti i lisati cellulari sono stati analizzati in HPLC per la quantizzazione di Ruxolitinib.

### 3.5 *Metodica di estrazione di Ruxolitinib in HPLC*

#### 3.5.1 *Procedura analitica*

La cromatografia è una tecnica che permette di separare due o più composti presenti in un solvente sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica e una "fase mobile" che fluisce attraverso essa. Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiegherà un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo di ritenzione), rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta affinità per la fase mobile. La cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC, High Performance Liquid Chromatography), è un tipo di cromatografia liquida che rappresenta l'evoluzione strumentale della cromatografia in fase liquida su colonna classica. La procedura analitica è stata validata in accordo con le linee guida EMA (European Medicine Agency) sulla validazione dei metodi analitici (EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev.Corr. 2).

Secondo queste linee guida il limite inferiore di rilevamento (LLOD), viene definito come la più bassa concentrazione alla quale è possibile discriminare con certezza il segnale del picco dell'analita (S) dal rumore di fondo (N), e l'area del picco dell'analita deve essere almeno tre volte quella del rumore di fondo ( $S/N \geq 3$ ). Il limite inferiore di quantificazione (LLOQ), corrispondente alla concentrazione più bassa analizzabile per la quale i valori di precisione e accuratezza presentano un errore inferiore al 15% (sulla base dell'analisi in triplicato), risponde ad un'intensità di picco almeno 5 volte superiore rispetto al rumore di fondo. Da un precedente studio (Charlier B. et al., 2018) effettuato su plasma è stato stabilito che il LLOD del metodo utilizzato per la quantificazione del Ruxolitinib era di 0,05 ng/mL, mentre il LLOQ è di 0,1 ng/mL. Per il nostro studio su CM, il LLOD ed il LLOQ non sono stati definiti, per cui valori di 1 pg/mL sono stati in ogni caso inseriti nell'analisi perché quantificabili.

Per misurare i livelli di Ruxolitinib nei campioni cellulari trattati, in una provetta safe-lock da 1,5 mL sono stati aggiunti a 100  $\mu$ L di solo medium colturale privo di Ruxolitinib o CM e 5  $\mu$ L di 2,3-diamminonaftalene utilizzato come standard

interno (concentrazione iniziale di 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Dopo aver vortexato, alle mix sono stati aggiunti 400  $\mu\text{L}$  di MeOH 100%, in modo da favorire la precipitazione delle proteine. La provetta è stata poi centrifugata a 17,000g per 10 minuti (Eppendorf Centrifuge 5415R). Il surnatante recuperato è stato trasferito in una nuova safe-lock da 1,5 mL e portato a secco in SpeedVac (SAVANT DNA 120 SpeedVac concentrator). Successivamente, il pellet è stato risospeso in Fase Mobile composta da una miscela di Acqua/Acetonitrile 67:33 pH=4.8 con Acido Ortofosforico 25%; 25  $\mu\text{L}$  della soluzione così ottenuta sono stati iniettati nel sistema cromatografico HPLC (Waters) dotato di un sistema di pompa binario (modello 1525) equipaggiato con rilevatore fluorimetrico (Waters modello 2475) con lunghezze d'onda del fluorimetro settate a: eccitazione = 320 nm / emissione = 386 nm, un photodiode array detector (Waters modello 2998) e un campionatore automatico (Waters modello 2707). Il rivelatore applicato alla fine della colonna Waters Symmetry C18 (4.6 $\times$ 75mm, 3,5 $\mu\text{m}$ ) e il calcolatore hanno permesso di analizzare in continuo l'uscita della colonna e quindi di quantificare Ruxolitinib presente nei campioni iniettati tramite specifico cromatogramma. L'acquisizione e l'integrazione dei dati è stata effettuata utilizzando il Software Breeze v2.0.

### ***3.6 Valutazione in vitro del potenziale anti-proliferativo di Ruxolitinib puro e del medium condizionato ottenuto da MSCs-Ruxo su linea cellulare SET-2.***

L'effetto di Ruxolitinib puro e del CM ottenuto da MSCs-Ruxo sulla proliferazione della linea cellulare SET-2 è stata saggiata mediante test di proliferazione, seminando la linea cellulare SET-2 in piastre da 96 pozzi con fondo piatto (COSTAR 96 well cat. 3596). In breve, diluizioni seriali 1:2 del medium contenente farmaco puro e del CM ottenuto da MSC-Ruxo sono state preparate e aggiunte ad ogni pozzo della piastra: si è partito da nessuna diluizione fino ad una diluizione di 1:128. Successivamente, sono state aggiunte  $3 \times 10^5$  cellule SET-2/pozzo in un volume finale di 100  $\mu$ l/pozzo. Dopo 7 giorni di coltura a 37 ° C, con il 5% di CO<sub>2</sub>, la proliferazione cellulare è stata valutata con saggio CCK-8 (Cell counting kit-8, SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA) seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. Al termine dell'incubazione della linea cellulare SET-2 piastrata a diverse diluizioni del CM o di Ruxolitinib puro, in ogni pozzetto sono stati aggiunti 10 $\mu$ L di CCK-8 e la piastra mantenuta per ulteriori 4 ore a 37°C. Il formazano prodotto dopo le quattro ore è stato quindi quantificato utilizzando un lettore di micropiastre Tecan i-control infinite 200Pro settato per leggere valori di assorbanza ottica ad una lunghezza d'onda di 450 nm. Ai singoli pozzi è stato poi sottratto il valore di assorbanza ottenuto sottraendo un bianco di riferimento (media di tre letture di assorbanza del solo medium senza cellule).

Alla fine della procedura si è calcolata la concentrazione inibente (IC) 10, IC50 ed IC90 e sono state create delle curve di inibizione dose-risposta. L'attività anti-proliferativa sulla linea cellulare SET-2 di CM MSCs-Ruxo è stata confrontata con quella di Ruxolitinib puro.

### ***3.7 Valutazione in vitro del potenziale inibitorio delle BM-MSCs trattate con Ruxolitinib sulla proliferazione di cellule della linea cellulare SET-2***

Per verificare la capacità sia in termini qualitativi che quantitativi delle MSCs-Ruxo rispetto alle stesse BMMSC non trattate con il farmaco di inibire *in vitro* la proliferazione delle cellule SET-2, un sistema di co-coltura è stato messo a punto. Brevemente, sono state seminate in 200 µl di terreno di crescita alpha-MEM completo  $2 \times 10^3$  cellule sia di ogni singola linea primaria BMMSC trattate con il farmaco (MSC-Ruxo; 5 linee totali) sia di BMMSC non trattate con Ruxolitinib, in duplicato, in pozzi di piastre a 96 pozzetti. Dopo 24 ore, il terreno alpha-MEM completo è stato sostituito con terreno RPMI completo in un volume finale di 100 µl, contenente diverse quantità di cellule SET-2 ( $40 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^5$  o  $2 \times 10^6$  cellule rispettivamente); in modo da avere un rapporto di cellule MSCs-Ruxo/SET-2 finale di 1:20-1:100-1:1000. Ulteriori pozzetti di controllo hanno ricevuto sole cellule SET-2 alle tre diverse concentrazioni. Le colture sono state tenute in incubazione per 7 giorni a 37° C e al 5% CO<sub>2</sub>. Alla fine del periodo di incubazione, le sole cellule SET-2 del sistema co-coltura BMMSC/SET-2, sono state trasferite in una nuova piastra e la proliferazione cellulare è stata valutata con un saggio CCK-8 come sopra.

I risultati sono stati espressi come percentuale della proliferazione osservata in colture di SET-2 prive di BMMSC e di MSCs-Ruxo (considerato come 100%).

### **3.8 *Analisi statistica***

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il Software GraphPad PRISM, versione 5. Per i confronti multipli è stata applicata l'analisi della varianza con test di Tukey. Un valore di  $p < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo. I risultati sono stati espressi come medie  $\pm$  S.E.M., se non diversamente specificato.

## 4 RISULTATI

### 4.1 *Caratterizzazione delle BMMSC primarie e della linea cellulare stabilizzata SET-2*

Cinque linee cellulari umane primarie di MSC ottenute dal midollo osseo sono state isolate in laboratorio (BMMSC 201673, BMMSC 201684, BMMSC 201764, BMMSC 201775, BMMSC 201806). Tutte le linee primarie presentano un aspetto fibroblastoide al microscopio a contrasto di fase e sono state in grado di aderire ai supporti in plastica, requisiti cruciali per definire la loro identità mesenchimale. Le foto sottostanti (Figura 4.1) rappresentano colture di ciascuna linea cellulare a P3.

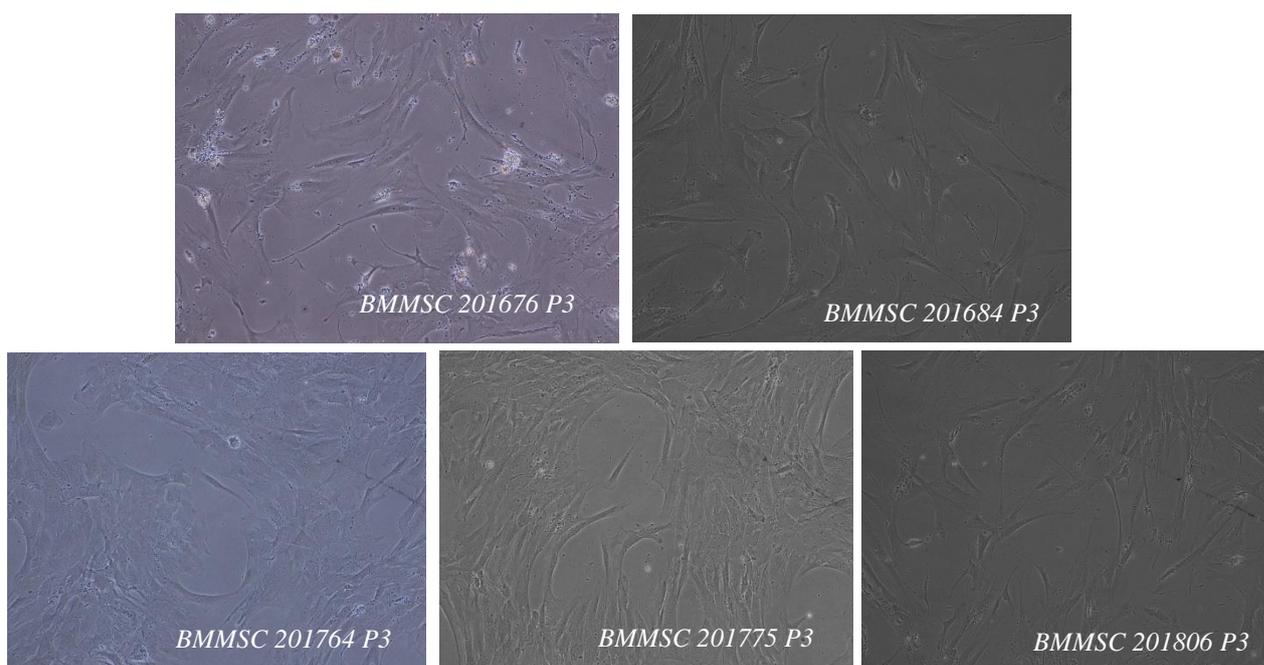


Figura 4.1 –fotografie delle linee cellulari a P3, ingrandimento 10X.

Seguendo i parametri stabiliti dalla ISCT per la definizione di una popolazione mesenchimale, l'analisi citofluorimetrica ha mostrato, per ciascuna linea, la positività per i marcatori mesenchimali CD90, CD105 e CD73 e l'assenza per il marcatore del compartimento ematopoietico CD34; inoltre, le linee cellulari sono risultate negative per l'espressione del CD45, CD14 ed HLA-DR (Figura 4.2).

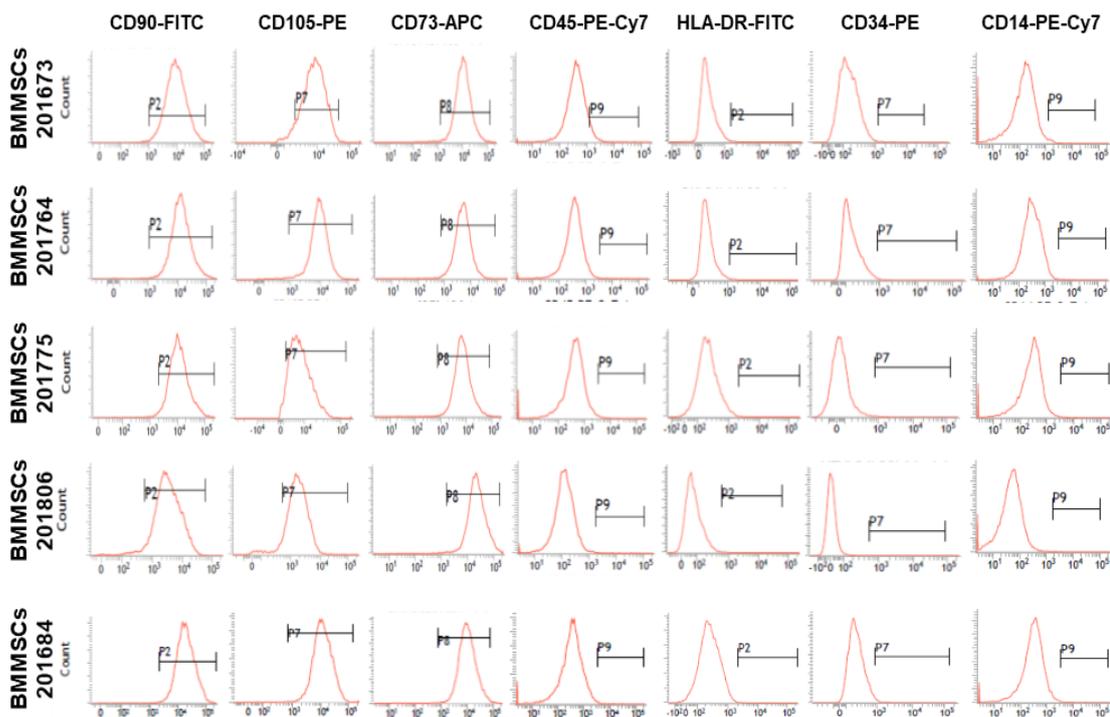


Figura 4.2: Rappresentazione grafica dell'analisi citofluorimetrica. Per ogni linea testata, gli istogrammi rappresentano rispettivamente gli antigeni d'interesse. Se il picco dell'antigene d'interesse non cade all'interno dei segmenti, le cellule vengono considerate negative per il marcatore d'interesse; per contro, se cadono all'interno del segmento, le cellule vengono considerate positive per il marcatore d'interesse.

#### 4.2 Valutazione *in vitro* dell'uptake e del rilascio di Ruxolitinib dalle BMMSC

Tramite un'analisi *in vitro*, effettuata al fine di valutare se le cinque linee primarie di BMMSC siano state in grado di internalizzare e rilasciare Ruxolitinib, sono stati misurati tramite HPLC i livelli di Ruxolitinib sono stati presenti nei surnatanti colturali ottenuti da tutte le linee primarie di BMMSC testate in P4, che al P3 avevano ricevuto il trattamento con Ruxolitinib. I risultati sono mostrati in figura 4.3 e in Tabella II.

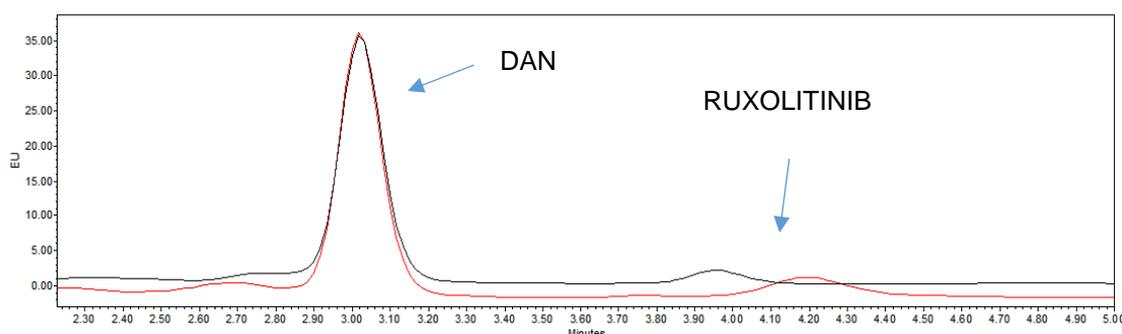


Figura 4.3: Cromatogramma del medium condizionato con Ruxolitinib a 48 ore (linea rossa) e 72 ore (linea nera) della linea cellulare BMMSC 201764

Nel dettaglio, Ruxolitinib (5 µg/mL) è stato aggiunto alle colture al P3; 30 minuti dopo la sua aggiunta, è stato recuperato parte del surnatante per l'estrazione e quantizzazione del Ruxolitinib mediante HPLC. Il farmaco è stato rilevato in tutti i surnatanti, anche se a diverse concentrazioni. Dopo 24 ore dal trattamento, prima della tripsinizzazione delle cellule al P3, è stata prelevata una ulteriore aliquota di surnatante dalle colture di BMMSC trattate e da quelle non trattate con Ruxolitinib (controllo negativo); anche su tali campioni è stata effettuata la quantizzazione mediante HPLC del farmaco. Sono stati sottoposti ad analisi HPLC anche tutti i surnatanti ottenuti dai lavaggi cellulari prima della semina in P4, in modo da escludere la presenza di Ruxolitinib residuo nel medium colturale al momento della semina. Infatti, al termine del lavaggio, non è stato ritrovato Ruxolitinib nel mezzo.

ng/mL	PRE-TRYPSINIZATION CULTURE P3				POST-TRYPSINIZATION P3/P4			POST-TRYPSINIZATION CULTURE P4								
	CTRL 0 MINUTES	POST 30 MINUTES	CTRL 24	CM 24	WASH 1	WASH 2	WASH 3	CTRL 24	CM 24	CTRL 48	CM 48	CTRL 72	CM 72	LIS CTRL	LIS 48	LIS 72
BMMSC 201673	----	4200	----	5440	5,59	----	----	----	----	----	0,003	----	0,02	----	----	0,2
BMMSC 201684	----	2282	----	2103	0,27	0,92	----	----	0,023	----	----	----	0,091	----	1,33	0,028
BMMSC 201764	----	>5000	----	>5000	26,2	2,57	----	----	0,49	----	0,08	----	0,15	----	----	----
BMMSC 201775	----	8353	----	7500	16,224	2,718	----	----	----	----	----	----	----	----	0,871	----
BMMSc 201806	----	3879	----	3445	13,965	0,99	----	----	0,017	----	0,27	----	0,005	----	----	----

Tabella II: Quantità di Ruxolitinib (ng/mL) misurata tramite HPLC sui surnatanti di coltura delle cinque linee primarie di BMMSC testate al P4.

A 24, 48 e 72 ore dalla semina a P4 delle cellule BMMSC trattate o non con Ruxolitinib, i surnatanti colturali sono stati raccolti ed analizzati in HPLC. A 24 ore, solamente in 3 delle 5 linee trattate è stata rilevata la presenza di Ruxolitinib: BMMSC 201684 (0,023 ng/mL), BMMSC 201764 (0,49 ng/mL) e BMMSC 201806 (0,017 ng/mL). A 48 ore, il Ruxolitinib è stato misurato solo in 3 delle 5 linee trattate: BMMSC 201673 (0,003 ng/mL), BMMSC 201764 (0,08 ng/mL) e BMMSC 201806 (0,27 ng/mL) e a 72 ore dai surnatanti analizzati è emerso che in 4 delle 5 linee di BMMSC trattate è stata rilevata la presenza di Ruxolitinib, nello specifico BMMSC 201673 (0,02 ng/mL), BMMSC 201684 (0,091 ng/mL), BMMSC 201764 (0,15 ng/mL) e BMMSC 201806 (0,005 ng/mL). Nei surnatanti delle stesse linee cellulari non trattate con Ruxolitinib (controlli), alle diverse tempistiche (24, 48 e 72 ore) non è stata rilevata, come atteso, la presenza di Ruxolitinib.

Dall'analisi effettuata sui lisati cellulari a P4, ottenuti lisando le cellule dopo 48 e 72 ore di coltura, è emerso che a 48 ore il Ruxolitinib è stato misurato solo in 2 delle 5 linee trattate: BMMSC 201684 (1,33 ng/mL) e BMMSC 201775 (0,871 ng/mL). A 72 ore, solamente in 2 delle 5 linee trattate è stata rilevata la presenza di Ruxolitinib: BMMSC 201673 (0,2 ng/mL), BMMSC 201684 (0,028 ng/mL).

Nei surnatanti dei lisati cellulari, delle stesse linee cellulari non trattate con Ruxolitinib (controlli), non è stata rilevata, la presenza del farmaco.

### 4.3 Valutazione in vitro del potenziale anti-proliferativo di Ruxolitinib puro e del medium condizionato ottenuto da MSCs-Ruxo su linea cellulare SET-2.

L'analisi dell'effetto sia di Ruxolitinib puro sia del CM ottenuto da MSCs-Ruxo sulla proliferazione della linea cellulare SET-2 è stata investigata tramite saggio con CCK-8. Nella tabella III sono riportati i valori di assorbanza espressi come densità ottica (O.D.) ottenuti dai singoli pozzetti. Per ogni campione alle diverse concentrazioni, sono state effettuate due letture.

Fattore Diluizione	Conc. (ng/mL)	CM		CM		CM		CM		CM		Pure Ruxolitinib SET-2 cell lines	
		BMMSCs 201673	BM-MSCs 201684	BM-MSCs 201764	BM-MSCs 201775	BM-MSCs 201806	BM-MSCs 201806						
1:1	5000	0,3593	0,4892	0,4887	0,5418	0,386	0,4346	0,2999	0,293	0,488	0,5155	0,4124	0,4634
1:2	2500	0,4408	0,4871	0,5451	0,5383	0,4218	0,4537	0,38	0,321	0,5145	0,5272	0,6204	0,5868
1:4	1250	0,4817	0,5919	0,594	0,5494	0,5425	0,5603	0,555	0,5201	0,5589	0,6057	0,6774	0,6944
1:8	625	0,5176	0,5757	0,6482	0,5332	0,615	0,5436	0,5527	0,5906	0,6382	0,6295	0,7032	0,6721
1:16	312,5	0,7095	0,7276	0,7086	0,6531	0,6923	0,6973	0,6562	0,6808	0,6663	0,6752	0,7794	0,8057
1:32	156,25	1,4797	1,384	1,2911	1,3518	1,3867	1,2832	1,2865	1,3139	1,0702	1,286	1,3146	1,4436
1:64	78,125	1,9629	1,7589	1,6317	1,7408	1,7777	1,6281	1,6785	1,5697	1,4436	1,518	1,5357	1,5437
1:128	39,0625	1,9304	2,5715	2,3018	2,5671	2,4254	2,3208	2,4316	2,5803	2,5992	2,9056	3,1432	3,2527
//////	1	3,6955	3,6955	3,6955	3,6955	3,6955	3,6955	3,6955	3,6955	3,6955	3,6955	3,6955	3,6955

Tabella III: valori di assorbanza a lunghezza d'onda di 450 nm, ottenuti da CCK-8 assay dopo 4 ore di incubazione a 37°C delle sole cellule SET-2, coltivate per 7 giorni con diluizioni seriali del medium condizionato ottenuto da ogni singola linea primaria di BMMSC o del medium con Ruxolitinib puro.

I valori ottenuti sono stati utilizzati per costruire una curva di inibizione dose-risposta, prendendo come 100% della proliferazione la media delle assorbanze (3,6955) registrata in due pozzetti ove erano state seminate lo stesso numero di cellule SET-2 senza trattamento con Ruxolitinib o medium condizionato.

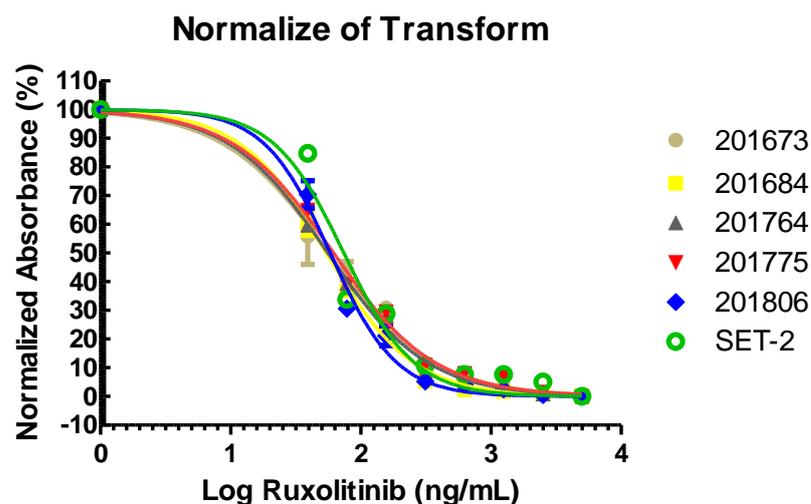


Figura 4.4. Curve di inibizione dose-risposta

log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope						
Best-fit values	Conditioned Medium BM-MSCs					Ruxolitinib pure
IC <sub>50</sub> , IC <sub>90</sub> , IC <sub>10</sub> - Inhibitor	201673	201684	201764	201775	201806	SET-2
Log IC <sub>50</sub> (ng/mL)	1,75	1,735	1,748	1,791	1,766	1,87
IC <sub>50</sub> (ng/mL)	56,28	54,34	56	61,75	58,31	74,2
IC <sub>10</sub> (ng/mL)	7,221	10,05	8,15	8,716	16,12	19,04
IC <sub>90</sub> (ng/mL)	438,7	293,9	384,8	437,4	210,9	289,1
R <sup>2</sup>	0,978	0,9922	0,9944	0,9922	0,9861	0,9583
Std. Error Log IC <sub>50</sub>	0,03994	0,02088	0,01907	0,02177	0,02231	0,03884

Tabella IV: Valori di IC<sub>10</sub>, IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub> sulla proliferazione di cellule SET-2 coltivate in medium condizionati di tutte le linee primarie di BMMSC ed in presenza di Ruxolitinib puro

In Tabella IV sono mostrati i valori di IC<sub>10</sub>, IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub>: in tutte e cinque le linee cellulari primarie di BMMSC occorrono mediamente circa 16.86 ng/mL (range 12.45-19.86 ng/mL) in meno rispetto al solo Ruxolitinib puro per ottenere un'effetto inibitorio della proliferazione del 50% della linea stabilizzata SET-2.

Per avere una inibizione del 10% sulla proliferazione delle cellule della linea SET-2, occorre 19,04 ng/mL di Ruxolitinib puro in coltura, per contro, per avere un effetto inibitorio del 10% dato dal CM, eccetto per il CM della linea BMMSC 201806 che si comporta più o meno come il medium contenente Ruxolitinib puro (16,12 vs 19,04 ng/mL), la coltura necessita mediamente di 10,5 ng/mL (range 8.99-11.819 ng/mL). Per quanto riguarda l'IC<sub>90</sub>, l'unico CM capace di inibire il

90% della proliferazione di SET-2 rispetto al medium contenente il farmaco puro è stato quello della linea BMMSC 201806 (210,9 vs 289,1 ng/mL). Per le restanti linee cellulari primarie di BMMSC, la dose inibente il 90% delle cellule stabilizzate SET-2 è maggiore rispetto al solo Ruxolitinib puro in coltura (range 293.9-438.7 ng/mL).

Successivamente, l'attività anti-proliferativa di CM MSCs-Ruxo è stata confrontata con quella di Ruxolitinib puro ed espressa come concentrazione equivalente di Ruxolitinib (REC), in accordo con il seguente algoritmo:

$$\text{REC (ng/mL)} = \text{DF}_{50\text{CM}} \times \text{IC}_{50\text{Ruxolitinib}}$$

Dove DF50CM è il fattore di diluizione (DF) in cui è stato osservato il 50% di inibizione con CM MSCs-Ruxo; IC50Ruxo è la concentrazione (ng/mL) di Ruxolitinib puro capace di produrre il 50% di inibizione).

Il risultato è stato che tutti i CM ad un fattore di diluizione pari a 96 sono capaci di produrre una inibizione del 50% della crescita della linea SET-2.

$$\text{REC} = (1/96) \times 74,2 \text{ ng/mL} = 0,773 \text{ ng/mL}$$

È stato poi calcolato il rilascio di Ruxolitinib (RR) da una singola cellula BMMSC che lo ha internalizzato ed è stato espresso come rapporto tra REC e il numero di cellule piastrate:

#### **Rilascio di Ruxolitinib da singola cellula RR**

$$\text{RR (pg/cell)} = \frac{\text{REC (ng/mL)} \times \text{CM (mL)}}{\text{n.ro cells piastrate}}$$

$$\text{RR (pg/cell)} = [0,773 \text{ (ng/mL)} \times 0,2 \text{ mL}] / 2,000 \text{ cells} = 0,0773 \text{ pg/cell}$$

#### 4.4 Valutazione *in vitro* del potenziale inibitorio delle BM-MSCs trattate con Ruxolitinib sulla proliferazione di cellule della linea cellulare SET-2

Infine, la capacità anti-proliferativa *in vitro* delle MSCs-Ruxo rispetto alle stesse BMMSC non trattate con il farmaco sulle cellule SET-2 è stata valutata in un sistema di co-cultura. Ciascuna linea cellulare primaria BMMSC trattata o non con Ruxolitinib è stata messa in co-cultura in diversi rapporti cellulari di semina con la linea stabilizzata SET-2 (rispettivamente BMMSC/SET-2 1:20-1:100-1:1000), e la capacità proliferativa testata attraverso saggio CCK-8 di proliferazione *in vitro*. Ogni campione è stato acquisito in duplicato e normalizzati rispetto al valore di O.D. ottenuto dalle sole cellule SET-2 coltivate in RPMI completo in assenza di Ruxolitinib (Ctrl; O.D. 450 nm = 3.6786) considerato come 100% di proliferazione.

	1/20 Ruxolitinib	1/20 Untreated	1/100 Ruxolitinib	1/100 Untreated	1/1.000 Ruxolitinib	1/1.000 Untreated	Ctrl
BMMSC 201673	0,5095 0,3985	1,7439 1,8251	2,9251 2,6814	3,462 3,3005	2,9649 3,0754	3,5454 3,5585	3,6786 3,6786
BMMSC 201684	0,4008 0,4141	1,4928 1,2833	2,912 2,4514	3,0712 3,2602	2,8309 3,1567	3,2456 3,2836	3,6786 3,6786
BMMSC 201764	0,6185 0,6609	1,9402 1,8861	3,225 3,1584	3,3071 3,0667	3,3313 3,2295	3,6811 3,5813	3,6786 3,6786
BMMSC 201775	0,7262 0,8151	1,5873 1,4982	3,1447 3,2581	3,465 3,1802	3,2917 3,3696	3,398 3,279	3,6786 3,6786
BMMSC 201806	0,8804 0,7462	1,7824 1,541	2,9872 3,197	3,5533 3,6026	3,3678 3,5434	3,6662 3,603	3,6786 3,6786

Tabella VI: Valori di Assorbanza a lunghezza d'onda di 450 nm, ottenuti da CCK-8 assay dopo 4 ore di incubazione a 37°C delle sole cellule SET-2, coltivate per 7 giorni a differenti rapporti BMMSC/SET-2 (1:20, 1:100 e 1:1000) sia con BMMSC trattate con ruxolitinib sia con BMMSC non trattate con il farmaco.

	1/20 Ruxolitinib	1/20 Untreated	1/100 Ruxolitinib	1/100 Untreated	1/1.000 Ruxolitinib	1/1.000 Untreated	Ctrl
BMMSC 201673	13,85013 10,83273	47,40576 49,61308	79,51523 72,89054	94,11018 89,72	80,59714 83,60094	96,37731 96,73342	100 100
BMMSC 201684	10,89525 11,2568	40,57992 34,88492	79,15911 66,63828	83,48677 88,6245	76,95451 85,81098	88,22762 89,2606	100 100
BMMSC 201764	16,81316 17,96575	52,74193 51,27129	87,66763 85,85719	89,89942 83,36444	90,55727 87,78996	100,0661 97,35321	100 100
BMMSC 201775	19,74085 22,15748	43,14879 40,72671	85,48477 88,56742	94,19173 86,4498	89,48079 91,59841	92,37043 89,13556	100 100
BMMSC 201806	23,93258 20,28452	48,45234 41,89018	81,20334 86,90649	96,59206 97,93222	91,54948 96,32294	99,66111 97,94309	100 100

Tabella VII: Valori di Assorbanza a lunghezza d'onda di 450 nm normalizzati rispetto al controllo, ottenuti da CCK-8 assay dopo 4 ore di incubazione a 37°C delle sole cellule SET-2, coltivate per 7 giorni a differenti rapporti BMMSC/SET-2 (1:20, 1:100 e 1:1000) sia con BMMSC trattate con ruxolitinib sia con BMMSC non trattate con il farmaco.

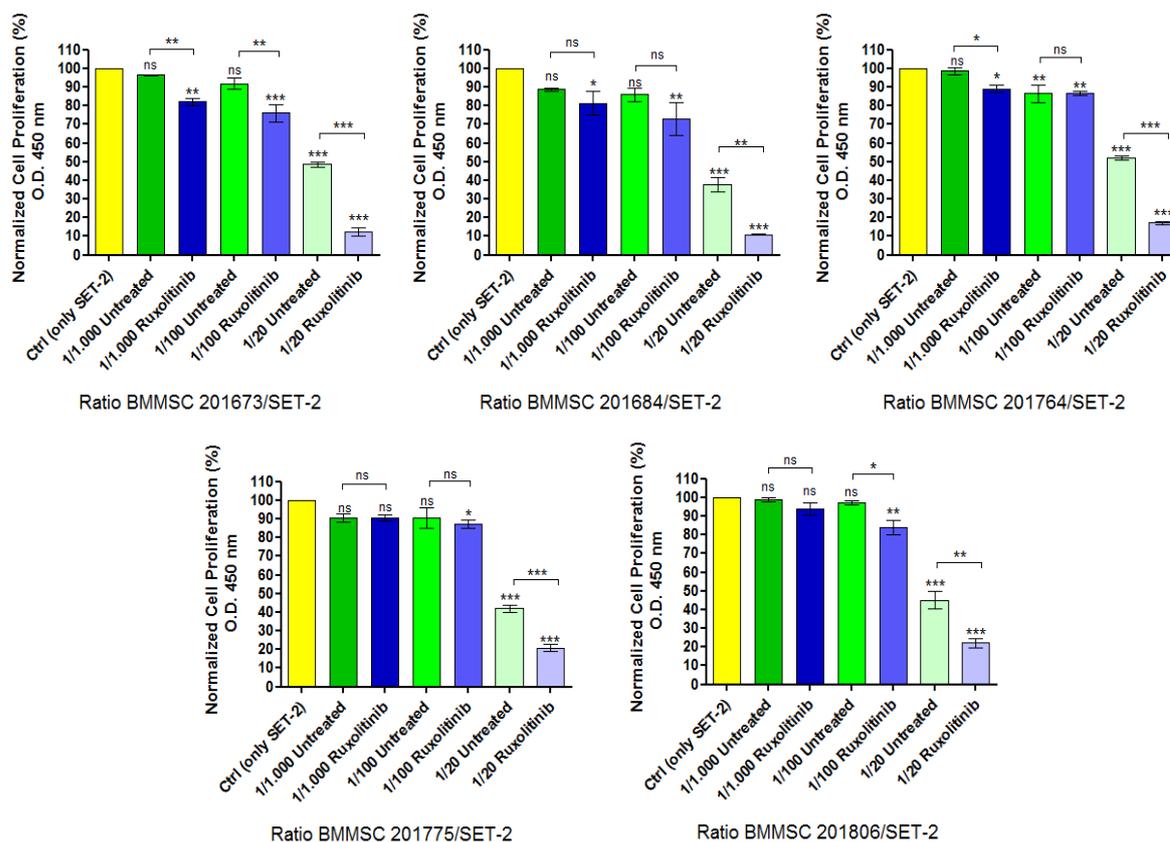
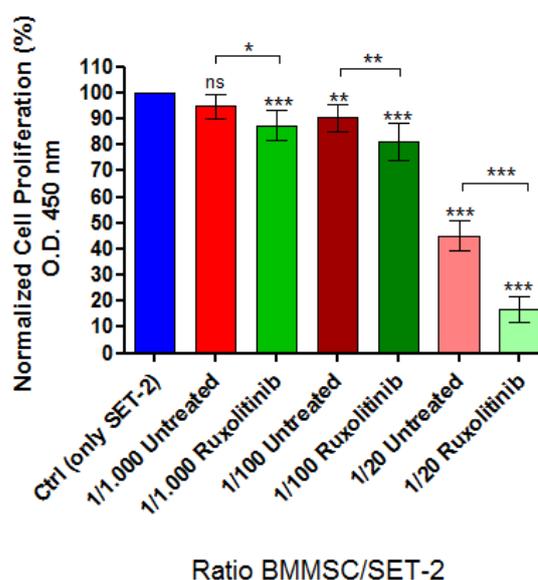


Figura 4.5: Inibizione della proliferazione di cellule SET-2 ottenuta mediante saggio di co-cultura. BMMSC trattate o non con Ruxolitinib, a differenti rapporti (1:20, 1:100, 1:1000 BMMSC/SET-2) sulla capacità dose dipendente di bloccare la proliferazione di cellule SET-2 valutata con CCK-8 assay a 7 giorni, espressa come % di O.D. misurata per cellule SET-2 coltivate in solo medium di controllo o in presenza o non di BMMSC trattate con Ruxolitinib. Gli istogrammi riportano la media  $\pm$  SEM con significatività statistica  $P < 0.05$ .

La proliferazione cellulare della linea cellulare SET-2 coltivata in presenza di BMMSC delle cinque linee cellulari primarie non trattate con Ruxolitinib, ai rapporti BMMSC/SET-2 1:100 e 1:1000, si riduceva del 5% e del 15%, rispettivamente, similmente a quanto registrato nelle colture di sole cellule SET-2 in RPMI completo (controllo) ( $p$  value non significativo). Per contro, la proliferazione cellulare della linea cellulare SET-2 coltivata in presenza di BMMSC di tutte e cinque le linee saggiate non trattate con Ruxolitinib, al rapporto BMMSC/SET-2 1:20, diminuiva più del 50%, significativamente anche rispetto al controllo.

L'attività anti-proliferativa è stata misurata anche in co-culture BMMSC-SET-2, utilizzando BMMSC trattate con Ruxolitinib. Nei rapporti 1:1000, 3 delle 5 linee (BMMSC 201673, BMMSC 201684, BMMSC 201764) riducevano l'attività proliferativa delle cellule SET-2 del 20-15%, significativamente anche rispetto al controllo; le altre due linee (BMMSC 201775 e BMMSC 201806) non influenzavano significativamente la proliferazione delle cellule SET-2 (Figura 4.5). Al rapporto BMMSC/SET-2 1:100, tutte le linee cellulari influenzavano significativamente rispetto al controllo la proliferazione delle cellule SET-2, con riduzione dal 15-25%. Al rapporto BMMSC/SET-2 1:20, si è registrata una significativa riduzione della proliferazione della linea SET-2 fra l'80-90% rispetto al controllo.

*Figura 4.6: Inibizione Cumulativa della proliferazione di cellule SET-2 ottenuta mediante saggio di co-cultura. Effetto delle BMMSC trattate o non con Ruxolitinib, a differenti rapporti di co-cultura (1:20, 1:100, 1:1000 BMMSC/SET-2) sulla capacità dose dipendente di bloccare la proliferazione di cellule SET-2, valutata con CCK-8 assay a 7 giorni. La proliferazione è stata espressa come % di O.D. misurata per cellule SET-2 coltivate in solo medium di controllo o in presenza o non di BMMSC trattate con Ruxolitinib. Gli istogrammi riportano la media $\pm$  SEM con significatività statistica  $P < 0.05$ .*



La proliferazione delle cellule SET-2 in co-coltura con BMMSC non trattate è stata comparata con i valori ottenuti dalle co-culture con MSC trattate con Ruxolitinib. Per i rapporti 1:1000 e 1:100, solo due delle linee cellulari primarie trattate (BMMSC 201673 e BMMSC 201764, e BMMSC 201806 e BMMSC 201673, rispettivamente) influenzavano significativamente la proliferazione delle cellule SET-2 rispetto alle co-culture con BMMSC non trattate. Invece, al rapporto BMMSC/SET-2 1:20, tutte le BMMSC trattate con Ruxolitinib rispetto alla BMMSC non trattate mostravano avere un effetto anti-proliferativo significativo sulla linea SET-2, con riduzioni della proliferazione di circa il 30% maggiore rispetto alle co-culture con BMMSC non trattate con Ruxolitinib.

## 5 DISCUSSIONE

Nel lavoro corrente, abbiamo indagato il ruolo delle cellule staminali mesenchimali (MSC) di pazienti affetti da Mielofibrosi Idiopatica Primaria (PMF) e Policitemia Vera (PV) JAK2+ nell'uptake e rilascio nel microambiente midollare di un farmaco inibitore di JAK1/2, il Ruxolitinib. Dai nostri dati preliminari di esperimenti *in vitro*, abbiamo osservato che utilizzando protocolli sperimentali ampiamente riconosciuti (Ragni et al., 2013a, Ragni et al., 2013b, Giordano et al., 2014), è stato possibile isolare le MSC da sangue midollare di cinque pazienti con diagnosi istologica e molecolare di PMF (n=3) o PV (n=2) con mutazione JAK2 V617F. Le MSC sono state espanse *in vitro* fino al passaggio 3. La conferma dei caratteri di mesenchimalità è avvenuta seguendo le linee guida internazionali definite dalla *ISCT* (Horwitz et al., 2005; Dominici et al., 2006). L'analisi citofluorimetrica ha, infatti, mostrato un fenotipo CD73+, CD90+, CD105+, CD34-, CD45-, CD14- e HLA-DR-, (*FIGURA 4.2*), mentre l'analisi morfologica al microscopio a contrasto di fase ha evidenziato la potenzialità di aderenza alla piastra. Una volta ottenute le linee cellulari di BMMSC, si è valutato *in vitro* la capacità di uptake e rilascio di Ruxolitinib nel medium colturale.

È già noto che le MSC sono considerate ottime candidate nell'ambito della medicina rigenerativa, contribuendo alla formazione di un microambiente adatto allo sviluppo e al mantenimento di processi di rigenerazione tissutale e riparazione cellulare. Piuttosto che da interazioni cellulari dirette o dal transdifferenziamento, il loro effetto terapeutico sembra essere mediato da un'azione paracrina, (Timmers et al., 2007; Lee et al., 2009; Zanotti et al., 2013) basata principalmente sulla secrezione di molecole bioattive (quali fattori di crescita, citochine, chemochine ed altre) in grado di indurre le cellule staminali residenti all'attivazione e al differenziamento (Li et al., 2002; Siegel et al., 2012). In aggiunta, attraverso la comunicazione paracrina, le MSC sono in grado di modulare la funzione e la plasticità della cellula bersaglio (Collino et al., 2010). Inoltre, è stato dimostrato come le MSC possano internalizzare *in vitro* farmaci chemioterapici, ed usate, *in*

*vivo*, in un modello animale, per il trattamento di modelli tumorali (Pessina et al., 1999, Pessina et al., 2011, Pessina et al., 2013, Bosco et al., 2015).

Nel nostro caso, è emerso che anche Ruxolitinib viene internalizzato dalle BMMSC e rilasciato nel mezzo di coltura a 24, 48 e 72 ore. Nonostante la concordanza dei risultati, variazioni non significative sono state osservate nelle singole linee cellulari primarie di BMMSC, verosimilmente legate allo stato clinico dei soggetti, alla severità della malattia, nonché a fattori epidemiologici quali sesso ed età. Per confermare l'ipotesi che le MSC internalizzino il Ruxolitinib, i dosaggi del farmaco sono stati effettuati anche su lisati cellulari per ogni singola linea cellulare a 48 e 72 ore ed i risultati ottenuti danno conferma dell'internalizzazione di Ruxolitinib da parte delle BMMSC.

Fisiologicamente, i processi di rimodellamento e omeostasi del microambiente midollare sono regolati da numerosi segnali intrinseci ed estrinseci comprendenti sia segnali cellulari sia regolatori umorali generati dalla nicchia emopoietica (Heissig et al., 2005; Suda et al., 2015). Le componenti cellulari del microambiente garantiscono il mantenimento dell'equilibrio dinamico tra la capacità di self-renewal e di differenziamento multilineare delle HSC. Queste ultime possono interagire con le MSC direttamente oppure indirettamente tramite citochine e/o chemochine da esse secrete (Mayani et al., 1992; Flores-Guzman et al., 2013; Morrison and Scadden. 2014). Alcuni studi indicano che il Ruxolitinib è in grado di determinare una riduzione della fibrosi nel midollo osseo (Breccia et al., 2015; Kvasnicka et al., 2013; Wilkins et al., 2013; Molica et al., 2014; Al-Ali et al., 2014), e ad una modulazione del microambiente del midollo osseo (Kvasnicka et al., 2014a, 2014b, 2014c). Sulla base dei dati noti sul meccanismo di azione del farmaco e in base ai nostri dati preliminari sulla possibile funzione di reservoir delle MSC, abbiamo indagato l'azione anti-proliferativa *in vitro* sia dei medium condizionati con Ruxolitinib sia delle MSC trattate con Ruxolitinib sulle cellule staminali emopoietiche tramite sistemi di co-coltura BMMSC primarie e linea cellulare stabilizzata (SET-2). Si è scelto di utilizzare per gli esperimenti una linea cellulare stabilizzata esprime il recettore di staminalità emopoietica CD34 e portante la mutazione JAK2 V617F, che potesse simulare la popolazione di HSC

nei pazienti con MFI o PV, dal momento che non è stato possibile isolare un numero sufficiente di cellule staminali emopoietiche dal sangue midollare dei pazienti affetti da tali patologie (vista la scarsità di materiale biologico ottenuto). Dalle analisi effettuate sui medium condizionati con Ruxolitinib, l'effetto inibitorio sul 10% e sul 50% delle cellule SET-2 seminate era maggiore nelle colture trattate con medium condizionato rispetto alle colture trattate Ruxolitinib puro; invece, l'effetto inibitorio sulla proliferazione del 90% delle cellule SET-2 era maggiore nelle colture trattate con Ruxolitinib puro rispetto a quelle trattate con medium condizionato. Questi dati suggeriscono che il Ruxolitinib rilasciato dalle MSC possa in qualche modo agire sinergicamente insieme ad altre molecole di segnale presenti nel medium su pathway di segnale delle cellule SET-2. Infatti, è noto che le MSC possiedono un effetto inibitorio sulle popolazioni cellulari del sistema immunitario mature attraverso la secrezione attiva di citochine immunomodulanti (Di Nicola et al., 2002; Barthlomew et al., 2002; Le Blanc et al., 2003). Inoltre, è anche possibile che le MSC rilascino il farmaco nel medium sia come sostanza pura carrier-free sia contenuto in vescicole extracellulari.

Diversi studi, infatti, hanno suggerito che le BMMSC umane secernono una grande quantità di microvescicole extracellulari (Muralidharan-Chari et al. 2010; Lai et al., 2011) e queste sono responsabili dello shuttling di specifici subset di microRNA (Bruno et al., 2009) che, influenzando l'espressione genica, modulano l'attivazione di pathway molecolari.

Per confermare l'azione anti-proliferativa sulle cellule SET-2 delle MSC trattate con Ruxolitinib, si è allestito un sistema *in vitro* di co-coltura BMMSC/SET-2 a vari rapporti (1:20, 1:100 e 1:1000). Dagli esperimenti del nostro studio è emerso che l'effetto anti-proliferativo era maggiore nelle co-culture con BMMSC trattate con Ruxolitinib, probabilmente per azione sinergica di citochine rilasciate delle BMMSC e del farmaco internalizzato dalle stesse e rilasciato per via paracrina. Le linee di BMMSC trattate con Ruxolitinib, rispetto alle non trattate, infatti, riuscivano ad inibire la proliferazione delle cellule della linea SET-2 in misura maggiore e l'effetto si amplificava allor quando i rapporti aumentavano, ossia meglio nei rapporti 1:20 rispetto a quelli 1:100 e 1:1000. È stato anche valutato se

---

rispetto ad un controllo di sole cellule SET-2 seminate in medium completo fresco, le BMMSC di tutte le linee primarie isolate trattate o non con Ruxolitinib e co-coltivate con cellule SET-2 ai tre rapporti avevano un effetto diverso sulla loro proliferazione. Il risultato è stato che nei rapporti 1:100 e 1:1000 delle BMMSC non trattate con Ruxolitinib non inibivano significativamente la proliferazione delle cellule SET-2, cosa che accadeva al rapporto 1:20, per contro a tutti e tre i rapporti BMMSC trattate con Ruxolitinib e coltivate con cellule SET-2 c'era una significativa riduzione, rispetto al controllo, della proliferazione delle cellule SET-2.

## 6 CONCLUSIONI

I dati ottenuti non sono sufficientemente robusti da permettere affermare che le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo siano implicate attivamente, in vivo, nella gestione delle NMP trattate con Ruxolitinib; pertanto ulteriori studi futuri dovranno corredarsi di dati quantitativi e qualitativi a supporto di tale teoria. L'eventuale conferma di tale ipotesi permetterebbe, infatti, di aprire un nuovo campo di studi nell'ambito del trattamento della mielofibrosi, identificando nuove possibilità interventistiche e terapeutiche basate su una più approfondita conoscenza del ruolo svolto dagli elementi cellulari componenti la nicchia emopoietica coinvolti. Per quanto da noi osservato, le cellule staminali/stromali mesenchimali, aprono le frontiere anche al loro impiego terapeutico in campi che non siano strettamente legati alla rigenerazione tissutale.

Un nuovo tassello, quindi, si potrebbe aggiungere all'intricato puzzle dei meccanismi che vanno a regolare il progredire della patologia mielofibrotica; e nel caso ci fossero delle evidenze robuste e significative, non sarebbero in contraddizione con quanto fin qui osservato ma, al contrario, integrerebbero e arricchirebbero le precedenti conoscenze, fornendo inoltre stimolanti spunti di riflessione per ulteriori approfondimenti.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- Aggarwal S. and Pittenger M.F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 105(4):1815-22.
- Al-Ali H.K. et al. (2014). Complete clinical, histopathologic and molecular remission of primary myelofibrosis with long-term treatment with the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib. *Blood*. 124: abstract 1836.
- Alison M. (1998). Liver stem cells: a two compartment system. *Curr Opin Cell Biol*. 10(6):710-715.
- Asahara T. et al. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 275:964-967.
- Barbui T. et al. (2015). White blood cell counts and thrombosis in polycythemia vera: a subanalysis of the CYTO-PV study. *Blood*. 126:560-1.
- Barosi G. (2003). Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 17(5):1211-1226.
- Barosi G. et al. (2001). Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 98(12):3249-3255.
- Bartholomew A. et al. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 30(1):42-48.
- Baxter E.J. et al. (2005). Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 365(9464):1054-1061.
- Boiani M. and Scholer H.R. (2005). Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biology*. 6:872-884.
- Bosco D.B. et al. (2015). Human mesenchymal stem cells are resistant to Paclitaxel by adopting a non-proliferative fibroblastic state. *PLoS One*. 10:e0128511.
- Breccia M. et al. (2015). Improvement of bone marrow fibrosis with ruxolitinib: Will this finding change our perception of the drug? *Expert Rev Hematol*. 4:387-389.
- Bruno S. et al. (2009). Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol*. 20:1053-1067.
- Caplan A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 9(5):641-50.
- Caplan A.I. (1994). The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 21(3):429-435.
- Caplan A.I. (2004). Mesenchymal stem cells. *Handbook of Stem Cells*. Elsevier Academic Press, R. Lanza et al Editors Volume 2:299-308.
- Caplan A.I. and Dennis J.E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem*. 98:1076–1084.

- Cervantes F. et al. (2008). Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia*. 22(5):905-914.
- Charlier B. et al. (2018). Development and validation of a reverse-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (RP-HPLC-FL) method to quantify ruxolitinib in plasma samples. *Analytical letters*. (accepted, in press)
- Collino F. et al. (2010). Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PloS one*. 5(7):e11803.
- Cornelius J.G. et al. (1997). In vitro generation of islets in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas. *Horm Metab Res* 29: 271-277.
- Crisan M. et al. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 3(3):301-13.
- Crisan M. et al. (2009). Perivascular multipotent progenitor cells in human organs. *Acad Sci*. 1176:118-23.
- Cross N.C. et al. (2008). BCR-ABL1-positive CML and BCR-ABL1-negative chronic myeloproliferative disorders: some common and contrasting features. *Leukemia*. 22(11):1975-1989.
- Cross N.C. and A. Reiter (2002). Tyrosine kinase fusion genes in chronic myeloproliferative diseases. *Leukemia*. 16(7):1207-1212.
- Dameshek W. (1951). Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 6(4):372-375.
- Daniels J.T. et al. (2001). Corneal stem cells in review. *Wound Repair Regen*. 9: 483-494.
- Delhommeau F. et al. (2006). Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell Mol Life Sci*. 63(24):2939-2953.
- Devine S.M. et al. (2003). Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*. 101:2999-3001.
- Dexter T.M. et al. (1984). The regulation of hemopoietic cell development by the stromal cell environment and diffusible regulatory molecules. *Prog Clin Biol Res*. 148:13-33.
- Di Nicola M. et al. (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 99:3838–3843.
- Dominici M. et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8(4):315-317.

- Du Z. et al. (2013). Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces liver injury and enhances regeneration in reduced-size rat liver transplantation. *J. Surg. Res.* 183(2):907-915.
- Dupriez B. et al. (1996). Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood* 88(3):1013-1018.
- Eckfeldt C.E. et al. (2005). The molecular repertoire of the “almighty” stem cell. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 6:726-737.
- Flores-Guzman P. et al. (2013). Concise review: ex vivo expansion of cord blood-derived hematopoietic stem and progenitor cells: basic principles, experimental approaches, and impact in regenerative medicine. *Stem Cells Transl Med.* 2:830e838.
- Friedenstein A. J. et al., (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 6(2):230-247.
- Friedenstein A. J. et al., (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3(4):393-403.
- Friedenstein A.J. (1980). Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Hematol Blood Transfus.* 25:19-29.
- Gartner S. and Kaplan H.S. (1980). Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:4756-4759.
- Gatti R.A. et al. (1968). Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet.* 2:1366-1369.
- Ghazizadeh S. and Taichman L.B. (2001). Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J.* 20:1215-1222.
- Gilbert H.S. et al. (1989). Increased circulating CSF-1 (M-CSF) in myeloproliferative disease: association with myeloid metaplasia and peripheral bone marrow extension. *Blood.* 74(4):1231-1234.
- Giordano R. et al. (2014). Autologous mesenchymal stem cell therapy for progressive supranuclear palsy: translation into a phase I controlled, randomized clinical study. *J Transl Med.* 12:14. doi: 10.1186/1479-5876-12-14.
- Graham C.F. et al. (1977). Teratocarcinoma cells and normal mouse embryogenesis. In “Concepts in Mammalian Embryogenesis”, pp. 315-394. Ed. N. Sherman. MIT press.
- Harrison C. et al. (2012). JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med.* 366(9):787-798.
- Heissig B. et al. (2005). A role for niches in hematopoietic cell development. *Hematology.* 10:247-253.

- Horwitz E.M. et al. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 7(5): 393-5.
- Jaenisch R. and Young R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 132:567-582.
- James C. et al. (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 434(7037):1144-1148.
- Johansson C.B. et al. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 96:25-34.
- Johnstone B. et al. (1998). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell Res*. 238:265-272.
- Jones D.L. and Wagers A.G. (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9(1):11-21.
- Jorgensen C. et al. (2004). Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells. *Current Opinion in Biotechnology*. 15:406-410.
- Justesen J. et al. (2002). Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calc. Tissue Int*. 71:36-44.
- Kalyani A.J. et al. (1998). Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture. *J. Neurosci*. 1:7856-7868.
- Kassem M. et al. (2004). Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 95:209-214.
- Kassis I. et al. (2006). Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant*. 37:967-976.
- Katsuda T. et al. (2013). The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics*. 10-11:1637-1653.
- Keating A. (2006). Mesenchymal stromal cells. *Curr. Opin. Hematol*. 13:419.
- Komura E. et al. (2005). Role for the nuclear factor kappaB pathway in transforming growth factor-beta1 production in idiopathic myelofibrosis: possible relationship with FK506 binding protein 51 overexpression. *Cancer Res*. 65(8):3281-3289.
- Kralovics R. et al. (2005). A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 352(17):1779-1790.
- Kvasnicka H.M. et al. (2013). Long-term intervention effects on bone marrow morphology in myelofibrosis: Patients treated with ruxolitinib and best available therapy. *Haematologica*. 98:abstract 591.
- Kvasnicka H.M. et al. (2014a). Changes in activated bone marrow macrophages and mast cells in patients with myelofibrosis following ruxolitinib therapy. *Blood*. 124:abstract 3184.

- Kvasnicka H.M. et al. (2014b). Ruxolitinib-induced modulation of bone marrow microenvironment in patients with myelofibrosis is associated with inflammatory cytokine levels. *Blood*. 124:abstract 3182.
- Kvasnicka H.M. et al. (2014c). Ruxolitinib therapy effectively modulates CD34+ hematopoietic progenitors and bone marrow angiogenesis in patients with myelofibrosis. *Blood*. 124:abstract 4578.
- Lai R.C. et al. (2011). Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen Med*. 6:481-492.
- Lavoie J. R. et al. (2013). Uncovering the secreted of mesenchymal stem cells. *Biochimie* Volume 95, Issue 12: 2212–2221
- Le Blanc K. Et al. (2003). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 31(10):890-6.
- Le Blanc K. et al. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 371(9624):1579-86.
- Le Bousse-Kerdiles M.C. et al. (1996). Differential expression of transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and their receptors in CD34+ hematopoietic progenitor cells from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Blood*. 88(12):4534-4546.
- Lee R.H. et al. (2009). Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell*. 5:54-63.
- Levine R.L. and Gilliland D.G. (2007). JAK-2 mutations and their relevance to myeloproliferative disease. *Curr Opin Hematol*. 14(1):43-47.
- Levine R.L. et al. (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 7(4):387-397.
- Li Y. et al., (2002). Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology*. 59:514–523.
- Lipscomb G. H. (2001). Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *New Engl. J Med*. Vol. 344, No. 5.
- Marchioli R. et al. (2005). Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol*. 23:2224-32.
- Marchioli R. et al. (2013). Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 368(1):22-33.
- Martyre M.C. et al. (1997). Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol*. 97(2):441-448.
- Martyre M.C. et al. (1994). Transforming growth factor-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol*. 88(1):9-16.

- Maumus M. et al. (2013). Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: role of secretome and exosomes. *Biochimie*. 95(12):2229-2234.
- Mayani H. et al. (1992). Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol*. 49:225e233.
- Mesa R.A. et al. (2009). Trisomy 13: prevalence and clinicopathologic correlates of another potentially lenalidomide-sensitive cytogenetic abnormality. *Blood*. 113(5):1200-1201.
- Mesa R.A. et al. (2007). Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). *Leuk Res*. 31(6):737-740.
- Miura M. et al. (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad Sci*. 100:5807-5812.
- Molica M. et al. (2014). Disappearance of fibrosis in secondary myelofibrosis after ruxolitinib treatment: New endpoint to achieve? *Ann Hematol*. 93:1951-1952.
- Moore K.A. and Lemischka I.R. (2006). Stem cells and their niches. *Science*. 311(5769):1880-1885.
- Morrison S.J. and Scadden D.T. (2014) The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 505(7483):327-34.
- Mueller S.M. and Glowacki J. (2001). Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem*. 82(4):583-90.
- Muralidharan-Chari V. et al. (2010). Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci*. 123:1603-1611.
- Nishida S. et al. (1999). Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Metab*. 17(3): 171-177.
- Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. (2007). Generation of germLine-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 448:313-317.
- Pessina A. et al. (2011). Mesenchymal Stromal Cells primed with Paclitaxel provide a new Approach for cancer therapy. *PLoSOne*. 6(12):e28321.
- Pessina A. et al. (2013). Mesenchymal stromal cells primed with Paclitaxel attract and kill leukaemia cells, inhibit angiogenesis and improve survival of leukaemia-bearing mice. *Br J Haematol*. 160:766-78.
- Pessina A. et al. (1999). Role of SR-4987 stromal cells in the modulation of doxorubicin toxicity to in vitro granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM). *Life Sci*. 65:513-23.
- Pillow R.P. et al. (1966). Treatment of bone-marrow failure by isogeneic marrow infusion. *N Engl J Med*. 275:94-97.

- Pittenger M.F. et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284:143-147.
- Prchal J.F. and Axelrad A.A. (1974) Bone marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 290:1382.
- Prockop D.J. et al. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 276:71–74.
- Prockop D.J. (2013). Concise review - two negative feedback loops place mesenchymal stem-stromal cells at the center of early regulators of inflammation. *Stem Cells*. 31(10):2042-2046.
- Ragni E. et al. (2013a). Differential microRNA signature of human mesenchymal stem cells from different sources reveals an “environmental-niche memory” for bone marrow stem cells. *Exp Cell Res*. 319(10):1562-1574.
- Ragni E. et al. (2013b). What is beyond a qRT-PCR study on mesenchymal stem cell differentiation properties: how to choose the most reliable housekeeping genes. *J Cell Mol Med*. 17(1):168-180.
- Reilly J.T. (2002). Cytogenetic and molecular genetic aspects of idiopathic myelofibrosis. *Acta Haematol*. 108(3):113-119.
- Rosada C. et al. (2003). The human umbilical cord blood: a potential source of osteoblast progenitor cells. *Calcified Tissue International*. 72:135-142.
- Ruggeri M. et al. (2003). The rate of progression to polycythemia vera or essential thrombocythemia in patients with erythrocytosis or thrombocytosis. *Ann Intern Med*. 139:470-475.
- Scaffidi P. and Mistelli T. (2008). Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat Cell Biol*. 10(4):452-459.
- Schofield R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 4(1-2):7-25.
- Schultz E. (1996). Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev. Biol*. 175:84-94.
- Shamblott M.J. et al. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:13726-1373.
- Schipani E. and Kronenberg H.M. (2010). Adult mesenchymal stem cells. In: *StemBook* [Internet].
- Siegel G. et al. (2012). Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells express cardiomyogenic proteins but do not exhibit functional cardiomyogenic differentiation potential. *Stem Cells Dev*. 21:2457-2470.
- Siena S. et al. (1989). Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose Cyclophosphamide treated patients: enhanced by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Blood*. 74:1905-1914.
- Slack J.M. (2000). Stem cells in epithelial tissues. *Science*. 287:1431-1433.
- Spivak J.L. et al. (2003). Chronic myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:200-224.

- Spradling A. et al. (2001). Stem cells find their niche. *Nature*. 414(6859):98-104.
- Stenderup K. et al. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 33(6): 919-26.
- Suda T. et al. (2005). Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends Immunol.* 26:426-433.
- Takahashi K. and Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126(4):663-76.
- Takahashi K. et al. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131(5):861-872.
- Taskin A.L. et al. (1998). Myelofibrosis: experimental models and human studies. *Stem Cells*. 16 Suppl 2:155-164.
- Tefferi A. (2003). The forgotten myeloproliferative disorder: myeloid metaplasia. *Oncologist* 8(3):225-231.
- Tefferi A. (2006). New insights into the pathogenesis and drug treatment of myelofibrosis. *Curr Opin Hematol.* 13(2):87-92.
- Tefferi A. (2010). Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia*. 24(6):1128-1138.
- Tefferi A. et al. (2013) Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia*. 27: 1874-81.
- Thomson A. et al. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282:1145-1147.
- Till J.E. and McCulloch E.A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 14:213-22.
- Timmers L. et al. (2007). Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res*. 1:129-37.
- Van Koppen A. et al. (2012). Human embryonic mesenchymal stem cell-derived conditioned medium rescues kidney function in rats with established chronic kidney disease. *PLoS One*. 7(6):e38746.
- Vannucchi A.M. et al. (2005). A pathobiologic pathway linking thrombopoietin, GATA-1, and TGF-beta1 in the development of myelofibrosis. *Blood* 105(9):3493-3501.
- Vannucchi A.M. et al. (2009). Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms. *CA Cancer J Clin*. 59(3):171-191.
- Van Poll D. (2008). Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology*. 47: 1634-1643.
- Vardiman J.W. et al. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 100(7):2292-2302.

- Verstovsek S. et al. (2012). A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med.* 366(9):799-807.
- Villevall J.L. et al. (1997). High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. *Blood.* 90(11):4369-4383.
- Waszak P. et al. (2012). Preconditioning enhances the paracrine effect of mesenchymal stem cells in preventing oxygen-induced neonatal lung injury in rats. *Stem Cells Dev.* 21:2789–2797.
- Watt F.M., Hogan B.L. (2000). Out of Eden: Stem cells and their niches. *Science.* 287:1427-1430.
- Weissman I.L. 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 100(1):157-168.
- Wilkins B.S. et al. (2013). Resolution of bone marrow fibrosis in a patient receiving JAK1/JAK2 inhibitor treatment with ruxolitinib. *Haematologica.* 98:1872-1876.
- Yu J. et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 318(5858):1917-20.
- Zanotti L. et al. (2013). Encapsulated mesenchymal stem cells for in vivo immunomodulation. *Leukemia.* 27:500-3.
- Zimmermann S. et al. (2003). Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia.* 17:1146-1149.
- Friedenstein A. J. et al., (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 6(2):230-247.
- Friedenstein A. J. et al., (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3(4):393-403.
- Friedenstein A.J. (1980). Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Hematol Blood Transfus.* 25:19-29.