



O. Ferroni, R. Tassinari,
C. Cavallini, V. Taglioli,
E. Olivi, C. Ventura

RIASSUNTO

Le malattie epatiche croniche sono un problema di salute globale che causano una mortalità stimata in 2 milioni di pazienti all'anno. In questo contesto si sono compiuti numerosi sforzi volti ad identificare nuovi trattamenti capaci di ripristinare, ma soprattutto di preservare, la funzionalità epatica nel corso della vita. Epatoguna è un integratore alimentare ricco in colina ed estratto di tè verde, principalmente composto da fegato liofilizzato di suino Neorland®. È ampiamente noto come il fegato contenga un largo quantitativo di micro- e nano-vesicole, in particolare esosomi, che si originano da tutti i diversi tipi cellulari contenuti nell'organo. In questo lavoro vengono presentati i dati preliminari riferiti all'isolamento e all'azione biologica su cellule staminali umane di esosomi derivati da fegato suino liofilizzato. Gli esosomi sono stati isolati per affinità anticorpale e quantificati tramite ELISA. Successivamente, le cellule staminali umane sono state trattate con gli esosomi isolati. La colorazione con BODIPY ha evidenziato come essi siano facilmente internalizzati da cellule umane e come, inoltre, le cellule trattate subiscano un arresto della crescita cellulare già dopo 24 ore dalla somministrazione. Questi dati preliminari aprono la strada a nuovi esperimenti che mirano alla comprensione di come esosomi derivati da fegato suino possano preservare la funzionalità del fegato nell'uomo.

PAROLE CHIAVE EPATOGUNA, ESOSOMI DERIVATI DA FEGATO SUINO LIOFILIZZATO, CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI UMANE, UPTAKE

SUMMARY: Chronic Liver Diseases are a global health problem, accounting for 2million deaths per year. In this context, many efforts have been made to identify new treatments able to restore, but in particular to preserve, liver function in the lifetime. Epatoguna is a food supplement, rich in choline and green tea extract, mainly composed of swine-lyophilized liver Neorland®.

It's well known that liver contains a great amount of micro- and nano-vesicles, exosomes in particular, arising from all the cell types contained in the organ. In this paper, we present our preliminary results regarding exosome isolation from lyophilized liver and their biological action on human stem cells. Exosomes from Neorland® lyophilized liver were immunoseparated and quantified with ELISA. After that, human mesenchymal stem cells were treated with isolated exosomes. Human stem cells were able to internalize swine exosomes, as highlighted by BODIPY staining, and moreover exosome-treated cells displayed a cell cycle arrest, not later than 24 hours after exosome administration.

These preliminary data pave the way for new experiments, aimed at a comprehensive understanding of the role played by swine-lyophilized liver-derived exosomes in preserving a healthy liver in humans.

KEY WORDS: EPATOGUNA, SWINE LIVER-DERIVED LYOPHILIZED LIVER-DERIVED EXOSOMES, HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS, UPTAKE

EPATOGUNA – IL LIOFILIZZATO DI FEGATO DI SUINO NEORLAND® È FONTE DI ESOSOMI BEN CONSERVATI E BIOLOGICAMENTE ATTIVI SU CELLULE STAMINALI UMANE

EPATOGUNA

– SWINE-LYOPHILIZED LIVER NEORLAND® IS THE SOURCE OF WELL-PRESERVED EXOSOMES, BIOLOGICALLY ACTIVE ON HUMAN STEM CELLS

INTRODUZIONE

Le malattie epatiche croniche (*Chronic Liver Diseases, CLDs*) rappresentano un problema di salute a livello mondiale.

– Nonostante i notevoli progressi nella conoscenza e gestione delle malattie epatiche, tuttora milioni di persone soffrono di patologie croniche legate a questo organo vitale.

Attualmente si stima (e probabilmente si sottostima) che **844 milioni** di persone siano portatrici di CLDs, con una mortalità di 2 milioni di pazienti all'anno (1).

– Tali patologie costituiscono un problema clinico a livello mondiale, parago-

nabile a quello di altre malattie croniche quali il Diabete (422 milioni di persone malate; 1,6 milioni di decessi annui), le malattie polmonari (650 milioni di malati; 6,17 milioni di decessi annui) e le malattie cardiovascolari (540 milioni di malati; 17,7 milioni di decessi annui) (2).

– Il fegato è il riflesso dello stato di salute di un individuo; la progressione dello stato patologico verso la cronicizzazione è determinata dalla combinazione di diversi fattori [infezioni (HBV e HCV), abuso di alcolici, fattori genetici, ecc.]. Le CLDs non sono spesso riconosciute precocemente poiché inizialmente i sintomi sono scarsi e generici;

anche le alterazioni rilevabili dagli esami biochimici sono limitate (2).

È di fondamentale importanza, quindi, implementare i programmi di prevenzione, anche individuando strategie terapeutiche che possano scongiurare la progressione delle patologie a carico del fegato.

– **Epatoguna** è un integratore alimentare a base di **fegato liofilizzato di suino, Colina e Tè verde**.

Il fegato liofilizzato di suino Neorland® è ottenuto attraverso un processo di liofilizzazione controllato, appositamente ideato per aumentare la biodisponibilità e prevenire l'eventuale denaturazione dei principi attivi ottenuti dal fegato fresco intatto di giovani suini.

– Attraverso questo procedimento particolare, si rendono biodisponibili i nutrienti specifici naturali, quali il **pool vitaminico** completo (soprattutto le vitamine del gruppo B), i **minerali** (es. il Ferro) e gli **aminoacidi essenziali** utili per sostenere e regolare i processi metabolici epatici.

Inoltre è stato ipotizzato che il fegato abbia un importante contenuto in micro/nanovesicole, in particolare di **esosomi**, che si originano da tutte le componenti del fegato dell'animale, tra cui le cellule staminali particolarmente numerose nei suinetti.

• Tra tutti i componenti di Epatoguna, abbiamo deciso di studiare il contenuto in microvescicole, in particolare in esosomi, e la loro azione in modelli *in vitro*.

– Le cellule che compongono un organismo non sono entità a sé stanti, ma devono essere in grado sia di *percepire* e *relazionarsi* con l'ambiente circostante sia di passare "informazioni" all'esterno. I meccanismi con i quali le cellule scambiano informazioni sono molteplici e possono variare tra tipi cellulari diversi, ma la secrezione di molecole segnalatorie, che vanno a comporre il cosiddetto "secretoma" cellulare, è in comune tra tutte le cellule.

Esso è composto da molecole "nude" (citochine, chemochine, fattori di crescita, ecc.) ma anche da differenti tipi di ve-

scicole extracellulari (*extracellular vesicles* - EVs), come microvescicole, microparticelle, nanovesicole ed esosomi.

All'interno delle cellule eucariotiche sono presenti dei compartimenti circondati da membrana, chiamati endosomi, che hanno varie funzioni.

In particolare, una sottoclasse di essi, chiamati *Multivesicular Bodies* (MVBs), contiene – a propria volta – vescicole provviste di membrana, che possono subire vari destini, tra i quali quello di essere rilasciate nello spazio extracellulare, prendendo il nome di **esosomi**.

Gli esosomi sono una particolare popolazione di vescicole extracellulari, con un diametro compreso tra 30 nm e 150 nm, con caratteristiche specifiche (3) e che presentano sulla membrana proteine endosomali specifiche, come CD9, CD63, CD81 ed altre, assenti sugli altri tipi di vescicole secrete, che, al contrario, originano dall'evaginazione dalla membrana plasmatica (4).

Nonostante sugli esosomi si siano concentrati moltissimi studi, il meccanismo esatto con cui vengono secreti e la regolazione di questo fenomeno non sono stati ancora del tutto definiti (5).

Gli esosomi sono stati isolati *in vivo* da diversi fluidi biologici, ad esempio dal sangue, e *in vitro* da diversi tipi cellulari coltivati.

Gli esosomi mediano l'interazione tra le cellule attraverso gli acidi nucleici (RNA codificanti e non codificanti) e le proteine in essi contenuti, che possono essere trasferite alle cellule vicine grazie a processi di endocitosi mediati dagli antigeni di membrana (6-9).

Anche il meccanismo con cui essi vengono internalizzati dalle cellule riceventi deve essere ancora delucidato. Infatti le vescicole extracellulari possono essere incorporate con diversi meccanismi, compresi fagocitosi, endocitosi, pinocitosi e fusione sulla membrana plasmatica.

Come detto, gli esosomi sono specificamente secreti dalle cellule per mediare la comunicazione intercellulare, poichè in grado di trasferire alle cellule riceventi diversi tipi di molecole, tra cui proteine e diversi tipi di RNA codificanti e non codificanti.

– Questa capacità fa sì che essi svolgano un ruolo fondamentale nella **regolazione di processi** sia **fisiologici** sia **patologici**, modificando i *network* regolatori della cellula (10).

Gli esosomi sono secreti da diversi tipi cellulari e da diversi tessuti; contengono una parte di molecole sempre uguali, essenziali per la struttura e lo smistamento delle vescicole, mentre si differenziano per una parte di proteine e di RNA cellula-specifici, che probabilmente riflettono sia la propria funzione biologica sia quella della cellula d'origine (11).

La funzione della maggior parte delle proteine contenute negli esosomi è poco nota; tuttavia molti studi evidenziano come esse siano chiaramente differenti da quelle contenute in tutte le altre microvescicole secrete dalle cellule (12).

Gli acidi nucleici (mRNA e miRNA) non sono attivi nell'esosoma, ma lo diventano quando internalizzati dalla cellula ricevente. Lo studio dei miRNA esosomali ha messo in luce come essi siano altamente **specifici** in base alla **cellula di provenienza**, evidenziando grandi differenze – ad esempio – tra tipi diversi di cellule tumorali (13,14).

– Questa grande variabilità di contenuto suggerisce un processo selettivo per l'internalizzazione dei miRNA, mediato dalla cellula che genera l'esosoma.

Numerosi studi hanno indagato i meccanismi con cui gli esosomi, all'interno della stessa specie, entrano nelle cellule riceventi, come rilasciano il proprio contenuto (carga) e come mediano processi fisiologici e patologici.

È invece molto poco studiata la capacità di comunicazione che essi possono pro-

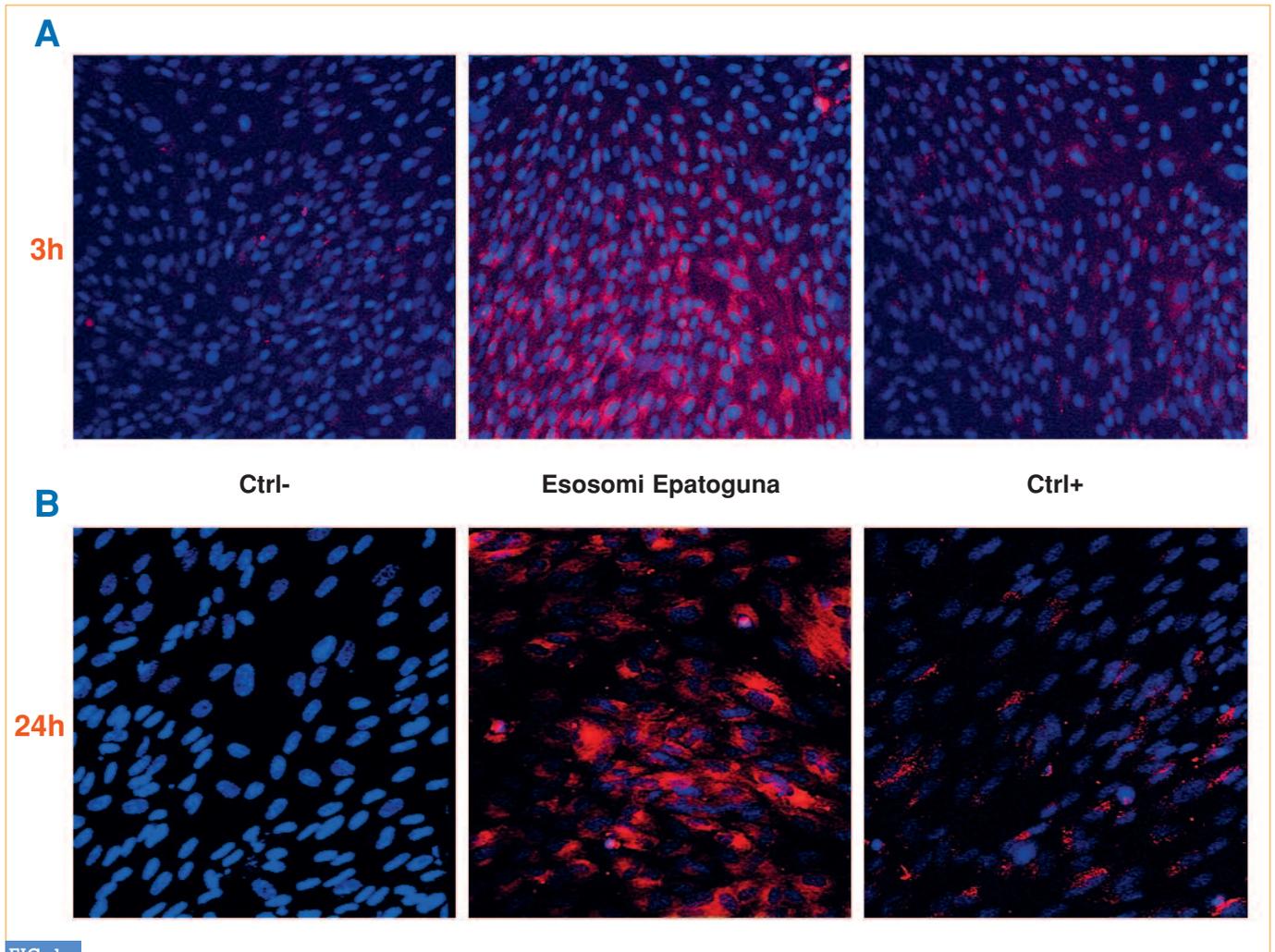


FIG. 1

Studio *in vivo* dell'*uptake* degli esosomi.

– Microfotografie di cellule mesenchimali umane isolate da membrane fetali ottenute da parti a termini (hFM-MSCs), eseguite dopo 3h (A) e 24h (B) dai seguenti trattamenti: **Ctrl-** = cellule senza alcun trattamento; **Esosomi Epatoguna** = cellule messe a contatto con esosomi colorati con BODIPY; **Ctrl+** = controllo positivo costituito da cellule messe a contatto con il solo colorante BODIPY.

Le immagini sono state acquisite con microscopio Nikon Ti-E ed analizzate con software Nis (Nikon).

muovere tra cellule di specie differenti (15), nonostante sia noto, ad esempio, che le proteine contenute negli esosomi di topo e di uomo siano conservate (omologhe) per circa l'**80%** tra le due specie (16).

– Gli esosomi di topo sono in grado di essere trasferiti in mastociti umani e l'RNA contenuto in essi viene tradotto in proteine murine nella cellula ricevente (17).

Sono stati condotti anche alcuni studi sugli esosomi contenuti nel latte (18).

Vi sono varie evidenze che il cargo esosomale del latte bovino, in particolare gli acidi nucleici (RNA), siano trasportati alle cellule immunitarie circolanti.

– Alcuni di questi miRNA e mRNA sem-

brano poter regolare rispettivamente l'espressione di geni umani o essere tradotti in proteine biologicamente attive (19).

► L'intento del nostro lavoro finora svolto (ancora in corso) è quello di indagare la presenza di esosomi nel liofilizzato di fegato suino Neorland®, verificando, in caso affermativo, se tali nanovesicole possano essere biologicamente attive su cellule umane, in particolare su cellule staminali.

MATERIALI E METODI

Un milligrammo di liofilizzato di fegato suino è risospeso in *buffer* Ringer-lattato

(*Krebs-Ringer Solution*, Alfa Aesar) per 1 ora, in agitazione costante.

Viene poi aggiunta Collagenasi IA (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 0.5 mg/ml a 37°C in agitazione costante, per un'ulteriore ora.

Al termine di questo tempo, vengono effettuate filtrazioni scalari, utilizzando *Cell-Grinder* (Sigma-Aldrich) e *Cell Strainer* (Falcon).

Ulteriori 3 filtrazioni sono effettuate con filtri per siringa, fino ad arrivare a pori da 0.2 µm.

– L'eluato viene addizionato di *Exo-Quick-TC* (System Biosciences, LLC) e mantenuto a 4°C per tutta la notte.

La mattina seguente, come da protocollo, il preparato contenente gli esosomi

viene centrifugato a 3000 x g per 15 minuti e il pellet risospeso in tampone PBS. Il campione viene trattato con *Rab5b Exo-Flow Capture Kit* (System Biosciences, LLC) come da protocollo.

Al campione vengono addizionate biglie magnetiche riportanti l'anticorpo esosomale Rab5b.

Grazie ad un supporto magnetico, le biglie con gli esosomi *legati*, vengono tenute ferme mentre il campione viene sottoposto a lavaggi successivi.

Alla fine del processo, gli esosomi vengono liberati dalle biglie ed eluiti in 200 µl di *Elution Buffer* fornito dal kit.

La quantificazione è stata effettuata mediante kit ELISA (*Porcine CD81 antigen ELISA Kit*, MyBioSource).

L'*uptake* degli esosomi porcini in cellule umane è stato valutato su **Cellule Staminali Mesenchimali** isolate da Membrane Fetali (FM-MSCs), mediante la visualizzazione al microscopio a fluorescenza (Nikon Ti-E).

Gli esosomi vengono colorati con BODIPY 1 TR ceramide (*Molecular Probes™*, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) come da protocollo e purificati dal colorante in eccesso grazie a colonnine (*Exosome Spin Columns*, MW 3,000; Invitrogen, Life Technologies).

Gli esosomi colorati con BODIPY sono aggiunti al terreno di coltura. Le cellule vengono individuate grazie alla colorazione vitale dei nuclei con *NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagent* (Thermo Fisher). La proliferazione è stata valutata con metodica MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*, Sigma Aldrich).

Le cellule sono state addizionate di MTT, lasciate a incubare a 37°C per 2 ore, il colorante solubilizzato con un *buffer* di lisi, e l'assorbanza letta con uno spettrofotometro (*MultiskanGO*, Thermo Fisher) a 570nm.

L'analisi statistica è stata effettuata con metodo ANOVA a una via, con correzione di Tukey.

Sono stati considerati significativi $p < 0.05$.

RISULTATI

Il preparato di fegato suino liofilizzato è stato risospeso in un *buffer* neutro, *Krebs-Ringer Solution*, e successivamente digerito con Collagenasi IA, al fine di liberare le nanovesicole intrap-

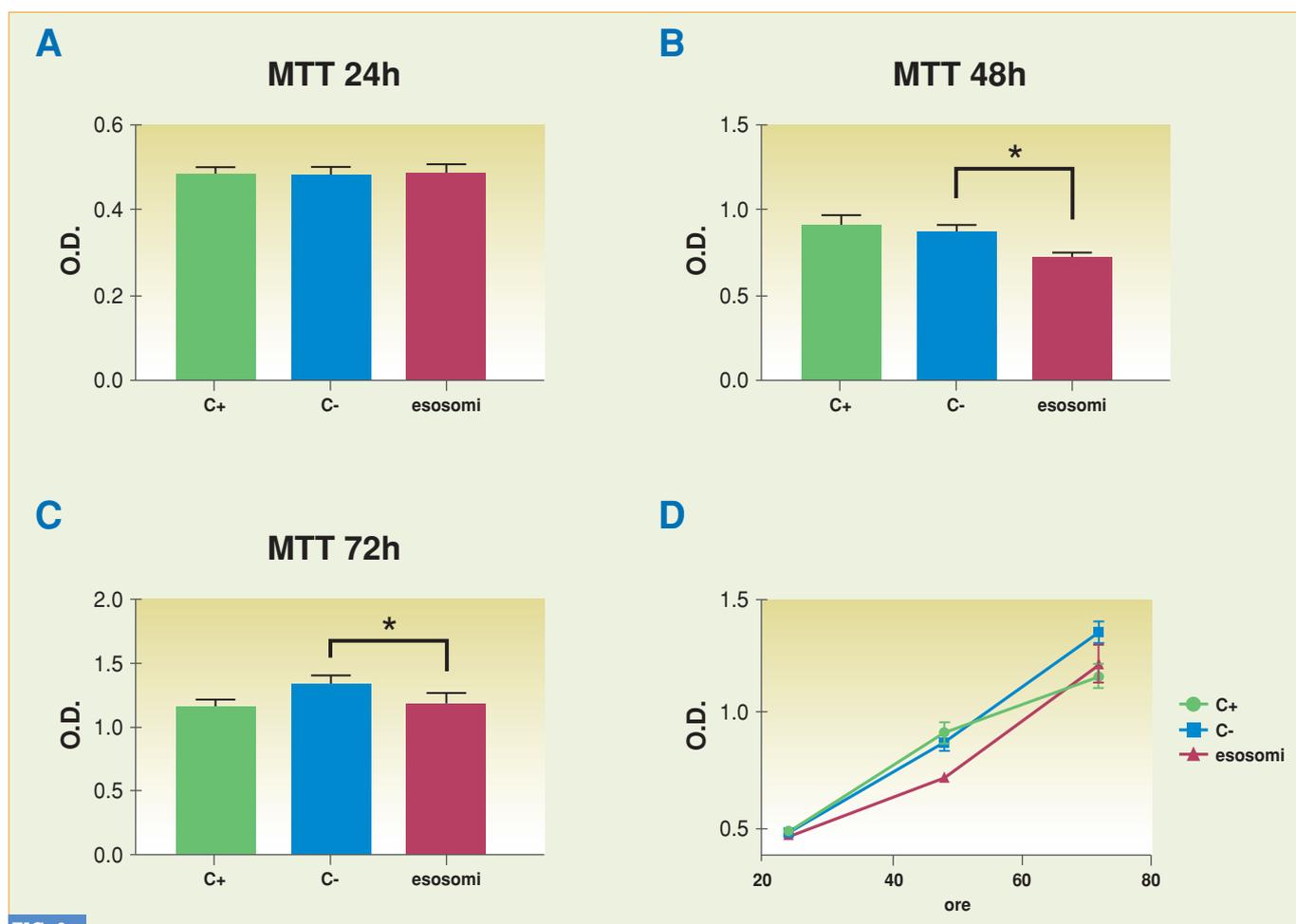


FIG. 2

Analisi della crescita cellulare.

A-B-C - Sull'asse delle ascisse: C+ (controllo positivo) = cellule coltivate in FBS standard; C- (controllo negativo) = cellule coltivate in FBS *exosome-free*; esosomi = cellule coltivate in FBS *exosome-free* con aggiunta di esosomi derivati da fegato suino.

Sull'asse delle ordinate: assorbanze (O.D. - *Optical Density*) rilevate a 24h (A), 48h (B) e 72h (C). * = differenze significative con $p < 0.05$.

D: rappresentazione XY dei valori mostrati in A, B, C.

polate nel collagene, proteina largamente rappresentata nel fegato.

Poiché gli esosomi sono nanovesicole con un diametro di pochi nanometri (da 30 a 150 nm), il digerito viene sottoposto a diversi passaggi di filtrazione, prima con filtri più larghi per eliminare tutti i componenti grossolani, poi con filtri sempre più selettivi, per rendere la soluzione il più possibile ricca in nanovesicole.

– Gli esosomi possono essere isolati sfruttando diversi metodi, dalla ultracentrifugazione alla microfluidica, passando per molti altri.

In questo lavoro si è sfruttata la capacità di alcune molecole come il polietilene glicole (PEG) di polimerizzare, inglobando le microparticelle presenti nella soluzione, rendendole più pesanti.

Il polimero è stato aggiunto alla soluzione da cui si vogliono isolare le microvesicole, lasciato ad incubare per almeno una notte a 4°C e centrifugato il giorno successivo.

Il sedimento (pellet) che si è formato dopo centrifugazione, contenente gli esosomi, è stato lavato e risospeso in un *buffer* isotonic e sterile (PBS).

– Gli esosomi sono nano-vesicole che presentano sulla membrana che le circonda proteine specifiche (tra le quali, ad esempio CD9, CD81, HSP70, ecc.). Il metodo di purificazione da noi utilizzato si basa sull'utilizzo di biglie magnetiche a cui sono legati anticorpi rivolti verso una di queste proteine, nello specifico Rab5b.

Le biglie sono state messe a contatto con la soluzione virtualmente contenente esosomi, cosicché l'anticorpo presente sulla biglia possa legarsi all'esosoma da isolare.

Con un magnete sono state allontanate le biglie dalla soluzione contenente tutte le altre particelle co-precipitate grazie al polimero. Dopo aver lavato più volte le biglie, gli esosomi vengono liberati grazie a *buffer* di eluizione (*Elution Buffer*) e rimangono risospesi in esso.

– Dopo averli isolati grazie alla separa-

zione magnetica, gli esosomi vengono quantificati grazie ad un saggio ELISA. L'ELISA è un test che si basa sul riconoscimento specifico antigene-anticorpo. Il kit utilizza un anticorpo presente sugli esosomi, CD81, alternativo a Rab5.

Questo stratagemma, ossia l'utilizzo di due anticorpi diversi per l'isolamento e la quantificazione degli esosomi, ci permette di **escludere** l'ipotesi di aver isolato con le biglie anche proteine libere, non legate alle microvesicole.

Infatti se non vi fossero esosomi, l'ELISA per CD81 risulterebbe completamente negativo, non potendo esservi in soluzione proteine CD81 singole, in quanto sarebbero andate perse durante il processo di purificazione.

Una volta rilevata la presenza di nanovesicole, abbiamo studiato se esse avessero un possibile ruolo biologicamente attivo.

– Per testare se gli esosomi derivati dal fegato liofilizzato di suino fossero riconosciuti ed internalizzati dalle cellule umane, abbiamo utilizzato Cellule Staminali Mesenchimali (**MSCs**) isolate da placenta umana da parto a termine (gentilmente fornitaci dalla Prof.ssa Laura Bonsi e dal Prof. Francesco Alviano, Università di Bologna).

Le MSCs derivate da membrane fetali (FM-MSCs) sono cellule particolarmente plastiche e presentano tutti i marcatori di staminalità necessari per definire "mesenchimale" una popolazione (20).

Le MSCs sono – inoltre – in grado di differenziare in moltissimi tipi cellulari, tra cui osteoblasti, condroblasti, adipociti ed **epatociti** (21).

Le cellule mesenchimali umane sono state coltivate, per questi esperimenti, in siero depleto di esosomi (*Exosome-depleted FBS one shot*, Gibco), per non creare alcun confondimento con gli esosomi suini somministrati in coltura.

Il primo interrogativo su cui indagare era la capacità degli esosomi, isolati da liofilizzato di fegato suino, di essere **riconosciuti** dalle cellule umane e di essere **internalizzati** da esse.

– Per verificare questa ipotesi, abbiamo utilizzato un colorante con alta affinità per le membrane lipofile, appartenente a una classe di coloranti fluorescenti la cui struttura base è costituita da 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, ossia il BODIPY 1 TR ceramide, con una metodica già utilizzata nel nostro laboratorio e pubblicata (22).

In particolare, gli esosomi sono stati colorati con BODIPY 1 TR ceramide e, dopo aver rimosso l'eccesso di colorante, ossia il colorante non legatosi agli esosomi, grazie a delle colonnine purificatrici (*Exosome Spin Columns*, MW 3,000; Invitrogen, Life Technologies), sono stati aggiunti al terreno di coltura.

Dopo 3 e 24 ore le cellule vengono visualizzate al microscopio.

– Come si può vedere in **FIG. 1A**, già dopo 3 ore le cellule (evidenziate dalla colorazione blu dei nuclei) trattate con gli esosomi iniziano ad apparire colorate (rosso), mostrando già una notevole differenza rispetto sia al controllo negativo (senza colorante) sia al controllo positivo (solo colorante).

Il controllo positivo è stato trattato con una soluzione di colorante, senza esosomi, che ha subito la stessa purificazione del campione con esosomi attraverso le colonnine *Exosome Spin Columns* e serve a dimostrare che la colorazione del campione analizzato è dovuta **solo** al BODIPY trattenuto dagli esosomi e non ad una eventuale contaminazione di colorante libero.

Dopo 24 ore dal trattamento, le cellule vengono nuovamente osservate (**FIG. 1B**).

Le immagini mostrano un risultato eclatante: la colorazione delle cellule trattate con esosomi (colorati con BODIPY) è evidente, mentre i due controlli, positivo e negativo, sono uguali al giorno precedente.

• Il risultato di questo esperimento evidenzia come cellule umane, staminali in questo caso, siano in grado di **riconoscere** ed **internalizzare** esosomi di

derivazione suina, **eludendo completamente il problema della diversità di specie.**

– Chiarito questo importantissimo aspetto, ci siamo chiesti se, oltre ad entrare nelle cellule, gli esosomi avessero un effetto su di esse.

Il primo test effettuato (molti altri sono attualmente in corso) ha valutato l'impatto sulla crescita cellulare.

La crescita cellulare è stata valutata con MTT; MTT è un saggio colorimetrico che sfrutta la capacità degli enzimi mitocondriali di ridurre il 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazano, sostanza di colore blu.

Il saggio è utilizzato comunemente per valutare la tossicità delle sostanze a livello mitocondriale.

Se la sostanza da testare non ha un effetto diretto sui mitocondri, con una certa approssimazione si può correlare il numero di mitocondri al numero di cellule.

Grazie a questo assunto, il saggio MTT viene comunemente usato per la valutazione della crescita cellulare.

Come in **FIG. 2A**, le cellule trattate con una singola dose di esosomi non mostrano una differenza significativa rispetto ai controlli positivo (cellule mantenute in FBS non depleto da esosomi) e negativo (cellule mantenute in FBS purificato da esosomi) dopo 24 ore.

– Al contrario, dopo 48 ore (**FIG. 2B**), la crescita delle cellule mesenchimali trattate con esosomi inizia ad arrestarsi, con un effetto che prosegue anche fino a 72 ore (**FIG. 2C**).

Come si evince dal grafico in **FIG. 2D**, gli esosomi non determinano un effetto tossico sulle cellule. Infatti, le assorbanze (OD) aumentano costantemente, rivelando un aumento complessivo del numero di cellule in tutti i tre campioni.

DISCUSSIONE

I dati preliminari qui presentati forniscono due informazioni importantissime:

1. il fegato liofilizzato di suino Neorland® contiene esosomi; **2.** questi vengono internalizzati dalle cellule umane e sono biologicamente attivi.

In studi recenti è stato valutato l'effetto della liofilizzazione sulla preservazione degli esosomi, affinché siano biologicamente attivi anche dopo un periodo di conservazione.

Gli esosomi vengono usualmente mantenuti a -80°C (23), ma vi sono indicazioni di come questa condizione non sia ottimale per la conservazione a lungo termine.

Infatti già dopo 4 giorni in questa condizione, gli esosomi risultano morfologicamente differenti da quelli isolati in fresco (24).

– Anche la conservazione a 4°C o 37°C modifica la morfologia di queste vescicole, rendendole più piccole, con possibili importanti conseguenze sulla loro azione biologica (25).

La liofilizzazione è un processo usato comunemente per preservare molti tipi di materiali biologici, dalle proteine al plasma, aumentandone la stabilità a lungo termine (26).

Anche per ciò che concerne gli esosomi, la liofilizzazione risulta essere una tecnica di elezione per la loro conservazione. Vi sono studi che confermano come questo procedimento ne preservi l'integrità e la funzionalità (27).

I nostri dati preliminari confermano che gli esosomi non vengono distrutti dal procedimento di liofilizzazione Neorland®, ma rimangono **intatti e biologicamente attivi.**

Le cellule utilizzate in questo studio sono cellule mesenchimali umane isolate da placenta a termine (20).

Le cellule staminali mesenchimali sono

cellule adulte che possono essere isolate da diversi tessuti, essendo virtualmente presenti in ogni organo.

Sono definite tali dalla presenza di alcuni marcatori di superficie (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105) e dall'assenza di altri (CD14, CD34, CD45 e HLA-DR) così come dalla capacità di differenziare in altri tipi cellulari (osteociti, condrociti e adipociti).

Oltre alle potenzialità differenziali, presentano anche una capacità immunomodulatoria intrinseca.

La loro funzione all'interno degli organi di origine non è sempre nota, ma le potenzialità espresse *in vitro* le rendono particolarmente interessanti non solo nell'ottica di un auto-trapianto, ma soprattutto nella prospettiva di individuare trattamenti in grado di migliorare le capacità rigenerative dell'organo di appartenenza.

Anche il fegato è provvisto di staminali mesenchimali (*Liver-Derived Human MSCs* - LHMSCs) che possiedono caratteristiche specifiche rispetto a quelle isolate da altri organi; ad esempio mostrano una più accentuata secrezione di fattori protettivi (28).

Queste cellule sono in grado di differenziare in epatociti maturi; tuttavia il meccanismo con cui ciò avvenga *in vivo* è ancora sconosciuto, anche se è chiaro che esse siano implicate in diversi processi fisiologici e patologici (29).

– In questo contesto, è particolarmente interessante come gli esosomi derivati da fegato suino siano in grado di arrestare la crescita di cellule staminali mesenchimali.

Nel nostro laboratorio sono in corso diversi studi per indagare questo dato.

– In primo luogo, è in corso la valutazione della dose-dipendenza di questa azione. Inoltre, stiamo analizzando i cambiamenti nell'espressione genica e proteica delle cellule riceventi, nell'ottica di comprendere se, oltre ad un arresto del ciclo, vi sia una spinta differenziale. È già stato dimostrato che l'ag-

giunta di esosomi provenienti da cellule differenziate è in grado di alterare il destino delle staminali mesenchimali, spostando il fenotipo da adipocitario a osteocitario e viceversa (30).

La regolazione potrebbe avvenire anche attraverso i miRNA contenuti nell'esosoma, come già dimostrato in altri modelli, dove si è osservato che esosomi derivati da cellule ematopoietiche sono in grado di promuovere il differenziamento di cellule embrionali *in vitro* inibendo una *pathway* specifica (31). ■

Bibliografia

- Blachier M., Leleu H., Peck-Radosavljevic M., Valla D.C., Roudot-Thoraval F. – The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *J Hepatol*, 58(3); **2013**.
- Marcellin P., Kutala B.K. – Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. *Liver Int*, 38 Suppl 1; **2018**.
- Willms E., Johansson H.J., Mäger I., Lee Y., Blomberg K.E., Sadik M., Alaarg A., Smith C.I., Lehtiö J., El Andaloussi S. – Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep*, 6:22519; **2016**.
- Kowal J., Arras G., Colombo M., Jouve M., Morath J.P., Primdal-Bengtson B., Dingli F., Loew D., Tkach M., Théry C. – Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113(8); **2016**.
- Colombo M., Raposo G., Théry C. – Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30; **2014**.
- Simpson R.J., Jensen S.S., Lim J.W. – Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics* 8; **2008**.
- Pan B.T., Johnstone R.M. – Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 33; **1983**.
- Babst M. – A protein's final ESCRT. *Traffic*, Jan; 6(1); **2005**.
- Johnstone R.M. – Exosomes biological significance: a concise review. *Blood Cells Mol Dis* 36; **2006**.
- Lee Y., EL Andaloussi S., Wood M.J.A. – Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet*, 21(R1); **2012**.
- Mathivanan S., Simpson R.J. – ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics*, 9; **2009**.
- Théry C., Zitvogel L., Amigorena S. – Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, Aug; 2(8); **2002**.
- Taylor D.D., Gercel-Taylor C. – MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 110; **2008**.
- Rabinowits G., Gercel-Taylor C., Day J.M., Taylor D.D., Kloecker G.H. – Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin. Lung Cancer* 10; **2009**.
- Zhou Y., Tian T., Zhu Y., Jaffar Ali D., Hu F., Qi Y., Sun B. and Xiao Z. – Exosomes Transfer Among Different Species Cells and Mediating miRNAs Delivery. *J Cell Biochem*, 118; **2017**.
- Théry C., Zitvogel L., Amigorena S. – Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, Aug 2(8); **2002**.
- Valadi H., Ekstrom K., Bossios A., Sjostrand M., Lee J.J., Lotvall J.O. – Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9; **2007**.
- Munagala R., Aqil F., Jeyabalan J., Gupta R.C. – Bovine milk derived exosomes for drug delivery. *Cancer Lett* 371; **2016**.
- Zempleni J., Aguilar-Lozano A., Sadri M., Sukreet S., Manca S., Wu D., Zhou F., Mutai E. – Biological Activities of Extracellular Vesicles and Their Cargos from Bovine and Human Milk in Humans and Implications for Infants. *J Nutr*. 147(1); **2017**.
- Alviano F., Fossati V., Marchionni C., Arpinati M., Bonsi L., Franchina M., Lanzoni G., Cantoni S., Cavallini C., Bianchi F., Tazzari P.L., Pasquinelli G., Foroni L., Ventura C., Grossi A., Bagnara G.P. – Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol*. Feb 21; **2007**.
- Aurich H., Sgodda M., Kaltwasser P., Vetter M., Weise A., Liehr T., Brulport M., Hengstler J.G., Dollinger M.M., Fleig W.E., Christ B. – Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut*. 58(4); **2009**.
- Cavallini C., Zannini C., Olivi E., Tassinari R., Taglioli V., Rossi M., Poggi P., Chatgilliloglu A., Simonazzi G., Alviano F., Bonsi L., Ventura C. – Restoring In Vivo-Like Membrane Lipidomics Promotes Exosome Trophic Behavior from Human Placental Mesenchymal Stromal/Stem Cells. *Cell Transplant* Jan; 27(1); **2018**.
- Jeyaram A., Jay S.M. – Preservation and storage stability of extracellular vesicles for therapeutic applications *AAPS J*, 20; **2018**.
- Maroto Y., Zhao M., Jamaluddin V.L., Popov H., Wang M., Kalubowilage Y., Zhang J., Luisi, H. Sun C.T., Culbertson S.H., Bossmann M., Motamedi A.R. – Brasier Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses *J Extracell Vesicles*, 6; **2017**.
- Sokolova V., Ludwig A.-K., Hornung S., Rotan O., Horn P.A., Epple M., Giebel B. – Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 87; **2011**.
- Yadava P., Gibbs M., Castro C., Hughes J.A. – Effect of lyophilization and freeze-thawing on the stability of siRNA-liposome complexes. *AAPS PharmSciTech*, 9; **2008**.
- Charoenviriyakul C., Takahashi Y., Nishikawa M., Takakura Y. – Preservation of exosomes at room temperature using lyophilization. *J Pharm*, 553(1-2); **2018**.
- Wang Y., Yu X., Chen E., Li L. – Liver-derived human mesenchymal stem cells: a novel therapeutic source for liver diseases. *Stem Cell Res Ther*, 7: 71; **2016**.
- Lemos D.R., Duffield J.S. – Tissue-resident mesenchymal stromal cells: Implications for tissue-specific antifibrotic therapies. *Sci Transl Med*, 10(426); **2018**.
- Narayanan K., Kumar S., Padmanabhan P., Gulyas B., Wan A.C.A., Rajendran V.M. – Lineage-specific exosomes could override extracellular matrix mediated human mesenchymal stem cell differentiation. *Biomaterials*, 182; **2018**.
- Liao F.L., Tan L., Liu H., Wang J.J., Ma X.T., Zhao B., Chen Y., Bihl J., Yang Y., Chen R.L. – Hematopoietic stem cell-derived exosomes promote hematopoietic differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro via inhibiting the miR126/Notch1 pathway. *Acta Pharmacol Sin*. 39(4); **2018**.

Riferimento bibliografico

FERRONI O., TASSINARI R., CAVALLINI C., TAGLIOLI V., OLIVI E., VENTURA C. – Epatoguna.
– Il liofilizzato di fegato di suino Neorland® è fonte di esosomi ben conservati e biologicamente attivi su cellule staminali umane.
La Med. Biol., **2019**/1; 3-9.

corresponding author

Dott.ssa Claudia Cavallini

– GUNA ATTRE (Advanced Therapies and Tissue Regeneration), Acceleratori di Innovazione, CNR

Via Piero Gobetti, 101

I – 40129 Bologna