



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN MEDICINA VETERINARIA

“L’effetto del Secretoma di Cellule Staminali Mesenchimali
sulla coagulazione del plasma sanguigno in specie d’interesse veterinario”

“The effect of Mesenchymal Stem Cell-derived Secretome
on the coagulation of the blood plasma in species of veterinary interest”

Relatore:

Prof. **ROBERTO RAMONI**

Correlatore:

Dott.ssa **PRISCILLA BERNI**

Laureanda:

GIULIA MINERBA

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Indice

1. INTRODUZIONE	8
1.1 Il plasma	8
1.2 La coagulazione del sangue	9
1.2.1 Emostasi primaria.....	10
1.2.2 Emostasi secondaria.....	11
1.2.2.1 La via estrinseca	13
1.2.2.2 La via intrinseca.....	13
1.2.2.3 Il fibrinogeno	14
1.2.2.4 La via comune e l'attivazione del fibrinogeno	15
1.2.3 Retrazione del coagulo e fibrinolisi.....	16
1.2.4 Fattori anticoagulanti naturalmente presenti nel sangue	17
1.3 I derivati del plasma di interesse terapeutico	18
1.4 Le vescicole extracellulari (EV) nel sangue	19
1.5 Le cellule staminali	20
1.5.1 L'auto-rinnovamento e la differenziazione	21
1.5.2 Il concetto di nicchia	23
1.5.3 La classificazione delle cellule staminali	23
1.6 Le cellule staminali mesenchimali (MSC)	26
1.6.1 La caratterizzazione delle MSC	26
1.6.2 Fonti di MSC.....	28
1.6.3 Isolamento e coltura delle MSCs	29
1.6.4 Le cellule staminali autologhe e allogene.....	30
1.6.5 Meccanismo d'azione e capacità rigenerative delle MSC	32
1.6.5.1 Il meccanismo di homing nelle MSCs	32
1.6.5.2 L'attività paracrina delle MSCs e il secretoma	35
1.7 Il secretoma delle MSCs	36
1.7.1 Utilità cliniche del secretoma	36
1.7.2 Le proprietà immunomodulanti del secretoma	38
1.7.3 Il ruolo del secretoma delle MSC nella riparazione e rigenerazione dei tessuti	41
1.7.4 Il liosecretoma come prodotto farmaceutico.....	42
1.7.4.1 Procedura di produzione del liosecretoma mediante processo validato e conforme alle GMP	43
1.7.4.2 Caratterizzazione chimico-fisica e molecolare del liosecretoma.....	45
1.7.4.3 Sicurezza ed efficacia del liosecretoma	45
2. OBIETTIVO DELLA TESI	47
3. MATERIALI E METODI	49
3.1 Prelievi ematici	49
3.2 Preparazione del plasma	49

3.3 Preparazione del liosecretoma	51
3.4 Prove di coagulazione	53
4. RISULTATI.....	55
4.1 Coagulazione dei derivati del plasma sanguigno	55
4.2 Effetto del liosecretoma sulle cinetiche di coagulazione nel plasma di cavallo	59
4.3 Effetto del liosecretoma sulle cinetiche di coagulazione nel plasma di cane	64
5. DISCUSSIONE	70
5. CONCLUSIONI.....	75
6. BIBLIOGRAFIA	76
7. RINGRAZIAMENTI	88

Riassunto

Negli ultimi decenni è stato dimostrato che l'efficacia terapeutica rigenerativa delle cellule staminali mesenchimali (MSC) è dovuta principalmente al loro biosecretoma (MSCs), che è costituito da un elevato numero di molecole bioattive rilasciate nello spazio extracellulare tramite secrezione. Queste sono sia in forma solubile che all'interno di vescicole extracellulari. Basandosi su queste premesse, Bari e colleghi hanno di recente presentato nell'articolo: "Pilot production of mesenchymal stem/stromal freeze-dried secretome for cell-free regenerative nanomedicine: a validated GMP-compliant process (2018). Cells 7.11, p. 190" una procedura innovativa e conforme alle norme GMP (Good Manufacturing Practice) per la produzione su larga scala di un prodotto farmaceutico costituito da MSCs di tessuto adiposo (AT-MSCs), che venendo sottoposto a liofilizzazione, viene denominato 'Liosecretoma'. Questo prodotto, che può venire riscostituito mediante aggiunta di acqua sterile, è classificabile come un farmaco pronto all'uso, potenzialmente in grado di rimpiazzare le terapie a base di cellule staminali nel campo della medicina rigenerativa.

Poiché il processo coagulativo viene favorito dalla presenza di materiale micro e nano particolato e di sostanze procoagulanti che si trovano all'interno del liosecretoma, nel presente elaborato di tesi è stato verificato, per la prima volta in modo quantitativo, il suo effetto, in vitro, sulla formazione del coagulo di fibrina nelle specie canina ed equina. Lo sviluppo di torbidità causata dal processo coagulativo in funzione del tempo in campioni di plasma deprivato delle particelle endogene (mediante centrifugazione o ultracentrifugazione), è stata valutata attraverso l'aumento dell'assorbanza, sia in assenza che in presenza di quantità crescenti di liosecretoma. Le cinetiche di coagulazione seguono un andamento nel tempo che è descritto da funzioni sigmoidee a tre parametri, dalle quale è possibile valutare la fase di latenza del processo, il tempo in cui si realizza metà della coagulazione ($t_{1/2}$) e, dalla pendenza al flesso, la velocità con cui il processo si realizza. Il valore finale di torbidità consente inoltre di ipotizzare differenti modalità di formazione del coagulo in funzione della velocità del suo processo di formazione.

In entrambe le specie si è evidenziata, all'aumentare della concentrazione di Liosecretoma, una significativa diminuzione dei $t_{1/2}$ accompagnata da un altrettanto significativo incremento della velocità di formazione del coagulo (aumento della pendenza al flesso).

Queste variazioni sono risultate maggiori nella specie canina rispetto a quella equina. La coagulazione dei derivati del plasma indotta in tempi definiti dall'aggiunta di opportune quantità di liosecretoma, potrebbe quindi essere sfruttata anche in ambito clinico per la preparazione, ad esempio, di gel prodotti dalla coagulazione di derivati plasmatici pronti all'uso. Questi prodotti, applicati nella sede di danno permetterebbero alle sostanze utili presenti all'interno del Liosecretoma di rimanere localizzate in situ e di agire direttamente sul tessuto danneggiato.

Abstract

In recent decades, it has been demonstrated that the regenerative therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells (MSCs) is primarily due to their biosecretome (MSCs), which consists of a high number of bioactive molecules released into the extracellular space by secretion. These molecules are both in soluble form and within extracellular vesicles. According to this, Bari and colleagues recently presented in their article: "Pilot production of mesenchymal stem/stromal freeze-dried secretome for cell-free regenerative nanomedicine: a validated GMP-compliant process (2018). Cells 7.11, p. 190" an innovative procedure, compliant with Good Manufacturing Practice (GMP) standards, for the large-scale production of a lyophilized pharmaceutical product consisting of adipose tissue-derived MSCs (AT-MSCs), that has been called 'Lyosecretome'. This product, that is reconstituted by adding sterile water, can be classified as a ready-to-use drug, potentially capable of replacing stem cell-based therapies in the field of regenerative medicine.

As the coagulation process is facilitated by the presence of micro and nano particulate material and pro-coagulant substances that are also main constituents of the lyosecretome, this thesis investigates, for the first time quantitatively, its effect, in vitro, on the formation of fibrin clot in both canine and equine species. The development of turbidity caused by the coagulation process as a function of time in samples of plasma deprived of the endogenous particles (by centrifugation or ultracentrifugation) was evaluated spectrophotometrically as the increase of the absorbance, both in the absence and presence of increasing amounts of lyosecretome.

The coagulation kinetics follow a time course described by three-parameter sigmoid functions, that allow to assess the latency phase of the process, the time required to obtain one half of the coagulation ($t_{1/2}$), and, from the slope at the inflection point, the velocity of the process. The final turbidity value also allows to hypothesize different models of both formation and molecular structure of the fibrin frame within the clot formation as functions of the velocity of the coagulation process. In both animal species, as the concentration of Lyosecretoma increased, a significant decrease of $t_{1/2}$ was accompanied by an increase of the clot formation velocity (as determined by an increase of the slope at the inflection point). These variations were more pronounced in the canine species compared to the equine. The precise timing of the coagulation process, that is determined by the addition of appropriate quantities of Lyosecretome, can be of interest for the prompt preparation of ready to use plasma derivatives (as for instance platelet rich and poor plasma gels) suitable for clinical applications in the field of regenerative medicine. Moreover these gels, applied at the site of injury, would allow the beneficial substances present within the Lyosecretoma to remain localized in situ and act directly on the damaged tissue.

1. INTRODUZIONE

1.1 Il plasma

Il sangue è un composto biologico molto complesso, fondamentale per la vita umana e animale. Esso è costituito da un gran numero di componenti diversi che svolgono innumerevoli funzioni, tanto da essere definito un “organo liquido” (Shen, 2023; Schaller, 2008)

Il sangue è costituito da due parti principali: una porzione liquida definita plasma (55%) e una porzione cellulare (45%) (O.v. sjaastad, 2010; Schaller, 2008).

Quest’ultima parte è rappresentata da cellule prodotte in età adulta a livello del midollo osseo, a partire da due linee cellulari: linfoide e mieloide. Dalla linea linfoide prendono origine i diversi tipi di linfociti, mentre dalla linea mieloide prendono origine gli eritrociti (globuli rossi), i leucociti (globuli bianchi) e i trombociti (piastrine) (O.v. sjaastad, 2010).

Nel plasma sanguigno invece, che costituisce la metà dell’intero volume di sangue, sono dissolte numerose sostanze con funzioni biologiche diverse. Il componente predominante della componente liquida è rappresentato dall’acqua, che ne costituisce approssimativamente il 90% mentre la restante parte è costituita da sali inorganici, gas disciolti e numerosi metaboliti e componenti organici a basso e ad alto peso molecolare come glucosio, amminoacidi, ormoni, nucleotidi, proteine, oligosaccaridi e polinucleotidi (Shen, 2023; Schaller, 2008).

Le proteine disciolte costituiscono circa il 7% del plasma e sono sintetizzate dal fegato. Esse sono fondamentali per la determinazione della pressione oncotica, per il trasporto di sostanze generalmente non polari, e per il processo di emostasi che si attiva dopo un danno vascolare (O.v. sjaastad, 2010).

1.2 La coagulazione del sangue

La coagulazione del sangue o emostasi è il naturale processo che permette l'interruzione dell'emorragia determinata da una soluzione di continuo della parete vascolare, grazie alla formazione di un coagulo (Sang, Roest, de Laat, de Groot, & Huskens, 2021; Periyah, Halim, & Mat Saad, 2017; Mackman, Tilley, & Key, 2007).

Il termine emostasi viene dal greco "*haeme*" e "*stasis*" che significano rispettivamente "sangue" e "arresto".

Essa consiste in una vera e propria "cascata" di reazioni proteolitiche, in cui un precursore inattivo (zimogeno) è convertito in una proteasi attiva, che a sua volta è in grado di attivarne altre tramite un processo di amplificazione (Manzato Franco et al., 2004).

Per quanto il concetto della coagulazione possa sembrare semplice, in realtà è determinato da un complesso susseguirsi di eventi ed è caratterizzato da un delicato equilibrio tra processi che stimolano la coagulazione e processi che invece la inibiscono. Perciò qualsiasi evento che possa alterare questo meccanismo può sbilanciare l'equilibrio verso situazioni patologiche quali l'emorragia o la trombosi (Sanjeev Palta, 2014; Manzato Franco, 2004). L'emostasi, fisiologicamente, svolge due importanti funzioni: da un lato permette al sangue di scorrere fluido nei vasi normali, mentre dall'altro determina la formazione rapida di un coagulo ben localizzato nella sede di un danno vasale. Così facendo, dà il tempo ai processi riparativi di intervenire evitando una consistente perdita di sangue. In situazioni patologiche invece, si può avere un'alterazione del processo con esiti anche molto gravi come, ad esempio, la formazione di un trombo con la conseguente occlusione di un vaso sanguigno, oppure un'impossibilità nel fermare l'emorragia con la conseguente eccessiva perdita di sangue (A. Augustyn, 2023; E.A.Loiacono, 2018; Mackman, Tilley, & Key, 2007).

1.2.1 Emostasi primaria

L'emostasi primaria rappresenta la prima tappa della coagulazione, ed è il risultato che si ottiene dalla complessa interazione tra le piastrine e la parete vasale. Tutti i processi descritti in questa prima fase sono finalizzati alla formazione di un "tappo" emostatico provvisorio (Sanjeev Palta, 2014).

Le piastrine circolanti, presenti in numero elevato (circa 150-400 milioni/ml di sangue), sono frammenti cellulari anucleati di forma discoidale che, in condizioni fisiologiche, non interagiscono con la parete vasale integra. Esse comunicano continuamente con l'ambiente in cui si trovano, attraverso numerosi recettori di superficie e molecole di adesione (Yaqiu Sang, 2021; Schaller, 2008). Le piastrine, inoltre, contengono due tipologie di granuli: gli α -granuli e i granuli densi (o δ -granuli). I primi presentano recettori di membrana (α IIb β 3, GPVI, P-selectina, fattore tissutale e altri), fattori della coagulazione, citochine, chemochine, fattori di crescita e sostanze immunomodulatrici che vengono rilasciate dopo la loro attivazione. I δ -granuli invece contengono elevati livelli di ADP, ATP, istamina, serotonina, polifosfati e numerosi ioni (Yaqiu Sang, 2021; Sanjeev Palta, 2014).

In seguito ad un danno vascolare, il primo evento che si verifica è la contrazione del vaso (vasocostrizione) che si verifica a seguito di uno stimolo neurogenico ed al rilascio di mediatori locali come l'endotelina e il trombossano A2 di origine piastrinica (A. Augustyn, 2023; Periyah, Halim, & Mat Saad, 2017; Sanjeev Palta, 2014).

A livello della parete del vaso danneggiato le piastrine aderiscono al collagene subendoteliale esposto, grazie al fattore proteico di von Willebrand (vWF) prodotto dal tessuto endoteliale (E.A.Loiacono, 2018; Periyah, Halim, & Mat Saad, 2017; Mackman, Tilley, & Key, 2007). Quest'ultimo si comporta come un vero e proprio "ponte proteico" tra le molecole di collagene e il complesso glicoproteico I (GpIb) sulla superficie piastrinica (Yaqiu Sang, 2021; Sanjeev Palta, 2014). Una volta avvenuta l'adesione, le piastrine cambiano forma da discoidale a piatta, aumentando la loro superficie e rilasciando il contenuto dei loro granuli all'esterno. Tra le numerose sostanze che vengono rilasciate vi sono soprattutto l'ADP e il trombossano A2, che fungono da chemochine per altre piastrine: queste verranno richiamate nella sede della lesione, apponendosi sulle altre già presenti e formando poi un tappo emostatico temporaneo (E.A.Loiacono, 2018; Sanjeev Palta, 2014).

Le prostaciline e l'ossido nitrico, prodotti dalle cellule endoteliali sane, impediscono l'aggregazione piastrinica in condizioni di normalità. L'equilibrio tra trombossano e prostaciline permette di circoscrivere l'aggregazione piastrinica in modo da garantire la pervietà del lume del vaso (Yaqui Sang, 2021; Sanjeev Palta, 2014).

1.2.2 Emostasi secondaria

La seconda fase della coagulazione è caratterizzata dalla stabilizzazione dell'aggregato piastrinico, grazie all'interazione di diversi fattori che, tramite un processo definito "a cascata", portano alla conversione del fibrinogeno insolubile in una rete di fibrina (E.A.Loiacono, 2018).

Molti di questi fattori della coagulazione sono precursori inattivi di proteasi, conosciuti come zimogeni: essi vengono prodotti dal fegato e sono presenti nel sangue circolante. Queste proteine perciò, per poter partecipare al processo di coagulazione, dovranno "attivarsi" tramite una modificazione chimica che viene catalizzata da un'enzima vitamina K dipendente, che li renderà capaci di legare il Ca^{2+} e altri ioni (Sanjeev Palta, 2014). La vitamina K agisce come cofattore enzimatico di una carbossilasi, che determina appunto una carbossilazione dei residui di acido glutammico, al fine di formare l'acido γ -carbossiglutammino. Questa reazione fa sì che possano venir rese attive diverse proteine (Oldenburg, Bevans, Müller, & Watzka, 2006; Furie, Bouchard, & Furie, 1999). La nomenclatura dei fattori di coagulazione è piuttosto complessa (**fig. 1**): dei 12 originariamente conosciuti, i primi quattro sono indicati con dei nomi comuni, mentre i restanti vengono indicati nella forma attiva con la lettera minuscola "a", seguita dal numero romano che identifica lo zimogeno corrispondente (A. Augustyn, 2023; E.A.Loiacono, 2018; Sanjeev Palta, 2014).

Table 3: Nomenclature of the coagulation proteins/clotting factors				
Clotting factor number	Clotting factor name	Function	Plasma half-life (h)	Plasma concentration (mg/L)
I	Fibrinogen	Clot formation	90	3000
II	Prothrombin	Activation of I, V, VII, VIII, XI, XIII, protein C, platelets	65	100
III	TF	Co factor of VIIa	-	-
IV	Calcium	Facilitates coagulation factor binding to phospholipids	-	-
V	Proacclerin, labile factor	Co-factor of X-prothrombinase complex	15	10
VI	Unassigned			
VII	Stable factor, proconvertin	Activates factors IX, X	5	0.5
VIII	Antihæmophilic factor A	Co-factor of IX-tenase complex	10	0.1
IX	Antihæmophilic factor B or Christmas factor	Activates X: Forms tenase complex with factor VIII	25	5
X	Stuart-Prower factor	Prothrombinase complex with factor V: Activates factor II	40	10
XI	Plasma thromboplastin antecedent	Activates factor IX	45	5
XII	Hageman factor	Activates factor XI, VII and prekallikrein		-
XIII	Fibrin-stabilising factor	Crosslinks fibrin	200	30
XIV	Prekallikerin (F Fletcher)	Serine protease zymogen	35	
XV	HMWK- (F Fitzgerald)	Co factor	150	
XVI	vWf	Binds to VIII, mediates platelet adhesion	12	10 µg/mL
XVII	Antithrombin III	Inhibits IIa, Xa, and other proteases	72	0.15-0.2 mg/mL
XVIII	Heparin cofactor II	Inhibits IIa	60	-
XIX	Protein C	Inactivates Va and VIIIa	0.4	-
XX	Protein S	Cofactor for activated protein C		-

HMWK – High molecular weight kininogen; vWf – Von Willebrand factor; TF – Tissue factor

Figura 1: Concentrazione e proprietà delle proteine della coagulazione (Sanjeev Palta, 2014)

La cascata di coagulazione, per semplicità di comprensione, è generalmente classificata in due vie sulla base di due diversi meccanismi di attivazione: la via intrinseca e la via estrinseca. Entrambe queste vie portano, con meccanismi differenti, all'attivazione del fattore X che convertirà la protrombina (fattore II) in trombina attiva, la quale attraverso un attacco proteolitico a carico del fibrinogeno, determinerà la formazione del coagulo di fibrina (**fig.2**) (A. Augustyn, 2023; Periyah, Halim, & Mat Saad , 2017; Sanjeev Palta, 2014).

1.2.2.1 La via estrinseca

La via estrinseca è considerata la prima tappa e anche la più rapida in questa seconda fase del processo di emostasi. Essa si attiva a partire dal fattore tissutale (TF), una glicoproteina di membrana espressa soprattutto dalle cellule localizzate nel tessuto subendoteliale e dalle piastrine.

In situazioni di danno vasale il TF viene a contatto col plasma sanguigno e, legandosi al fattore VIIa e al calcio (complesso estrinsecasi) promuove la conversione dei fattori IX e X nella loro forma attiva (Periayah, Halim, & Mat Saad , 2017; Sanjeev Palta, 2014; Mackman, Tilley, & Key, 2007; Manzato Franco, 2004; Butenas & Mann , 2002).

Tuttavia la via estrinseca, per quanto sia più veloce, da sola non permette la formazione di un coagulo stabile se non accompagnata anche dal contributo della via intrinseca (E.A.Loiacono, 2018).

1.2.2.2 La via intrinseca

Quest'ultima si innesca quando il sangue entra in contatto con la matrice extracellulare, o più in generale con tutte le superfici diverse da quelle endoteliali (E.A.Loiacono, 2018). Essa parte dal fattore XII e rappresenta una via parallela per l'attivazione della trombina. Il meccanismo ha inizio dal fattore XII che attiva il fattore XI che determina successivamente l'attivazione del fattore IX, il quale grazie al legame con il suo cofattore (fattore VIII) determina la formazione del complesso intrinsecasi e quindi l'attivazione del fattore X (E.A.Loiacono, 2018; Sanjeev Palta, 2014; Manzato Franco, 2004). L'intrinsecasi determina l'attivazione del fattore X con una velocità molto maggiore (di circa 50-100 volte) rispetto all'estrinsecasi (Manzato Franco, 2004).

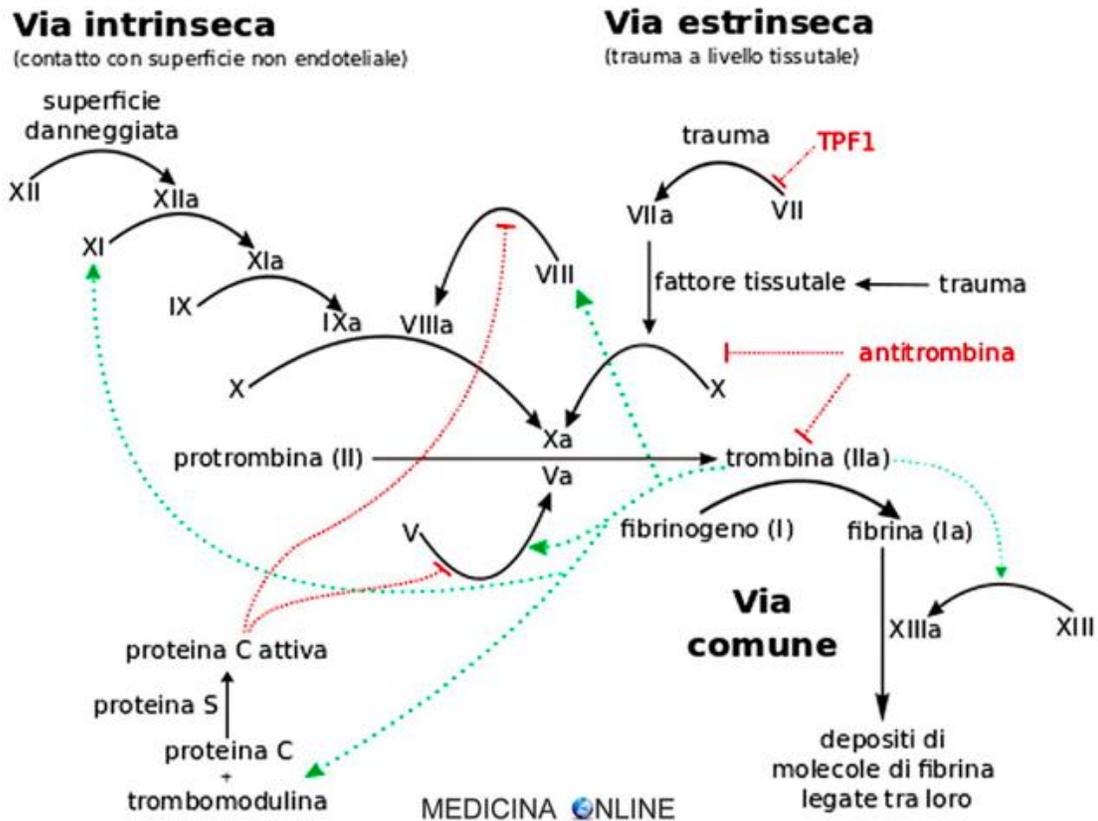


Figura 2: Cascata della coagulazione del sangue (E.A.Loiacono, 2018)

1.2.2.3 Il fibrinogeno

Il fibrinogeno è una glicoproteina plasmatica circolante, coinvolta in numerose funzioni biologiche e sintetizzata primariamente a livello epatico. La sua produzione viene drasticamente potenziata durante gli stati infiammatori, sotto l'effetto dell'interleuchina 6 (IL-6) e dei glucocorticoidi (Pieters & Wolberg, 2019; Herrick, Blanc-Brude, Gray, & Laurent, 1999). Dal punto di vista molecolare il fibrinogeno è composto da tre coppie di catene polipeptidiche chiamate α , β e γ , ciascuna tenuta insieme in una struttura dimerica da ponti disolfuro. Il fibrinogeno è il prodotto di tre geni strettamente collegati, ciascuno dei quali codifica per la struttura primaria di una delle tre catene polipeptidiche (Weisel, Fibrinogen and fibrin, 2005). Le porzioni carbossi-terminali delle catene β e γ costituiscono due identiche regioni globulari distali dette dominio D, mentre le porzioni N-terminali di tutte le sei catene sono raccolte al centro della molecola, in una regione denominata dominio E. Il dominio D è collegato al dominio E tramite due segmenti disposti ad alpha-elica.

La porzione carbossi-terminale della catena A α , invece, termina con una regione globulare posizionata vicino al dominio centrale E (**Fig.3**) (Undas & Ariëns, 2011).

1.2.2.4 La via comune e l'attivazione del fibrinogeno

A questo punto il fattore attivato Xa, legandosi al suo cofattore (fattore V), forma a livello della membrana delle piastrine attivate il complesso di protrombinasi, che converte la protrombina in trombina.

Questa proteina è essenziale per accelerare il processo coagulativo attivando le piastrine, il fattore XIII, i cofattori V e VIII, e iniziando ad attuare la trasformazione del fibrinogeno inattivo circolante in fibrina. Le molecole di fibrina si legano tra di loro tramite legami crociati, determinando l'incorporazione del tappo piastrinico che viene pertanto convertito in un tappo emostatico definitivo (A. Augustyn, 2023; Sanjeev Palta, 2014; Manzato Franco, 2004).

È importante considerare che la divisione tra emostasi primaria ed emostasi secondaria, come descritte in precedenza, ha più che altro significato didattico, in quanto questi sono due processi che iniziano simultaneamente e comunicano tra di loro lungo tutto il processo di coagulazione (Sang, Roest, de Laat, de Groot, & Huskens, 2021). In molte situazioni è fondamentale il legame tra i fattori della coagulazione e i recettori sulla superficie piastrinica.

Basti pensare ai complessi dell'estrinsecasi e della protrombinasi di cui si è già trattato in precedenza, oltre al legame tra le molecole di fibrinogeno e l'integrina α IIb β 3 sulla superficie di piastrine adiacenti, che permette la formazione di veri e propri ponti favorendo la loro aggregazione (Sang, Roest, de Laat, de Groot, & Huskens, 2021; Podolnikova, et al., 2005).

L'azione proteolitica della trombina sulla molecola di fibrinogeno determina il rilascio di due frammenti dalle porzioni N-terminali delle catene A α e B β , rispettivamente chiamati fibrinopeptidi FpA e FpB (Manzato Franco, 2004); la restante parte della molecola rappresenta il monomero di fibrina. Il distacco del fibrinopeptide FpA avviene per primo, e induce il legame tra due monomeri di fibrina permettendo la polimerizzazione di quest'ultima in protofibrille.

Il fibrinopeptide FpB si distacca secondariamente, permettendo l'aggregazione laterale delle protofibrille in fibre di fibrina e la loro crescita in larghezza (**fig. 3**) (Undas & Ariëns, 2011; Weisel, 2007).

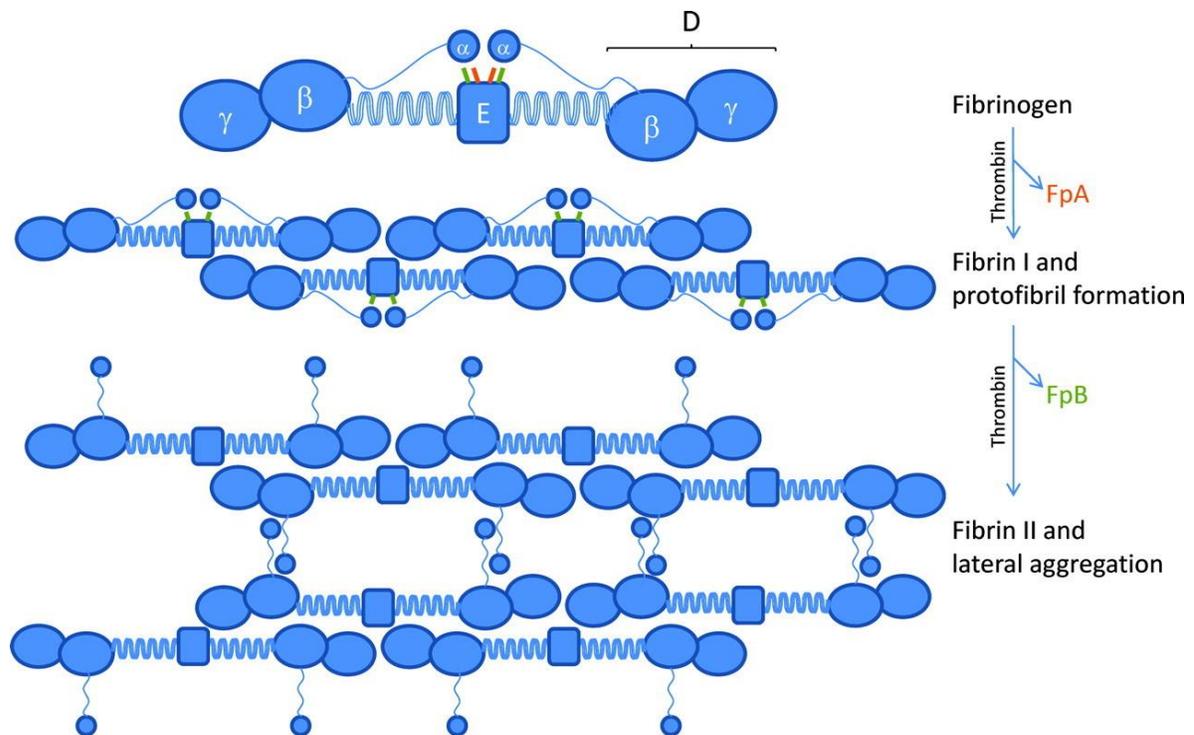


Figura 3: Processo di formazione delle fibre di fibrina (Undas & Ariëns, 2011)

Infine, fondamentale per la stabilizzazione del coagulo è l'attivazione da parte della trombina del fattore XIII, che contribuisce alla formazione di legami crociati all'interno della rete di fibrina migliorando le proprietà elastiche del coagulo e la sua resistenza alla fibrinolisi (Periayah, Halim, & Mat Saad, 2017; Undas & Ariëns, 2011).

1.2.3 Retrazione del coagulo e fibrinolisi

Dopo la formazione del coagulo, le piastrine attivate attraverso l'azione delle proteine della motilità citoplasmatica determinano una contrazione dell'intera struttura, con una conseguente perdita del fluido contenuto all'interno della rete di fibrina. Questo meccanismo viene definito "retrazione del coagulo". (A. Augustyn, 2023; Periayah, Halim, & Mat Saad, 2017).

La fase successiva è caratterizzata da un processo definito fibrinolisi, un processo enzimatico che dissolve la fibrina e che si attiva parallelamente alla cascata della coagulazione, al fine di limitare l'espansione del coagulo.

La fibrinolisi è operata dal sistema della plasmina, ovvero la forma attiva del plasminogeno, che viene attivato da diversi enzimi tra cui il fattore tissutale del plasminogeno (t-PA) e l'urochinasi (u-PA) (E.A.Loiacono, 2018; Sanjeev Palta, 2014). La degradazione del coagulo di fibrina è fondamentale per la risoluzione del danno vasale, e per il ristabilirsi del normale flusso sanguigno all'interno del vaso coinvolto.

1.2.4 Fattori anticoagulanti naturalmente presenti nel sangue

Al fine di mantenere il processo coagulativo in uno stato di equilibrio all'interno dell'organismo, esistono numerose sostanze ad azione anticoagulante che hanno il compito di interrompere o perlomeno rallentare la cascata della coagulazione (E.A.Loiacono, 2018). Fondamentalmente riconosciamo due tipi di meccanismi inibitori: gli inibitori stechiometrici, che inattivano specifici fattori della coagulazione legandosi direttamente ai loro siti attivi, e il sistema della proteina C, responsabile di un'inibizione dinamica (Manzato Franco, 2004). Tra i primi annoveriamo molecole come l'antitrombina III (ATIII), che presenta la capacità di neutralizzare l'azione di molte serin proteasi come la trombina e altri fattori della coagulazione.

Il fattore inibitorio del fattore tissutale (TFPI), presente a bassa concentrazione nel sangue, è considerato invece l'inibitore della fase di innesco della coagulazione. Esso blocca il complesso VIIa-TF della via estrinseca della coagulazione, eliminando di conseguenza l'attivazione del fattore X e del fattore IX. Il sistema della proteina C e della proteina S è considerato invece un meccanismo di inibizione dinamico, che prevede come tappa iniziale di attivazione il legame della trombina con una proteina presente a livello endoteliale, nota come trombomodulina. La proteina C, così attivata, lega la proteina S libera come cofattore, ed insieme determinano l'inattivazione dei fattori V/Va e VIII/VIIIa, riducendo la fase di propagazione della coagulazione (Sanjeev Palta, 2014; Manzato Franco, 2004; Butenas & Mann, 2002).

1.3 I derivati del plasma di interesse terapeutico

A partire dal plasma sanguigno si possono ottenere diversi preparati, che nel corso degli anni si sono rivelati utili nella pratica clinica e nella ricerca nel campo della medicina rigenerativa (Lubkowska, Dolegowska, & Banfi, 2012). Questi comprendono fondamentalmente il plasma ricco di piastrine (PRP), il plasma povero di piastrine (PPP) ed il lisato piastrinico (LP).

Il PRP si ottiene dal trattamento di un campione di sangue venoso, ottenuto da un semplice prelievo, che mediante centrifugazione differenziale presenta un maggior numero di piastrine rispetto a quelle contenute nel sangue prelevato (1×10^6 piastrine/ μL di PRP invece di 1.5×10^5 - 3.5×10^5 piastrine/ μL di sangue circolante) (Santos & et al., 2018).

L'applicazione del PRP permette pertanto di aumentare a livello di una lesione le potenzialità riparative che le piastrine manifestano (Santos & et al., 2018; Lubkowska, Dolegowska, & Banfi, 2012).

A partire dal prelievo di sangue venoso si effettua una prima centrifugazione per separare il plasma dagli eritrociti e dalla componente cellulare bianca che, essendo più dense, si depositeranno sul fondo. Il surnatante, in cui è sospesa la maggior parte della componente piastrinica, viene sottoposto ad una seconda centrifugazione più intensa che permette di ottenere un plasma povero di piastrine (PPP) nella porzione superiore ed un concentrato piastrinico (CP) sul fondo. Per ottenere il PRP si risospende il concentrato piastrinico in una determinata quantità di PPP, in modo tale da avere un incremento delle piastrine di un fattore superiore a tre rispetto al valore fisiologico. Il lisato piastrinico si ottiene sottoponendo il PRP ad un ciclo di congelamento/scongelo, con il fine di rompere le membrane plasmatiche e riversare il contenuto piastrinico nel plasma circostante.

1.4 Le vescicole extracellulari (EV) nel sangue

È stato dimostrato che all'interno del plasma sanguigno sono presenti delle piccole vescicole, prodotte e rilasciate tramite esocitosi da diverse tipologie cellulari in risposta a determinati stimoli o successivamente all'apoptosi (Panteleev & et al., 2017; Sinauridze, et al., 2007).

Queste vescicole extracellulari (EV) sono prodotte soprattutto dalle piastrine ma anche da leucociti, eritrociti, cellule endoteliali e cellule cancerose. Esse presentano un'importante azione procoagulante, oltre a ricoprire un ruolo nella comunicazione intercellulare (Nomura, 2017). Le EV hanno dimensioni molto piccole e non possono essere identificate tramite i normali metodi di analisi delle cellule del sangue. Queste microvescicole furono descritte per la prima volta da Wolf (Wolf, 1967) e da Warren et al. (Warren & Vales, 1972), che dimostrarono il rilascio di vescicole da parte delle piastrine attivate in corso di adesione durante la formazione del tappo piastrinico. Le EV si classificano sulla base delle dimensioni e del meccanismo di formazione in tre tipologie, ovvero gli esosomi provenienti da endosomi multivescicolari (con diametri tra i 50 e i 100 nm), gli ectosomi originati dalla membrana plasmatica (di dimensioni tra i 100 e i 1000 nm) e i corpi apoptotici (APs), prodotti durante la fase finale dell'apoptosi (Panteleev & et al., 2017; Nomura, 2017; Arraud, et al., 2014). Le EV, che sono delimitate da un doppio strato fosfolipidico a cui sono associate proteine di membrana, possono trasportare mRNA e proteine di diversa natura a seconda delle cellule da cui sono stati prodotti. Ormai è noto come le EV possano interagire con i fattori della coagulazione, grazie soprattutto alla presenza di fosfolipidi procoagulanti sulla loro superficie, come la fosfatidilserina (PS), oltre al fattore tissutale e ad altre molecole bioattive (Nomura, 2017; Arraud, et al., 2014).

La maggior parte delle reazioni biochimiche della cascata coagulativa non avvengono in soluzione, ma richiedono una superficie definita da una membrana fosfolipidica, normalmente rappresentata da quella delle piastrine attivate (Podoplelova, et al., 2016). Avendo chiaro questo concetto, possiamo comprendere il ruolo rappresentato dalle EV nel processo coagulativo e di come teoricamente questo, qualora se ne verificano le condizioni, possa prendere inizio anche in assenza di piastrine attivate (Panteleev & et al., 2017).

È stato dimostrato che queste vescicole sono così ricche in proteine e lipidi da avere un'attività procoagulante più alta rispetto a quella delle piastrine attivate (Nomura, 2017), in quanto un'alta densità di proteine della coagulazione su un'area di membrana molto piccola aumenta in maniera esponenziale la velocità dei processi coagulativi (Panteleev & et al., 2017; Podoplelova, et al., 2016). Allo stesso tempo un aumento della concentrazione di EV, associato spesso a situazioni patologiche sottostanti, può determinare l'instaurarsi di forme morbose come l'aumento del rischio di trombosi (Nomura, 2017; Arraud, et al., 2014; Sinauridze, et al., 2007).

Al giorno d'oggi le EV, soprattutto quelle prodotte dalle cellule di altri tessuti dell'organismo, sono oggetto di un'intensa ricerca volta a scoprirne l'origine, la funzione e il coinvolgimento in particolari situazioni patologiche.

1.5 Le cellule staminali

Le cellule staminali sono cellule indifferenziate, fondamentali nel periodo dello sviluppo e nella vita adulta per la rigenerazione dei tessuti. Esse possiedono proprietà uniche di autorinnovamento e la capacità di dare origine a uno, molti o potenzialmente tutti i tipi di tessuti di un organismo (Kuntal & Pushpa, 2014; Simons & Clevers, 2011; Li & Ting, 2005). Nella vita adulta possono differenziarsi nel normale processo di turnover cellulare che si verifica in tutti i tessuti, oppure per sopperire alla perdita di cellule all'interno di un particolare tessuto, in seguito ad un danno. Le cellule staminali si localizzano in punti specifici dell'organismo, chiamati "nicchie", che influenzano fortemente il loro comportamento e definiscono un ambiente adeguato per la sopravvivenza della popolazione (Rojas-Ríos & González-Reyes, 2014).

La capacità delle popolazioni di cellule staminali di sostenere l'omeostasi e la riparazione dei tessuti, ha generato numerose aspettative nel campo della medicina rigenerativa. Negli ultimi decenni, soprattutto grazie allo studio su modelli animali, si sono potuti raggiungere ottimi risultati riguardo la conoscenza del comportamento delle cellule staminali e dell'influenza che le nicchie esercitano su di esse. (Rojas-Ríos & González-Reyes, 2014; Pearson, López-Onieva, Rojas-Ríos, & González-Reyes, 2009).

1.5.1 L'auto-rinnovamento e la differenziazione

Le cellule staminali nella loro fase adulta hanno la capacità di arrestare il proprio ciclo cellulare in un particolare momento, senza che esso prosegua con la duplicazione del materiale genetico: questa fase di quiescenza viene definita fase G0.

Tuttavia, sotto particolari stimoli queste possono rientrare nel ciclo e ricominciare a replicare, diversamente per esempio dalle cellule differenziate che fanno parte dei tessuti così detti perenni. Le cellule staminali sono caratterizzate dalla capacità sia di generare a loro volta ulteriori cellule staminali, abilità definita "autorinnovamento", sia di produrre cellule destinate a percorrere un processo di differenziamento (Morrison & Kimble, 2006). Il differenziamento cellulare è il processo di specializzazione funzionale e strutturale delle cellule: una situazione in cui una cellula esprime solo determinate porzioni del suo DNA, necessarie per svolgere le funzioni specifiche nell'ambito di un dato tessuto. Di conseguenza, avremo la trascrizione da parte della cellula di determinati mRNA che saranno necessari per la sintesi di specifiche proteine. Il differenziamento è accompagnato dalla perdita di capacità proliferativa da parte di una cellula.

La capacità di autorinnovarsi distingue le cellule staminali dalla loro progenie di cellule più differenziate. Le cellule staminali possono intraprendere due diverse strade nel processo di autorinnovamento: la divisione cellulare asimmetrica o la divisione simmetrica di popolazione. Nel primo caso ad ogni divisione cellulare abbiamo la formazione di due cellule figlie con destini diversi: una cellula rimane nello stato indifferenziato all'interno del compartimento delle cellule staminali, mentre l'altra inizierà un processo di differenziamento (**Fig. 4a**).

Nel secondo caso invece abbiamo la formazione di due cellule figlie con lo stesso destino: esiste un numero pressoché uguale di staminali che replicandosi generano altre due staminali, accanto a staminali che invece generano due cellule destinate a differenziarsi (**Fig. 4b**) (Simons & Clevers, 2011; Morrison & Kimble, 2006).

Una popolazione di cellule staminali, quindi, può in determinate situazioni dipendere solo da una divisione simmetrica, oppure da una combinazione di divisioni simmetriche e asimmetriche.

Ovviamente tutto questo meccanismo è finemente controllato da particolari segnali provenienti dal contesto ambientale in cui le cellule si trovano, permettendo di mantenere sotto controllo il numero di cellule staminali presenti e il numero di cellule destinate a differenziarsi (Morrison & Kimble, 2006).

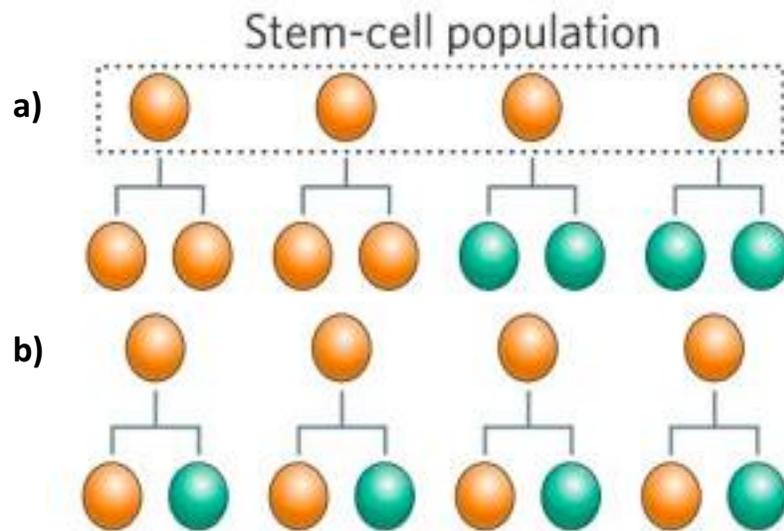


Figura 4a: divisione simmetrica delle cellule staminali (in arancio le cellule staminali, in verde le cellule differenziate).

Figura 4b: divisione asimmetrica delle cellule staminali.

(Morrison & Kimble, 2006)

La divisione cellulare asimmetrica è regolata da due meccanismi di origine differente: il primo è definito “intrinseco”, ed è relativo alla disposizione intracellulare di particolari componenti cellulari definiti geneticamente, che fungono da segnali (fattori di polarità cellulare o determinanti del destino cellulare) (Clevers, 2005).

Il secondo dipende invece da stimoli provenienti dall’ambiente esterno della nicchia, per questo ci si riferisce a quest’ultimo come “estrinseco” (Morrison & Kimble, 2006).

La divisione simmetrica, invece, è stata osservata sia durante lo sviluppo, che durante i processi di rigenerazione. Essa è fondamentale per la crescita del numero della popolazione di cellule staminali, cosa che non si potrebbe verificare se fosse possibile solo la divisione cellulare asimmetrica, in cui le caratteristiche di staminalità vengono conservate da una sola delle due cellule figlie.

1.5.2 Il concetto di nicchia

L'organismo possiede una certa capacità rigenerativa, essenziale per la riparazione dei tessuti in seguito ad un danno. Queste capacità sono attribuibili alla presenza di popolazioni di cellule staminali residenti al loro interno. Ne sono esempi il sistema emopoietico e la cute. L'attivazione delle cellule staminali, che sono in grado di percepire il danno subito da un tessuto e la capacità di reagire ad esso, sono conseguenze dirette del rapporto che sono in grado di instaurare con la loro "nicchia" (Rojas-Ríos & González-Reyes, 2014). Nel 1978, Schofield fu il primo a descrivere il concetto di "nicchia" come il microambiente che supporta la sopravvivenza della popolazione delle cellule staminali (Schofield, 1978). Il destino di queste cellule è fortemente influenzato, appunto, da fattori associati all'ambiente in cui si trovano naturalmente: per questo motivo di solito non è chiaro fino a che punto si può desumere del loro comportamento in vivo attraverso studi in cui le cellule sono coltivate in un ambiente molto diverso rispetto a quello tissutale. I componenti della nicchia spesso includono popolazioni di cellule di supporto e/o di una matrice extracellulare che, insieme, definiscono microambienti di diversa complessità. Ogni nicchia, tramite i suoi componenti, fornisce specifici segnali alle cellule staminali per il controllo della loro proliferazione e della differenziazione delle cellule figlie nelle molteplici linee cellulari esistenti (Rojas-Ríos & González-Reyes, 2014; Li & Ting, 2005).

1.5.3 La classificazione delle cellule staminali

Le cellule staminali sono classificate in base alla loro potenzialità differenziativa in totipotenti, pluripotenti, multipotenti, oligopotenti e unipotenti. Le cellule staminali totipotenti hanno la capacità di generare qualsiasi cellula dell'organismo appartenente ai tre foglietti embrionali e ai componenti extra-embryonali, come la placenta.

Le pluripotenti si trovano in uno stadio leggermente più differenziato e hanno la capacità di generare tutte le cellule dell'organismo, ad eccezione delle strutture extra-embryonali.

Le cellule multipotenti, oligopotenti e unipotenti, hanno invece un potenziale proliferativo e differenziativo molto minore rispetto ai due tipi precedenti.

Esse hanno la capacità di generare rispettivamente cellule appartenenti ad un solo tipo di foglietto embrionale (multipotenti) e cellule capaci di generare solo una (unipotenti) o poche altre (oligopotenti) tipologie cellulari specifiche (Rajabzadeh, Fathi , & Farahzadi, 2019; Kolios & Moodley, 2012). Inoltre, un'ulteriore classificazione si basa sulle origini delle cellule staminali in embrionali (ESC), fetali, neonatali e adulte (**fig. 5**). Le ESC sono cellule pluripotenti derivate dalla massa cellulare interna della blastocisti al quinto giorno di sviluppo prima dell'impianto in utero, capaci di dare origine a tutte le cellule dell'organismo. Questa tipologia di cellule si ottiene dal prelievo e dal trasferimento di un embrione nella fase di preimpianto in una piastra per coltura, contenente un appropriato "medium di coltura". Le ESC possono essere mantenute in coltura come linee cellulari indifferenziate, oppure all'occorrenza possono essere stimolate a differenziarsi (Kuntal & Pushpa, 2014).

Le cellule staminali fetali si definiscono tali in quanto vengono prelevate da organi fetali: queste comprendono le cellule della cresta neurale, le cellule staminali ematopoietiche e i progenitori delle isole pancreatiche.

Le cellule staminali neonatali comprendono, invece, quelle cellule ottenute dal cordone ombelicale. Quest'ultimo costituisce una ricca risorsa di cellule staminali ematopoietiche con grandi proprietà differenziative e di replicazione in vitro. Esse hanno la capacità di differenziarsi non solo nelle varie linee cellulari ematopoietiche, ma anche in cellule neuronali ed epatiche.

Inoltre, è stata dimostrata la grande utilità della matrice cellulare del cordone, definita gelatina di Wharton: una sostanza gelatinosa costituita da una componente amorfa di mucopolisaccaridi e una componente cellulare, in cui si annoverano numerose cellule staminali (Bongso & Lee, 2005). A differenza delle MSC del midollo osseo, le WJC hanno una maggiore capacità di espansione, una crescita più rapida in vitro e hanno la capacità sintetizzare diverse citochine. Le cellule della gelatina di Wharton si sono rilevate terapeutiche in diversi studi preclinici su modelli animali di malattie umane come malattie neurodegenerative, cancro, malattie cardiache, ecc_(Troyer & Weiss, 2008).

Infine, le cellule staminali adulte sono cellule indifferenziate presenti in tessuti specifici dell'organismo. Esse possono dare origine a un numero limitato di tipi cellulari, svolgendo un ruolo fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi nei processi di riparazione, turnover e rigenerazione tissutale.

Tra queste troviamo le cellule ematopoietiche, le cellule mesenchimali, neurali, gastrointestinali, epatiche, epidermiche e pancreatiche (Bongso & Lee, 2005).

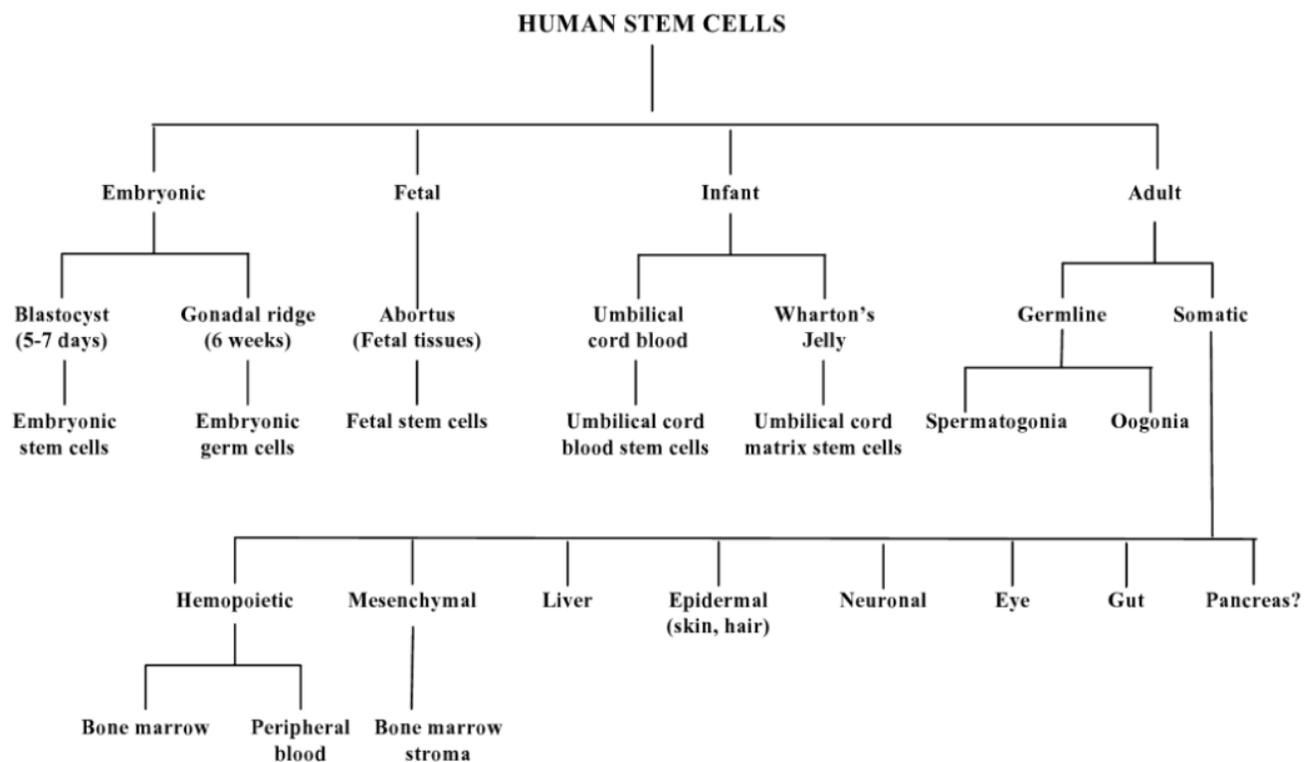


Figura 5: Classificazione cellule staminali umane (Bongso & Lee, 2005).

1.6 Le cellule staminali mesenchimali (MSC)

Le cellule staminali mesenchimali sono un esempio di cellule somatiche multipotenti con la capacità, sotto determinate condizioni, di differenziare in diverse linee cellulari mesenchimali (Wagner, et al., 2005; Dicker, et al., 2005).

Esse sono utilizzate ampiamente in medicina rigenerativa, e sono state isolate per la prima volta a livello del compartimento stromale del midollo osseo. Tuttavia, una serie di studi ha dimostrato la presenza di MSC in molti altri tessuti connettivi dell'organismo. Si è ipotizzato che la loro presenza sia legata alla necessità di avere una frazione di cellule staminali mesenchimali di riserva a fini rigenerativi.

1.6.1 La caratterizzazione delle MSC

La ISCT (the International Society of Cell Therapy) ha definito dei criteri minimi necessari per il riconoscimento delle MSC umane. Questi criteri si fondano principalmente su tre caratteristiche che permettono di distinguere le MSC dalle altre tipologie di cellule staminali: in coltura hanno la capacità di aderire a superfici di plastica dove si dispongono con una forma fibroblastoide, esprimono una serie di antigeni di superficie specifici e presentano un potenziale differenziativo multilineage in vitro (Li , Ghazanfari, Zacharaki, Ching Lim, & Scheduling, 2016). La capacità di aderire alla plastica è una caratteristica aspecifica, ma in questo caso utile a escludere altre cellule del midollo osseo destinate al lineage emopoietico. Inoltre, come accennato prima, uno dei criteri fondamentali è l'espressione di marker di superficie tra cui il CD105/endoglina, il CD73 e il CD90/Thy1. Allo stesso tempo le MSC, sempre per escludere la presenza di cellule emopoietiche che in questo caso rappresenterebbero dei contaminanti, devono essere negative per l'espressione di marker come il CD14, il CD19, il CD79a, il CD34, il CD45 e l'HLA-DR (Boxall & Jones, 2012).

È importante sottolineare che la definizione del fenotipo delle MSC animali è complicato dalla mancanza di anticorpi specie-specifici.

Sebbene esista un'ampia selezione di anticorpi specie-specifici per i piccoli animali più comunemente utilizzati in ambito sperimentale come topi e ratti, gli anticorpi specie-specifici per gli animali di maggiori dimensioni, sia da compagnia che da reddito (cane, pecora e cavallo ecc.) sono meno comuni. Data questa assenza di anticorpi specie-specifici, la maggior parte degli studi svolti fino ad oggi su questi animali è stato eseguito utilizzando anticorpi rivolti a marcatori della specie umana, che non sempre reagiscono in modo crociato con queste specie (Boxall & Jones, 2012).

Un'ulteriore caratteristica che definisce le MSC è la capacità di differenziarsi, sotto particolari condizioni colturali in vitro, in tre linee cellulari, ossia osteoblasti, adipociti e condrociti. (Wagner, et al., 2005; Dicker, et al., 2005).

L'attivazione osteogenica richiede la presenza di β -glicerolo-fosfato, acido ascorbico-2-fosfato, desametasone e siero fetale bovino. Quando coltivate in monostrato in presenza di questi composti, le cellule acquisiscono una morfologia osteoblastica con sovraregolazione dell'attività della fosfatasi alcalina e deposizione di una matrice extracellulare mineralizzata ricca di calcio (Barry & Murphy, 2004).

La differenziazione condrogenica invece, si verifica quando le MSC vengono coltivate in condizioni che includono: un formato di coltura tridimensionale, un mezzo nutritivo privo di siero e l'aggiunta di fattore di crescita come il TGF- β . Quando queste condizioni sono soddisfatte, le cellule perdono rapidamente la loro morfologia fibroblastoide e iniziano l'espressione di componenti della matrice extracellulare specifici della cartilagine. Infine, il protocollo di differenziamento adipogenico si basa sulla coltivazione delle MSC in monostrato con un medium contenente il 10% (V/V) di siero, in presenza di isobutilmetilxantina (IBMX), desametasone e insulina. L'IBMX sensibilizza le cellule all'insulina, che stimola la sintesi lipidica e l'accumulo dei lipidi in vacuoli intracellulari (Barry & Murphy, 2004).

In determinate condizioni le MSC possono differenziarsi non solo nelle tre linee precedentemente descritte, ma hanno la capacità di differenziarsi in numerose altre tipologie anche di derivazione non mesodermica, come epatociti e neuroni (Wagner, et al., 2005). Il potenziale di differenziazione multidirezionale è una delle caratteristiche più critiche delle MSC. Inoltre, le diverse fonti tissutali di MSC dimostrano una diversa tendenza nella proliferazione e nella capacità di differenziazione nelle diverse linee cellulari (Han, et al., 2019). Seppur ci siano numerose pubblicazioni che affrontano l'eterogeneità delle MSC, la differenziazione multidirezionale rimane ancora oggetto di studio.

1.6.2 Fonti di MSC

Le MSCs sono riscontrabili nella maggior parte dei tessuti connettivi del soggetto adulto: il più conosciuto e da cui originariamente queste cellule sono state isolate è il midollo osseo (Baghaei, et al., 2017).

Inoltre, come detto precedentemente le MSCs possono essere isolate anche da altre sedi quali, il tessuto adiposo (Locke, Windsor, & Dunbar, 2009), il periostio (De Bari, Dell'Accio, Tylzanowski, & Lutyen, 2001), la membrana e il liquido sinoviale (de Sousa, Casado, Neto, Aguiar, & Duarte, 2014), il legamento periodontale (Mensing, et al., 2011), il muscolo scheletrico (Asakura, Komaki, & Rudnicki, 2001), la cute (Toma, et al., 2001).

Infine, possiamo considerare anche i tessuti fetali come una buona fonte di queste cellule, quali il liquido amniotico (Harrell, Carl R.; Gazdic, Marina; Fellabaum, Crissy; Jovicic, Nemanja; Valentin, Djonov; Nebojsa, Arsenijevic; Vladislav, Volarevic, 2019), il cordone ombelicale e la gelatina di Wharton (Hwai-Shi, et al., 2004).

Il midollo osseo (BM) è stato uno dei primi tessuti utilizzati per l'isolamento e la propagazione delle cellule staminali mesenchimali. L'aspirato di midollo osseo è ricco di cellule staminali ematopoietiche e non ematopoietiche, cellule progenitrici endoteliali (EPC) e cellule staminali mesenchimali (MSC). Il midollo viene solitamente raccolto tramite aspirazione dalla cresta iliaca o dallo sterno o dalle fisi delle ossa lunghe, in anestesia generale. Tuttavia, un limite nell'utilizzo in medicina rigenerativa delle BMSC è rappresentato dal fatto che la componente mesenchimale costituisce solo lo 0,001% circa della popolazione cellulare nucleata del midollo osseo. Inoltre, l'esecuzione del prelievo stesso rappresenta comunque un intervento mal tollerato dai pazienti e non privo da rischi (Combi, Gastaldi, & Benazzo, 2011).

Il tessuto adiposo (AD) rappresenta un'ottima alternativa per l'isolamento delle MSCs. Queste sono contenute nella frazione stromale vascolare del tessuto adiposo, rappresentato soprattutto dal grasso sottocutaneo e omentale. Il prelievo avviene tramite lipectomia, generalmente eseguita in anestesia generale, e può essere svolta durante interventi di routine come ad esempio l'ovarioisterectomie in cane e gatto.

Alcuni studi effettuati sull'uomo hanno dimostrato che la resa delle MSC dal midollo osseo (0,001-0,1% di cellule staminali sull'intera popolazione cellulare prelevata, quindi circa $6-60 \times 10^3/\text{ml}$) è drasticamente inferiore rispetto a quelle isolate dal tessuto adiposo (1-10% di resa; quindi circa $5 \times 10^4 - 2 \times 10^5/\text{g}$).

Tuttavia, è importante specificare che il numero di cellule prelevate differisce fortemente a seconda delle caratteristiche del donatore: età, tipo di tessuto adiposo, sesso e metodo di raccolta (Mushahary, Spittler, Kasper, Weber, & Charwat, 2018; Fraser, Zhu, Wulur, & Alfonso, 2008).

La semplice procedura di isolamento, il facile e ripetibile accesso al tessuto adiposo e il maggior numero di MSC fresche derivate da quantità equivalenti di grasso rispetto al midollo osseo, mostrano un chiaro vantaggio nell'utilizzo delle AD-MSC rispetto alle BM-MSC (Guercio, et al., 2012).

1.6.3 Isolamento e coltura delle MSCs

Le MSC vengono isolate in maniera diversa a seconda della fonte da cui vengono prelevate. In matrici come il sangue periferico, il sangue del cordone ombelicale, il liquido amniotico e il midollo osseo si pratica una centrifugazione in gradiente per isolare la frazione di cellule mononucleate (Barrachina, Romero, Zaragoza, Rodellar, & Vázquez, 2018). L'isolamento da fonti "solide", come tessuto adiposo o cordone ombelicale, richiede invece l'utilizzo di procedure di espianto e trattamento enzimatico (Mushahary, Spittler, Kasper, Weber, & Charwat, 2018). Nell'espianto il tessuto viene risciacquato e separato meccanicamente in piccoli pezzi di lunghezza non superiore a qualche millimetro. I frammenti di tessuto vengono quindi posti in recipienti di plastica adatti alla coltura cellulare contenenti un opportuno terreno di crescita. Le MSC crescono a partire dai pezzi di tessuto posti sulla superficie della piastra di coltura che, a loro volta, verranno rimossi diversi giorni dopo (Ghorbani, Jalali, & Varedi, 2014). Nel protocollo enzimatico invece, il tessuto viene tritato grossolanamente per poi essere incubato con una soluzione enzimatica contenente enzimi proteolitici (generalmente collagenasi) al fine di degradare la matrice extracellulare (ECM). In questo modo verranno rilasciate dal tessuto singole cellule o piccoli aggregati cellulari che verranno poi trasferiti in piastre di coltura contenente medium adatto (Mushahary, Spittler, Kasper, Weber, & Charwat, 2018; Kuhbier, et al., 2010).

Dopo l'isolamento, entro pochi giorni, verranno a formarsi delle colonie di cellule che progressivamente ricopriranno il fondo della piastra fino a raggiungere la confluenza.

Dopodiché, le cellule verranno staccate enzimaticamente (solitamente utilizzando tripsina) e piastrate con una densità minore per consentirne la continua proliferazione: questo step viene chiamato “passaggio” e viene ripetuto ogni qual volta le cellule raggiungono la confluenza.

Per far in modo che le MSC conservino le caratteristiche di staminalità, esse vengono utilizzate dopo pochi passaggi, da 2 a 4, per far in modo di mantenere la popolazione cellulare omogenea.

Per l'applicazione clinica, l'uso di MSC oltre il passaggio 6-7 dovrebbe essere evitato, poiché dopo molti passaggi le cellule tenderanno alla senescenza e presenteranno di conseguenza una diminuita proliferazione e morfologie anomale (Barrachina, Romero, Zaragoza, Rodellar, & Vázquez, 2018). Le applicazioni cliniche delle MSC richiedono la loro espansione in vitro, poiché il numero di cellule necessarie per le applicazioni terapeutiche è molto maggiore di quello che può essere isolato dal tessuto stesso.

Pertanto, risulta estremamente rilevante e allo stesso tempo complicato trovare per le MSC delle condizioni di coltura ottimali che includano tipi di substrato, densità di semina cellulare, concentrazioni di O₂ e CO₂ disciolte, pH e temperatura (Mushahary, Spittler, Kasper, Weber, & Charwat, 2018).

1.6.4 Le cellule staminali autologhe e allogeniche

Si parla di trapianto di cellule autologhe quando il paziente stesso è il donatore delle cellule, mentre per trapianto di cellule allogeniche si intende un trapianto in cui le cellule sono prelevate da un donatore sano compatibile. Le applicazioni di cellule staminali mesenchimali autologhe (auto-MSC) presentano alcune importanti limitazioni. Innanzitutto, può risultare difficile in alcuni pazienti ottenere auto-MSC in numero sufficiente: ad esempio può essere un problema isolare AT-MSC da soggetti eccessivamente magri o BM-MSC da soggetti con mielofibrosi. In secondo luogo, le MSC isolate da donatori anziani presentano una ridotta attività biologica, compresa la capacità di differenziazione e di potenziale rigenerativo (Jung, et al., 2014), con conseguenti scarsi risultati nel trattamento.

In terzo luogo, risulta impegnativo ottenere quantità sufficienti di auto-MSC sane e con elevata attività in pazienti affetti da malattie sistemiche, come il diabete (Cianfarani, et al., 2013), l'artrite reumatoide (Sun, et al., 2015) e il lupus eritematoso sistemico (LES) (Nie, Lau, Lie, Chan, & Mok, 2010). Queste patologie alterano le proprietà intrinseche delle MSC, compromettendo fortemente le loro funzioni biologiche. Bisogna altresì considerare il tempo necessario per la preparazione delle auto-MSC, che non avviene in maniera immediata a causa dei tempi legati al prelievo e all'espansione in vitro. La possibilità di ottenere cellule staminali mesenchimali allogeniche (allo- MSC) da giovani donatori in salute risulterebbe un approccio più che ragionevole per risolvere questi problemi (Zhang, et al., 2015).

Le cellule staminali mesenchimali allogeniche presentano quindi vantaggi in termini di tempi, costi e garanzia di qualità, oltre che possedere un basso potere immunogeno. La ridotta espressione di molecole MHC di classe I, la totale mancanza di molecole MHC di classe II e di molecole costimolatorie come CD40, CD80 e CD86 conferiscono un fenotipo a bassa immunogenicità alle allo- MSC (Lohan, et al., 2014). Inoltre, le MSCs hanno la capacità di inibire l'attività di numerose cellule immunitarie compresi i linfociti T, i linfociti B, le cellule dendritiche e le cellule NK (Griffin, et al., 2013; Zhao, et al., 2012). Tuttavia, seppur sia stato ormai appurato che le allo- MSC presentino un'efficacia equivalente alle auto- MSC, alcuni studi hanno riportato casi in cui le allo- MSC causerebbero in realtà una risposta immunitaria (Nauta, et al., 2006).

Questa potenziale risposta immunitaria sarebbe legata ad una memoria immunologica, connessa al funzionamento di cellule memoria specializzate con la capacità di rispondere in modo più rapido ed efficace agli agenti patogeni incontrati in precedenza (Valujskikh & Li, 2007). Ad oggi, data la presenza in letteratura di risultati ambigui e non sempre chiari sull'immunogenicità delle allo- MSCs, soprattutto in vivo, le applicazioni con le auto- MSC vengono generalmente preferite e più facilmente autorizzate (Zhang, et al., 2015).

1.6.5 Meccanismo d'azione e capacità rigenerative delle MSC

1.6.5.1 Il meccanismo di homing nelle MSCs

Le MSC posseggono una capacità definita "di homing": sono in grado di migrare nei siti lesionati, di differenziarsi successivamente in componenti locali dei siti lesi e/o di secernere chemochine, citochine e fattori di crescita utili alla rigenerazione dei tessuti. Vale la pena approfondire cosa intendiamo esattamente per homing, poiché il termine è spesso usato in modo vago in letteratura. Si ritiene che l'homing comprenda sia aspetti non sistemici che sistemici (Ullah, Liu, & Thakor, 2019; Nitzsche, et al., 2017).

L'homing non sistemico riguarda principalmente le applicazioni in distretti tissutali localizzati (lesioni cutanee, lesioni tendinee ed articolari ecc.), in cui avviene il reclutamento di MSC locali o il trapianto di cellule esogene vicino all'area d'interesse. In questo caso la migrazione si basa sull'attivazione e la polarizzazione delle MSC, durante la quale viene a formarsi un polo anteriore.

Questo polo anteriore guida la locomozione interstiziale fino al sito di destinazione grazie al rilevamento delle chemochine rilasciate dal tessuto ferito o infiammato. (Nitzsche, et al., 2017).

L'homing sistemico invece è un processo multifase composto da tre fasi distintive: somministrazione di tipo endovenoso o reclutamento cellulare da siti remoti, con conseguente ingresso nella circolazione sanguigna, a cui seguono lo stravasamento in prossimità della lesione e migrazione interstiziale verso il sito bersaglio. Da notare che l'entrata delle MSC endogene nel sistema circolatorio è un processo attivo che coinvolge a sua volta diversi meccanismi. Le MSC vengono trasferite fino al sito della lesione tramite il sistema vascolare, attraverso un processo guidato dal gradiente delle chemochine. La successiva fase di stravasamento comprende la cattura delle MSC fluenti, il loro rotolamento e l'adesione all'endotelio, seguita da un processo di diapedesi per raggiungere lo spazio perivascolare (in maniera molto simile a come fanno i leucociti). L'arresto a livello di endotelio e la diapedesi sono meccanismi determinati da proteine di membrana proprie delle MSC e da recettori presenti sulla superficie endoteliale (**Fig. 5**) (Ullah, Liu, & Thakor, 2019). Il processo di homing sistemico infine si conclude con una fase di migrazione trans-tissutale e/o interstiziale delle MSC, sempre guidato dal gradiente delle chemochine, direttamente nel sito di lesione (Nitzsche, et al., 2017).

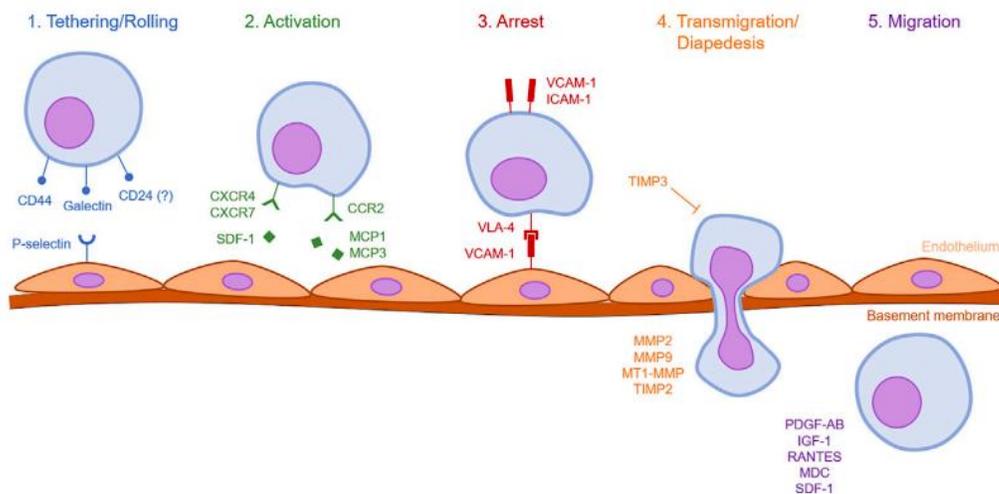


Figura 5: Meccanismo di uscita delle MSCs dal torrente circolatorio in un esempio di homing sistemico (Ullah, Liu, & Thakor, 2019).

Per fare un esempio, le BMSC inizialmente sono state le cellule staminali più utilizzate nella terapia cellulare e nella riparazione dei tessuti. In risposta ai segnali di danno tissutale, le BMSC hanno la capacità di spostarsi dalla loro nicchia nel midollo osseo direttamente nella circolazione periferica, per poi passare attraverso le pareti dei vasi fino a raggiungere i tessuti bersaglio.

Questo processo di rilascio è influenzato sia da fattori chimici (come chemochine, citochine, fattori di crescita) che da fattori meccanici (come le forze emodinamiche applicate alle pareti dei vasi, stress meccanici e l'elasticità della matrice extracellulare). Attualmente si stanno esplorando sempre più sistemi di rilevamento e nuovi modelli animali per poter ottenere un'analisi dettagliata del processo di homing e dell'attecchimento delle MSC in vivo. Nel frattempo, il tracciamento della migrazione delle BMSC trapiantate in vivo viene solitamente ottenuto attraverso sistemi di bioimaging (Fu, et al., 2019).

I fattori che determinano la migrazione, l'homing e la funzionalità delle BMSC sono stati ampiamente studiati e approfonditi. L'asse SDF-1/CXCR4, cioè tra il fattore di derivazione stromale-1 (SDF-1) e il recettore 4 delle chemochine CXC (CXCR4), è fondamentale per indurre l'homing delle BMSC nel sito della lesione e per definire la loro partecipazione alla rigenerazione dei tessuti (Zhang, Li, Zhong, Chen, & Chen, 2021; Ling, et al., 2016).

L'SDF-1 è una piccola molecola appartenente alla famiglia CXC delle chemochine mentre il CXCR4 è un recettore proprio di molti tipi cellulari, incluse le cellule staminali. L'aumento dell'espressione di CXCR4 quindi potrebbe essere una potenziale strategia per migliorare la capacità di migrazione delle BMSC e accelerare l'efficienza di riparazione dei tessuti.

Ancora, l'osteopontina (OPN) è una glicofosfoproteina che viene prodotta in diversi tipi di tessuto, e in molti tipi di cellule. È stato riscontrato che l'OPN è abbondantemente espressa durante i processi infiammatori e di riparazione, oltre a ricoprire un importante ruolo nella mobilitazione cellulare. L'aumento dell'espressione di OPN è correlato all'aumento della capacità di migrazione cellulare e della capacità di sopravvivenza di varie cellule, in particolare è in grado di aumentare la migrazione delle MSC (Fu, et al., 2019; Zou, Song, Luo, Yuan, & Yang, 2011).

I fattori di crescita sono una classe di polipeptidi che regolano la migrazione cellulare, la proliferazione, la differenziazione e la sintesi della matrice extracellulare. Diversi studi hanno evidenziato che i fattori di crescita svolgono un ruolo importante nella migrazione delle MSC. Attualmente, il fattore basale di crescita dei fibroblasti (bFGF), il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), il fattore di crescita degli epatociti (HGF), il fattore di crescita insulino-simile-1 (IGF-1) e il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) sono comunemente coinvolti nel processo di riparazione dei tessuti (Fu, et al., 2019).

Tuttavia è stato dimostrato che numerosi fattori possono influenzare la capacità di homing nel tessuto danneggiato e, di conseguenza, l'efficacia terapeutica dei trattamenti a base di MSCs.

Ad esempio la propagazione in vitro per lunghi periodi di cellule staminali mesenchimali può diminuire drasticamente la loro capacità di homing rispetto a cellule che hanno subito un minor numero di passaggi (Hong, et al., 2019; Rombouts & Ploemacher, 2003); questo fenomeno è legato probabilmente ad un progressivo invecchiamento e differenziazione delle MSCs mantenute in coltura (Sohni & Verfaillie, 2013).

1.6.5.2 L'attività paracrina delle MSCs e il secretoma

La rigenerazione tissutale ad opera delle cellule staminali mesenchimali tramite la loro differenziazione nelle cellule del tessuto danneggiato, è stata originariamente proposta come il principale meccanismo alla base della loro azione terapeutica. Tuttavia, diversi studi hanno dimostrato che questo meccanismo da solo risulta insufficiente a giustificare, quantomeno dal punto di vista quantitativo il processo rigenerativo tissutale. Pertanto, è stato proposto che i fenomeni rigenerativi osservati dopo il trapianto di MSC in modelli sperimentali di danno tissutale, potrebbero essere correlati soprattutto alla secrezione di fattori che agiscono in una modalità paracrina e che vanno a costituire il così detto secretoma (Gnecchi , Danieli , Malpasso, & Ciuffreda, 2016). Il secretoma prodotto dalle MSC è composto da un pool eterogeneo di molecole bioattive, secrete nello spazio extracellulare, composto sia da fattori solubili liberi (includendo citochine, chemochine e fattori di crescita) sia da elementi corpuscolati quali EV ed esosomi (Bari, et al., 2018; Vizoso, Eiro, Cid, Schneider, & Perez-Fernandez, 2017; Vishnubhatla, Corteling, Stevanato, Hicks, & Sinden, 2014).

Questi elementi corpuscolati sono delimitati da un doppio strato fosfolipidico arricchito in proteine e contengono un gran numero di sostanze tra cui: acidi nucleici, enzimi, proteine, fattori immunomodulatori e di crescita, che vengono rilasciate nell'ambiente extracellulare dove esercitano i loro effetti biologici, modulando molteplici vie di segnalazione cellulare.

Le microparticelle prodotte dalle MSC sono EV con diametro dai 100 ai 1000 nm e che si sviluppano a partire dalla membrana plasmatica. Gli esosomi sono i corpuscoli più piccoli con una dimensione che varia dai 30 ai 200 nm, originatisi tramite gemmazione interna di membrane endosomiche tardive chiamate corpi multivescicolari (MVB) (Harrell, et al., 2019; Ferreira, et al., 2018).

Diversi autori nei loro studi hanno utilizzato i cosiddetti media condizionati (CM), costituiti dal terreno di coltura contenente tutte le molecole bioattive e le particelle corpuscolate rilasciate dalle MSC. Queste componenti non sono sempre le stesse, ma variano in funzione di numerosi fattori come il tipo di cellula e il microambiente di coltura (Ferreira, et al., 2018; Maguire, 2013). Pertanto, è necessario comprendere come le condizioni della coltura in vitro possano influenzare il potenziale rigenerativo e immunomodulatore del secretoma delle MSC, con l'obiettivo finale di definire un "cocktail" ottimale per condizionare le MSC per una determinata applicazione terapeutica (Ferreira, et al., 2018).

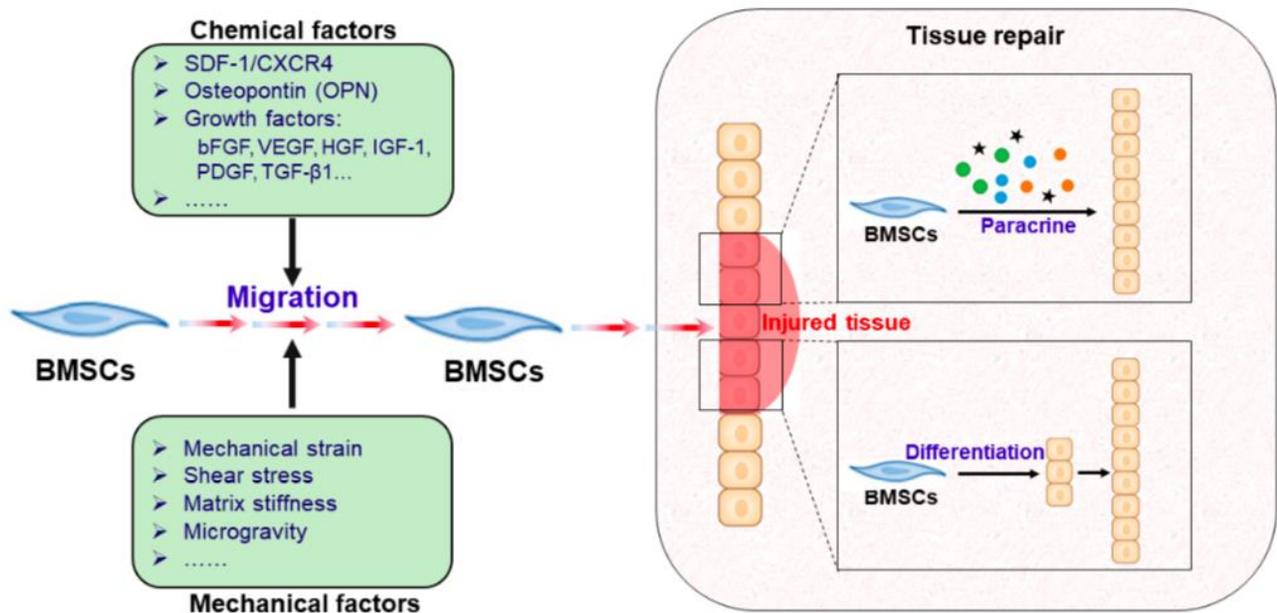


Figura 6: Dopo che le MSC raggiungono la sede di danno tissutale, richiamate da stimoli chimici e meccanici, provvederanno alla guarigione del danno tramite due meccanismi fondamentali: la differenziazione cellulare e/o il meccanismo paracrino (Fu, et al., 2019).

1.7 Il secretoma delle MSCs

1.7.1 Utilità cliniche del secretoma

Il secretoma ha dimostrato effetti terapeutici simili a quelli osservati dopo il trapianto di MSC. Le cellule staminali mesenchimali hanno proprietà rigenerative e immunoregolatorie, e nonostante numerosi studi dimostrino l'efficacia del loro utilizzo in applicazioni cliniche, esse presentano comunque dei limiti in termini di disponibilità, sicurezza e variabilità della risposta terapeutica (Eleuteri & Fierabracci, 2019). I risultati riscontrabili in letteratura suggeriscono che la somministrazione di secretomi derivati da MSC presentano numerosi vantaggi, rappresentando quindi un nuovo approccio terapeutico "cell-free" per l'attenuazione di malattie infiammatorie e degenerative (Harrell, et al., 2019).

Le questioni di sicurezza, riguardanti soprattutto la differenziazione indesiderata delle MSC trapiantate, è oggetto di dibattito soprattutto per quanto riguarda gli effetti a lungo termine (Harrell, et al., 2019). Ad esempio, sono state evidenziate la presenza di aree incapsulate calcificate in zone cardiache colpite da infarto dopo il trattamento con cellule staminali mesenchimali (Gazdic, Volarevic, Arsenijevic, & Stojkovic, 2015). Ancora, in soggetti con degenerazione della macula trattati con MSC derivate da tessuto adiposo (AT-MSC) sono stati registrati problemi come distacco della retina e sanguinamento intraoculare (Kuriyan, et al., 2017).

Inoltre, le MSC allogeniche potrebbero rappresentare un veicolo per alcuni patogeni come l'Herpesvirus (HSV) e il Cytomegalovirus (CMV), rivelandosi una possibile fonte di infezione per il paziente trattato (Meisel, et al., 2014; Pessina, et al., 2009).

Un altro problema degno di nota è legato alla mancanza di parametri di standardizzazione, come la definizione di un numero ottimale di MSC da utilizzare con l'obiettivo di trovare il giusto equilibrio tra sicurezza ed efficacia della terapia (Harrell, et al., 2019).

L'utilizzo di MSC autologhe può essere complicato nel trattamento di malattie acute a causa del lungo periodo di espansione delle cellule in vitro, mentre l'utilizzo di MSC allogeniche, per quanto diversi studi testimoniano la loro bassa immunogenicità (Gazdic, Volarevic, Arsenijevic, & Stojkovic, 2015), potrebbero rappresentare un rischio legato eventualmente a reazioni immunitarie e infiammatorie nel ricevente (Harrell, et al., 2019).

Le terapie a base di secretoma in medicina rigenerativa presentano quindi diversi vantaggi rispetto all'utilizzo diretto delle MSC. In primo luogo risolverebbe problemi riguardanti la disponibilità, in quanto i tempi e i costi di espansione e mantenimento delle cellule staminali in coltura verrebbero notevolmente ridotti e risulterebbe più pratico nell'applicazione clinica, poiché permetterebbe di evitare procedure invasive di raccolta cellulare (Vizoso, Eiro, Cid, Schneider, & Perez-Fernandez, 2017). Inoltre, l'applicazione del secretoma risolverebbe eventuali problemi di sicurezza potenzialmente associati all'impianto di una popolazione cellulare attiva proliferante, e quindi a problemi riguardanti possibili reazioni immunitarie, il differenziamento incontrollato e la trasmissione di infezioni.

1.7.2 Le proprietà immunomodulanti del secretoma

È stato ampiamente dimostrato che il secretoma delle MSC ha la capacità di promuovere la rigenerazione tissutale, la neo-angiogenesi e di mediare potenti effetti immunosoppressori e immunoregolatori su un gran numero di tipi cellulari appartenenti sia all'immunità adattativa che innata (Marigo & Dazzi, 2011). Ad esempio determinanti risultano essere alcune molecole solubili come: il TGF- β , il fattore di crescita epatico HGF, l'indoleamina 2,3-diossigenasi-1 (IDO-1), l'interleuchina 10 (IL-10) e la prostaglandina E2 (PGE2) (Vizoso, Eiro, Cid, Schneider, & Perez-Fernandez, 2017; Gazdic, Volarevic, Arsenijevic, & Stojkovic, 2015; Maguire, 2013). L'HGF agisce sinergicamente insieme al TGF- β per indurre l'apoptosi delle cellule mononucleate attivate nel sangue periferico (Harrell, et al., 2018; Di Nicola, et al., 2002) mentre un'azione simile viene svolta dall'IDO-1, in particolar modo contro la proliferazione dei linfociti T attivati (Chen, et al., 2016; Gazdic, Volarevic, Arsenijevic, & Stojkovic, 2015).

Gli effetti sui linfociti T sono i più studiati e caratterizzati: le MSC sopprimono in modo aspecifico i linfociti T CD4+ e CD8+ (Krampera, et al., 2003) inducendo l'arresto del ciclo cellulare in fase G1 attraverso l'inibizione dell'espressione della ciclina D2 (Glennie, Soiero, Dyson, Lam, & Dazzi, 2005). Oltre all'effetto sui linfociti T, le MSC modulano anche la funzione dei linfociti B (Wang, Yuan, & Xie, 2018). In uno studio, Deng e colleghi hanno riportato dopo la somministrazione di MSC allogene in topi BXSb (un modello sperimentale di lupus eritematoso sistemico) un'inibizione in vivo dell'attivazione della proliferazione e della secrezione di IgG da parte dei linfociti B nei soggetti trattati (Deng, et al., 2005).

Ancora, le MSC possono modulare l'attività delle cellule natural killer (NK), i principali effettori dell'immunità innata grazie all'azione della PGE2 e del TGF- β . Le cellule NK svolgono un ruolo chiave nell'eliminazione delle cellule infettate da virus e delle cellule tumorali mediante il rilascio di sostanze che determinano lisi cellulare (Moretti, 2002). Sebbene le MSC sopprimano la proliferazione delle cellule NK determinata solitamente dall'IL-2 o dall'IL-15, non inibiscono l'attività citotossica delle cellule NK appena isolate. Tuttavia, la produzione di citochine quali IFN- γ , IL-10 e TNF- α da parte delle cellule NK si riduce in presenza di MSC (Sotiropoulou, Perez, Gritzapis, Baxevanis, & Papamichail, 2006).

Recenti studi hanno suggerito che l'immunosoppressione mediata dalle MSC non è solo correlata ad un'azione diretta sulle cellule immunitarie, ma può derivare anche dal reclutamento di altre popolazioni di cellule immunoregolatrici come di linfociti T con fenotipo regolatorio (Di Ianni, et al., 2008).

È stato osservato che MSC coltivate in presenza di TNF- α e IFN- γ stimolano la secrezione di un numero elevato di mediatori antiinfiammatori, inclusa l'IL-10 (Harting, et al., 2018).

Tuttavia le MSC non sono costitutivamente immunosoppressive, ma alterano il loro profilo secretorio e le caratteristiche immunomodulatorie a seconda dell'ambiente a cui sono esposte. In presenza di una bassa concentrazione di IFN- γ e TNF- α , le MSC otterranno un fenotipo proinfiammatorio, producendo grandi quantità di citochine e chemochine infiammatorie che stimoleranno l'attivazione e la migrazione delle cellule immunitarie nei tessuti. Al contrario, quando le MSC sono esposte ad alti livelli di citochine infiammatorie, adotteranno un fenotipo antinfiammatorio, secernendo fattori immunosoppressivi che inibiranno la generazione di macrofagi infiammatori, la maturazione e la funzione di cellule presentanti l'antigene, le funzioni effettrici dei linfociti T helper 1 (Th1 CD4+), dei linfociti T helper 17 (Th17 CD4+), dei linfociti T citotossici (CD8+) e delle cellule NK (Gazdic, Volarevic, Arsenijevic, & Stojkovic, 2015). In linea con questi risultati, l'esposizione delle MSC ad IFN- γ e TNF- α in coltura dovrebbe essere utilizzato per promuovere la formazione di esosomi con proprietà immunosoppressive, le quali potrebbero avere migliori effetti terapeutici nel trattamento delle malattie autoimmuni e infiammatorie (Harrell, et al., 2019).

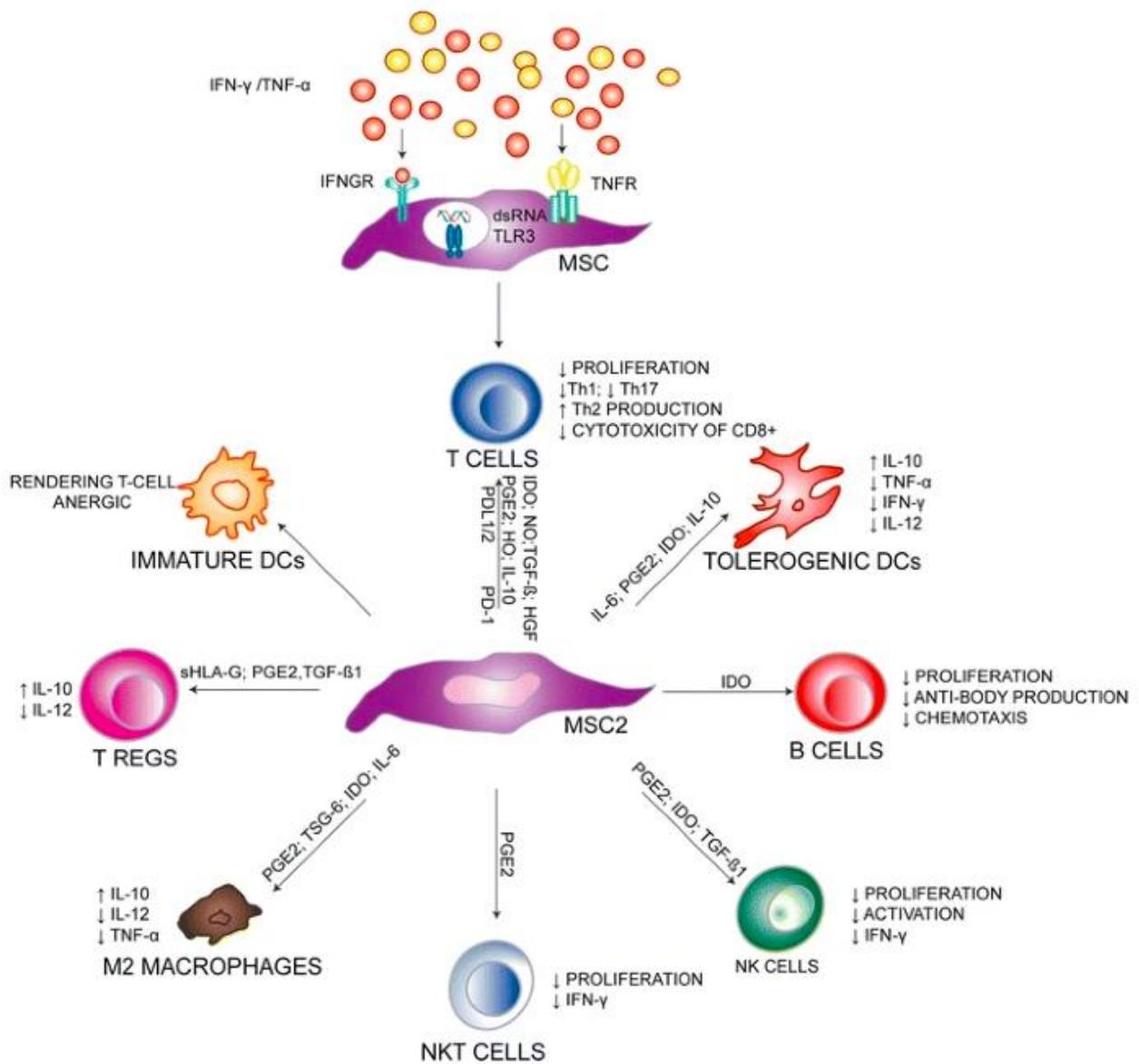


Figura 7: Le molecole ad azione immunomodulante presenti all'interno del secretoma sono numerose e comprendono sia citochine ad azione proinfiammatorie che citochine ad azione antiinfiammatorie, e l'equilibrio tra questi ne determina l'effetto finale (Gazdic, Volarevic, Arsenijevic, & Stojkovic, 2015).

1.7.3 Il ruolo del secretoma delle MSC nella riparazione e rigenerazione dei tessuti

Il secretoma delle MSC (MSC-CM) contiene diversi fattori di crescita che promuovono la riparazione e la rigenerazione dei tessuti, la guarigione delle ferite e la neo-angiogenesi. Tra i diversi fattori stimolanti l'angiogenesi sono riconosciuti il VEGF, il bFGF, il TGF- β , il PDGF e l'HGF che hanno dimostrato effetti benefici nel trattamento di patologie ischemiche (Tao, Han, Han, & Li, 2016). Il MSC-CM contiene inoltre fattori anti-angiogenici come l'inibitore tissutale delle metalloproteasi-1 (TIMP-1) (Zanotti, et al., 2016). Tutti questi dati indicano che i vari fattori presenti all'interno del MSC-CM rappresentano un cocktail equilibrato di sostanze che agiscono con il fine di regolare al meglio il processo di angiogenesi. È importante sottolineare che la presenza di fattori pro e anti-angiogenici è regolata dal microambiente in cui sono state esposte le MSC. Quando queste vengono coltivate in presenza di un'elevata concentrazione di citochine proinfiammatorie, iniziano a produrre molecole ad azione anti-angiogenica al fine di ridurre la migrazione dei leucociti circolanti nella sede infiammata (Vizoso, Eiro, Cid, Schneider, & Perez-Fernandez, 2017).

Il MSC-CM svolge un importante ruolo anche nella guarigione delle ferite, migliorando le capacità proliferative e migratorie di vari tipi di cellule della cute, come fibroblasti, cheratinociti e cellule epiteliali vascolari, accelerando in questo modo la contrazione della ferita (Park, et al., 2018). Oh et al. hanno dimostrato che la somministrazione endovenosa di MSC aumenta notevolmente i livelli di TGF- β 1 e VEGF, importanti citochine coinvolte nella guarigione delle ferite da ustione (Oh, et al., 2018; Hocking, 2012). L'HGF contenuto all'interno del MSC-CM si è dimostrato un fattore determinante nei processi di rigenerazione conseguenti a danno epatico (Zagoura, et al., 2012). Inoltre, le terapie a base di secretoma hanno la capacità di regolare la morte cellulare, riducendo significativamente l'espressione di proteine pro-apoptotiche (Bax e caspasi-3) e aumentando l'espressione di proteine antiapoptotiche (Bcl-2), prevenendo in questa maniera la perdita di cellule tissutali durante il processo infiammatorio (Vizoso, Eiro, Cid, Schneider, & Perez-Fernandez, 2017). In un modello animale (ratto) di ischemia da occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAO), Wakabayashi et al. hanno rilevato a seguito della somministrazione per via endovenosa di MSC umane, una riduzione del danno ischemico.

È stato inoltre registrato un miglioramento funzionale ed una riduzione del volume dell'infarto grazie alla presenza di IGF-1 e all'induzione di fattori neurotrofici come VEGF, EGF e bFGF nell'encefalo dell'ospite (Wakabayashi, et al., 2010). Ancora, dopo un infarto miocardico, le BMSC di ratto secernono fattori paracrini (TGF- β , FGF-2, angiopoietina-2, VEGF-1) utili per innescare effetti angiogenici e favorire la guarigione del miocardio migliorando la funzione cardiaca (Selvasandran, et al., 2018). La gamma di potenziali meccanismi terapeutici mediati dal prodotto di secrezione delle MSC, spazia dalla citoprotezione e riparazione dei tessuti, alla neovascolarizzazione e agli effetti antinfiammatori e antifibrotici (Gnecchi, Danieli, Malpasso, & Ciuffreda, 2016).

La prospettiva futura, basata sul favorire la riparazione dei tessuti danneggiati utilizzando i fattori paracrini invece delle cellule intere, introduce un nuovo possibile utilizzo delle MSC nella medicina rigenerativa (Fu, et al., 2019).

1.7.4 Il liosecretoma come prodotto farmaceutico

In letteratura sono stati definiti diversi metodi per isolare l'intero secretoma o la frazione di EVs prodotte dalle MSCs, come la cromatografia ad esclusione molecolare (SEC) o l'ultracentrifugazione (UC) (Bari, et al., 2018). Tuttavia, queste procedure presentano alcuni limiti che non le rendono adatte alla produzione industriale, oltre al fatto che le EVs durante il processo di isolamento possono andare incontro ad aggregazione o a rottura a causa delle forti pressioni a cui sono sottoposte. Per questi motivi la mancanza di un processo di isolamento standardizzato causa incertezza sulla composizione e di conseguenza sugli effetti biologici del secretoma, la cui produzione sembra fortemente influenzata dal metodo di preparazione (Lötvall, et al., 2014; Zhou, et al., 2006). Fondamentale risulta quindi la definizione di un processo di produzione validato e conforme alle buone pratiche di produzione (Good Manufacturing Practice, GMP), che consenta di ottenere prodotti standardizzati adatti per applicazioni in campo terapeutico.

Dopodiché sarebbe necessaria una caratterizzazione molecolare del secretoma ottenuto nel rispetto dei requisiti normativi e per confermare la riproducibilità del metodo utilizzato (Bari, et al., 2018).

Partendo da queste premesse, Bari e colleghi (Bari, et al., 2018) hanno descritto una procedura innovativa per la produzione su larga scala di liosecretoma conforme alle GMP, combinando l'ultrafiltrazione e la liofilizzazione. Il prodotto finale si presenta come un liofilizzato pronto all'uso, ottenuto a partire da AT-MSC umane potenzialmente adatto a sostituire o a coadiuvare le cellule staminali in protocolli terapeutici di medicina rigenerativa (Bari, et al., 2018).

Per quanto riguarda l'ambito veterinario, Mocchi e colleghi hanno descritto la preparazione e la caratterizzazione di un secretoma liofilizzato ottenuto da AT-MSC equine per la terapia di disturbi muscoloscheletrici, tipici in questa specie. Nello studio viene descritto il processo di produzione di una polvere farmaceutica da applicarsi mediante iniezione. Questa forma di liosecretoma, che viene prodotta in una struttura per la produzione di medicinali ad uso clinico veterinario, è stata validata per applicazioni terapeutiche (Mocchi, et al., 2021).

1.7.4.1 Procedura di produzione del liosecretoma mediante processo validato e conforme alle GMP

Nello studio di Bari e colleghi viene descritta la procedura di preparazione del liosecretoma, effettuata a partire da AT-MSC umane prelevate da diversi donatori. Questi prima della procedura hanno sottoscritto un consenso informato approvato dal Comitato Etico dell'ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda (Milano), in accordo con la Dichiarazione di Helsinki. Tutti i passaggi produttivi sono stati eseguiti rispettando i principi delle GMP e, nello specifico, tutte le procedure sono state eseguite in condizioni asettiche in una camera bianca di grado B da operatori dotati di indumenti protettivi e monouso. Sia il processo di coltura cellulare che quello per l'ottenimento del lio-secretoma hanno seguito un protocollo di qualificazione/convalida, considerando anche strumenti, forniture, reagenti e definendo ruoli e responsabilità per ogni fase (Bari, et al., 2018).

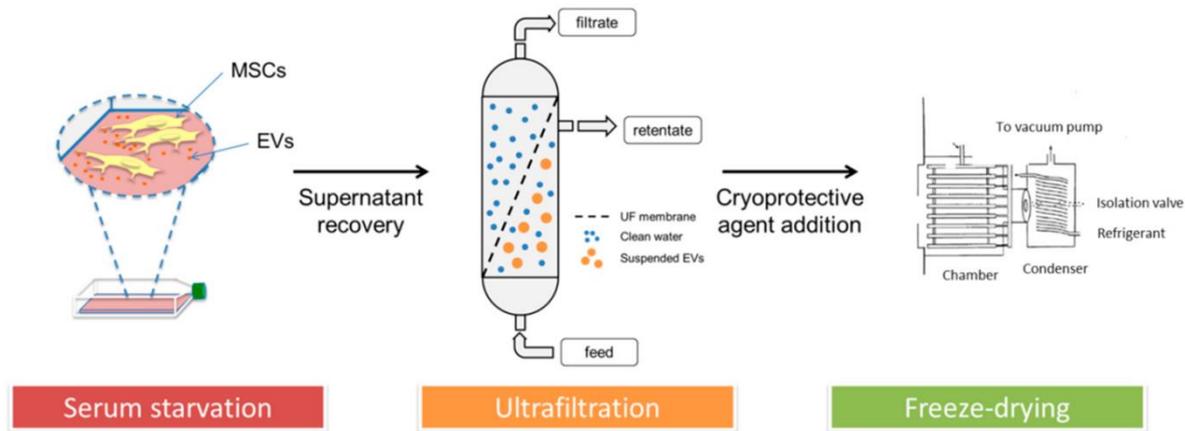


Figura 8: Processo di produzione del liosecretoma (Bari, et al., 2018).

Il primo passaggio consiste nella preparazione delle cellule staminali partendo dal tessuto adiposo dei donatori. Questo viene trattato in modo da recuperare la frazione vascolare stromale, che verrà poi messa in coltura in un terreno con DMEM F12, siero fetale bovino (FBS) e antibiotici. Le AT-MSCs una volta raggiunta la sub-confluenza nelle piastre, vengono coltivate in medium senza siero per indurre la produzione del secretoma (Perteghella, et al., 2017; Merino, Hoogduijn, Borrás, & Franquesa, 2014). Successivamente si procede con la raccolta del medium condizionato, che verrà centrifugato per eliminare i residui cellulari di più grandi dimensioni, inclusi i corpi apoptotici.

Il surnatante ottenuto viene purificato mediante ultrafiltrazione tramite il sistema KrosFlo® Research 2i (Spectrum Laboratories, Milano), che determina la concentrazione sia delle vescicole che dei componenti proteici, escludendo i peptidi a più basso peso molecolare. Dopodiché al secretoma purificato viene aggiunto un crioprotettore, solitamente rappresentato dal mannitolo. Il preparato viene congelato a -80° e infine liofilizzato applicando una pressione negativa di 8×10^{-1} mbar a -50° C per 72 h. Il liosecretoma così ottenuto può essere conservato a -20° fino al momento dell'utilizzo. Alla fine del processo di liofilizzazione verrà determinata la resa di produzione e calcolato l'equivalente in cellule per ogni mg di liosecretoma, dividendo il numero totale di cellule usate per la produzione per i milligrammi di liosecretoma ottenuti (Bari, et al., 2018).

1.7.4.2 Caratterizzazione chimico-fisica e molecolare del liosecretoma

È necessario eseguire una caratterizzazione fisico-chimica e molecolare del secretoma per valutare la qualità farmacologica del prodotto finale. Una prima determinazione riguarda il contenuto delle proteine totali e quello dei fosfolipidi. Il contenuto proteico totale viene determinato utilizzando il kit “micro BCA-Protein Assay Kit”, mentre il contenuto fosfolipidico è quantificato tramite “Nile red assay” (Mocchi, et al., 2021; Bari, et al., 2018). Per valutare l'integrità delle particelle del liosecretoma si determina la PSD (Particle Size Distribution) mediante l'analisi di tracciamento delle nanoparticelle (NTA). L'ultrastruttura delle EVs e la morfologia del liosecretoma sono valutate per ogni lotto mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM) e microscopia elettronica a scansione (SEM). La FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) è utilizzata per confermare la presenza contemporanea delle EVs e delle componenti solubili all'interno del liosecretoma (Bari, et al., 2018).

1.7.4.3 Sicurezza ed efficacia del liosecretoma

I pochi studi clinici sperimentali condotti utilizzando il secretoma delle MSC non hanno riportato particolari effetti avversi. Ad esempio i risultati di uno studio in vivo, riguardante la somministrazione intrarticolare di liosecretoma allogenico in cani affetti da osteoartrite, non ha riportato nessuna risposta avversa al trattamento (Mocchi, et al., 2021).

Inoltre, poiché nelle applicazioni cliniche la via di somministrazione preferenziale è rappresentata dall'iniezione endovenosa, nello studio di Bari e colleghi sono state effettuate diverse prove in vitro con il fine di testare la citocompatibilità nei confronti delle cellule del sangue, oltre a prove di citocompatibilità su tre diverse linee cellulari (fibroblasti, condrociti e cellule del nucleo polposo umane) (Bari, et al., 2018). Per quanto riguarda le prove di efficacia, è stata valutata la capacità del liosecretoma di proteggere le cellule dei tessuti dal danno ossidativo, spesso correlato alla risposta infiammatoria e determinante nella fisiopatologia di diverse malattie (Sinha & Dabla, 2015). Quest'attività è sostenuta dall'analisi proteomica effettuata da Bari e colleghi, grazie alla quale è stato possibile rilevare tra le proteine presenti nel liosecretoma tre forme dell'enzima superossido dismutasi (SOD1, SOD2 e SOD 3), coinvolti nella risposta allo stress ossidativo (Bari, et al., 2018).

Inoltre, i risultati dello studio condotto da Mocchi e colleghi suggeriscono il ruolo terapeutico di molte proteine presenti nel secretoma equino, tra cui quelle della famiglia SLRP (proteoglicani ricchi di leucina), che intervengono nei processi rigenerativi dei tessuti muscoloscheletrici e nella guarigione delle ferite (Mocchi, et al., 2021).

2. OBIETTIVO DELLA TESI

Il crescente interesse nei confronti di nuove formulazioni terapeutiche a base di secretoma derivato dalle MSCs, suggerisce che il suo utilizzo possa rappresentare un'ulteriore strumento nell'ambito della terapia cellulare. Diversi studi sia in vitro che in vivo hanno evidenziato gli effetti che il secretoma, inteso come l'insieme delle molecole bioattive rilasciate nello spazio extracellulare, presenta nell'ambito della rigenerazione tissutale.

A tal proposito, Bari e colleghi hanno presentato un metodo innovativo per la produzione su larga scala del liosecretoma (Bari, et al., 2018). Quest'ultimo è un prodotto farmaceutico a base di secretoma derivato da AT-MSCs in forma liofilizzata e pronto all'uso, potenzialmente in grado, quindi, di rimpiazzare o coadiuvare le terapie a base di cellule staminali nel campo della medicina rigenerativa.

La normale guarigione delle ferite è un processo dinamico e complesso che coinvolge una serie di risposte coordinate volte a riparare il tessuto danneggiato. In generale, questo processo di riparazione può essere suddiviso in cinque fasi principali: emostasi, infiammazione, granulazione e angiogenesi, riepitelizzazione se si considerano lesioni cutanee, e rimodellamento tissutale. È fondamentale notare che le MSC sono coinvolte, a vari livelli, in tutte e cinque le fasi descritte. Diversi studi hanno riportato che le MSC e le vescicole extracellulari (EV) da esse prodotte promuovono la coagulazione grazie all'alto contenuto di fosfatidilserina e di fattore tissutale (TF) presenti sulla loro superficie (Guillamat-Prats, 2021; Chance, et al., 2019). Lo studio condotto da Chance e colleghi evidenzia la natura trombogenica delle EV, in quanto queste determinano un aumento della trombina, riducono i tempi di attivazione della trombina e facilitano la formazione del coagulo (Chance, et al., 2019).

Lo scopo del presente lavoro di tesi è quello di andare a definire in modo "quantitativo", attraverso misure turbidimetriche, gli effetti determinati dal liosecretoma sulla via intrinseca della coagulazione del sangue.

La misura turbidimetrica in questo lavoro di tesi è ottenuta analizzando l'assorbimento della luce di campioni di plasma sanguigno in cui viene indotto il processo coagulativo mediante aggiunta di ioni calcio. Poiché durante la coagulazione si produce una rete di fibrina insolubile che rende opaco il campione attraversato dalla luce, la variazione dell'assorbanza del medesimo, determinata nell'ambito dell'intervallo di linearità della legge di Lambert Beer, permette di valutare la cinetica di formazione del coagulo.

La turbidimetria è una tecnica ampiamente utilizzata, in quanto non necessita di procedure complesse, non richiede particolari trattamenti del campione e utilizza apparecchiature comunemente presenti all'interno dei laboratori, come i colorimetri utilizzati per le analisi di tipo clinico di campioni posti in piastre di polistirene "multiwell". Questa tecnica tuttavia non è in grado di fornire nessuna informazione diretta sulla struttura della fibrina o sulla forza del coagulo. Inoltre, con questa tecnica non è possibile valutare la coagulazione nel sangue intero a causa della ricca componente cellulare di cui è costituito, in particolar modo dai globuli rossi, che a causa dell'elevato contenuto di emoglobina assorbono luce per l'intero intervallo di lunghezze d'onda utilizzato per le misure turbidimetriche. (Zeng, Fagnon, Chakravarthula, & Alves, 2020).

Questa tesi è stata realizzata nell'ambito di una collaborazione scientifica tra la Sezione di Biochimica del Dipartimento Di Scienze Medico Veterinarie dell'Università di Parma, il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università del Piemonte Orientale di Novara e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sede di Brescia, relativa ad un progetto sullo sviluppo e l'impiego terapeutico del Liosecretoma da MSC di cane e cavallo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Prelievi ematici

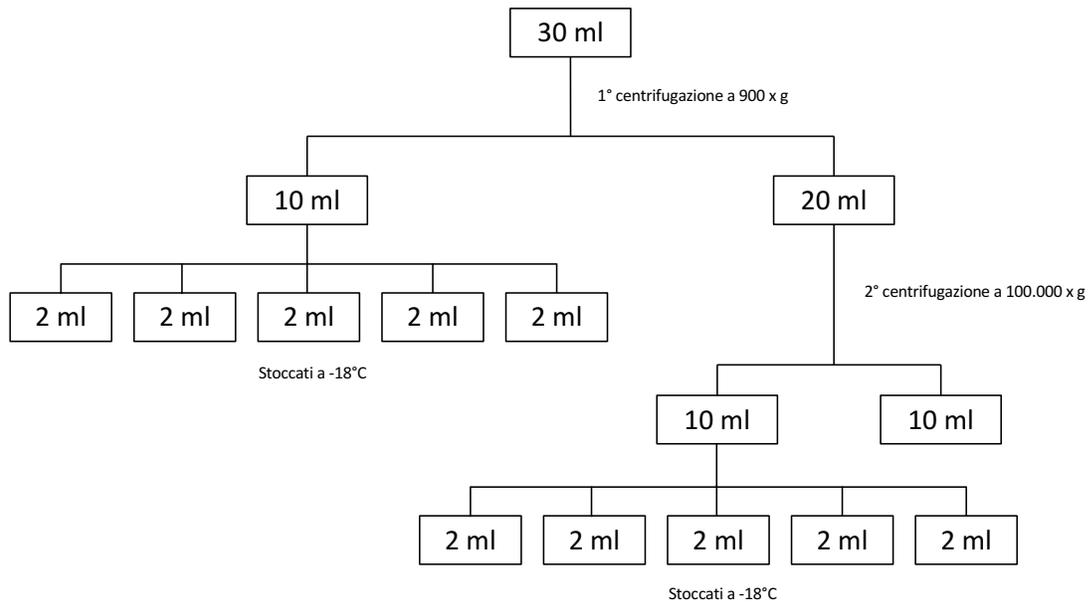
Per questo elaborato di tesi sono state utilizzate rimanenze di PPP congelato di pazienti di specie equina e canina di proprietà, ricoverati o sottoposti a visite cliniche presso l'OVUD (ospedale veterinario universitario didattico) del Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie dell'Università di Parma, e pazienti di Medici Veterinari liberi professionisti risalenti al biennio 2022/2023.

I soggetti in esame sono stati sottoposti a prelievi ematici per indagini cliniche o per la preparazione di PRP, LP e PPP utilizzati per trattamenti terapeutici di medicina rigenerativa. I proprietari degli animali hanno sottoscritto un consenso informato e la sperimentazione è stata approvata dall'OPBA (Organismo preposto al benessere degli animali) dell'Università degli studi di Parma.

3.2 Preparazione del plasma

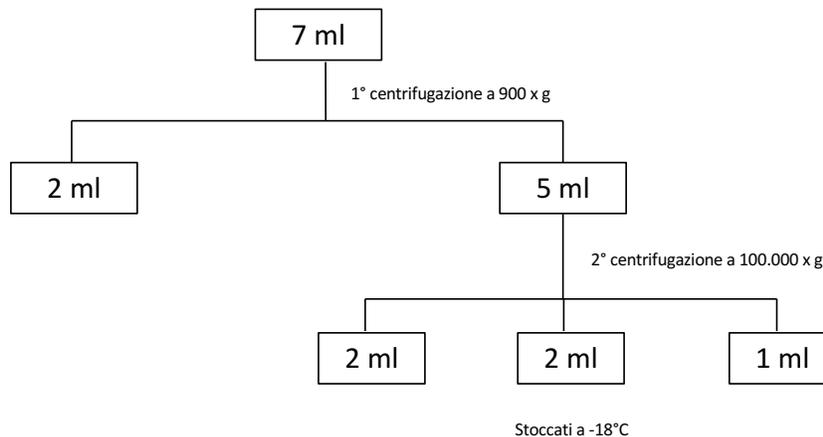
Sono stati prelevati 30 ml da ciascun campione di PPP scongelato equino. Dopodiché ogni campione è stato sottoposto a due diverse centrifugazioni: la prima a 900 x g per 15 minuti, al fine di eliminare eventuali macroparticoli legati allo scongelamento e la seconda un'ultracentrifugazione a 100.000x g per 60 minuti, con lo scopo di rimuovere il più possibile le poche piastrine rimaste e le vescicole extracellulari presenti nel plasma.

Dopo ogni centrifugazione il surnatante è stato suddiviso in diverse aliquote secondo il seguente schema:



Il campione da 10 ml di ultracentrifugato, ottenuto in seguito alla seconda centrifugazione, è stato suddiviso in aliquote e successivamente stoccato a -18°. Nel presente studio si è preferito utilizzare gli ultracentrifugati del plasma per ridurre al minimo la presenza di piastrine e di EV fisiologicamente presenti al suo interno, in modo tale da evidenziare il più possibile gli effetti legati al secretoma sulla coagulazione del plasma.

Avendo a disposizione, per ogni animale, un quantitativo ridotto di PPP canino rispetto a quello equino, è risultato necessario processarlo e suddividerlo in maniera differente:



Poiché il plasma di cane presenta una maggiore torbidità dopo lo scongelamento, la prima centrifugazione è stata eseguita a 14.000 x g per 5 minuti, mentre la seconda centrifugazione a 50.000 x g per 60 minuti. Tutte le aliquote ottenute alla fine di ogni centrifugazione sono state nuovamente congelate a -18° prima dell'utilizzo. A causa del ridotto volume di campione a disposizione, non è stato possibile raggiungere la quantità minima necessaria per poter effettuare un'ultracentrifugazione a 100.000 x g come per il PPP di cavallo, per cui si è utilizzata una centrifuga preparativa in cui i campioni sono stati sottoposti ad un massimo di 50.0000 campi gravitazionali.

3.3 Preparazione del liosecretoma

I lotti di liosecretoma canino ed equino utilizzati nel presente elaborato sono stati prodotti presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER) con sede a Brescia, seguendo il protocollo di produzione approvato dal Ministero della Salute (Prot. n. 0000778 del 15/01/2020 7.1.2.0.0/17/2019-AGD 809).

Le MSC di derivazione adiposa da cui è stato prodotto il liosecretoma sono state ottenute dalla Biobanca dell'IZSLER, sede di Brescia. Per ciascun lotto di Liosecretoma sono state valutate le proprietà fisico-chimiche, dosate le proteine totali, i lipidi, e determinate le dimensioni e le concentrazioni degli EV secondo le procedure descritte in precedenza.

Per il presente studio si sono avute a disposizione sia fiale contenenti liosecretoma, sia fiale del solo tampone liofilizzato che è stato utilizzato negli esperimenti come controllo negativo.

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando diluizioni scalari di liosecretoma concentrato 10 volte rispetto alla dose terapeutica (ricostituito in 200 µl di acqua distillata, contenente il Liosecretoma ottenuto da 1.000.000 di MSC), risospese nello stesso tampone di liofilizzazione ricostituito in acqua distillata:

N°	Diluizione	Tampone 1X (µl)	Liosecretoma 10X (µl)
0	Non diluita	0	100
1	1:3	40	20
2	1:9	40	20
3	1:27	40	20
4	1:81	40	20
5	1:243	40	20
6	1:729	40	20
7	∞	40	0

Durante i primi esperimenti si sono utilizzate come controllo negativo diluizioni scalari della soluzione tampone concentrato 10 volte:

N°	Diluizione	Tampone 1X (μ l)	Tampone 10X (μ l)
0	Non diluita	0	100
1	1:3	40	20
2	1:9	40	20
3	1:27	40	20
4	1:81	40	20
5	1:243	40	20
6	1:729	40	20
7	∞	40	0

Aliquote di ciascuna diluizione del liosecretoma, pari a un decimo del volume finale (12 μ l), sono state poste nei pozzetti di una piastra multiwell a cui successivamente sono stati aggiunti i campioni di plasma (108 μ l). La stessa procedura è stata ripetuta con le diluizioni della soluzione tampone come controllo negativo.

3.4 Prove di coagulazione

Nel presente lavoro di tesi gli esperimenti sulla coagulazione sono stati realizzati in piastre "multiwell" di polistirene da 96 pozzetti valutando lo sviluppo di torbidità che si determina quando, con la trasformazione del fibrinogeno in fibrina, il plasma passa dallo stato liquido a quello di gel.

La torbidità è stata valutata misurando l'assorbanza della sospensione ad una lunghezza d'onda di 540 nm, con un lettore di piastre multiwell da 96 pozzetti 'Victor Nivo' della ditta Perkin Elmer. Tutte le cinetiche di coagulazione sono state realizzate alla temperatura di 37°C.

Poiché il plasma utilizzato conteneva citrato di sodio come agente anticoagulante, in tutti gli esperimenti la coagulazione è stata indotta aggiungendo in ogni campione un'aliquota, pari ad un decimo del volume iniziale, di acqua distillata contenente 0,2 M di CaCl_2 . Per assicurarsi che il tampone di liofilizzato non contenesse sostanze che potessero attivare la coagulazione, in ogni esperimento sono state eseguite delle prove senza l'aggiunta del CaCl_2 al plasma.

4. RISULTATI

4.1 Coagulazione dei derivati del plasma sanguigno

Le figure 9 e 10 riportano rispettivamente un esempio di cinetica di coagulazione di un campione di PPP di cavallo e di un campione di PPP di cane, definite attraverso misure turbidimetriche:

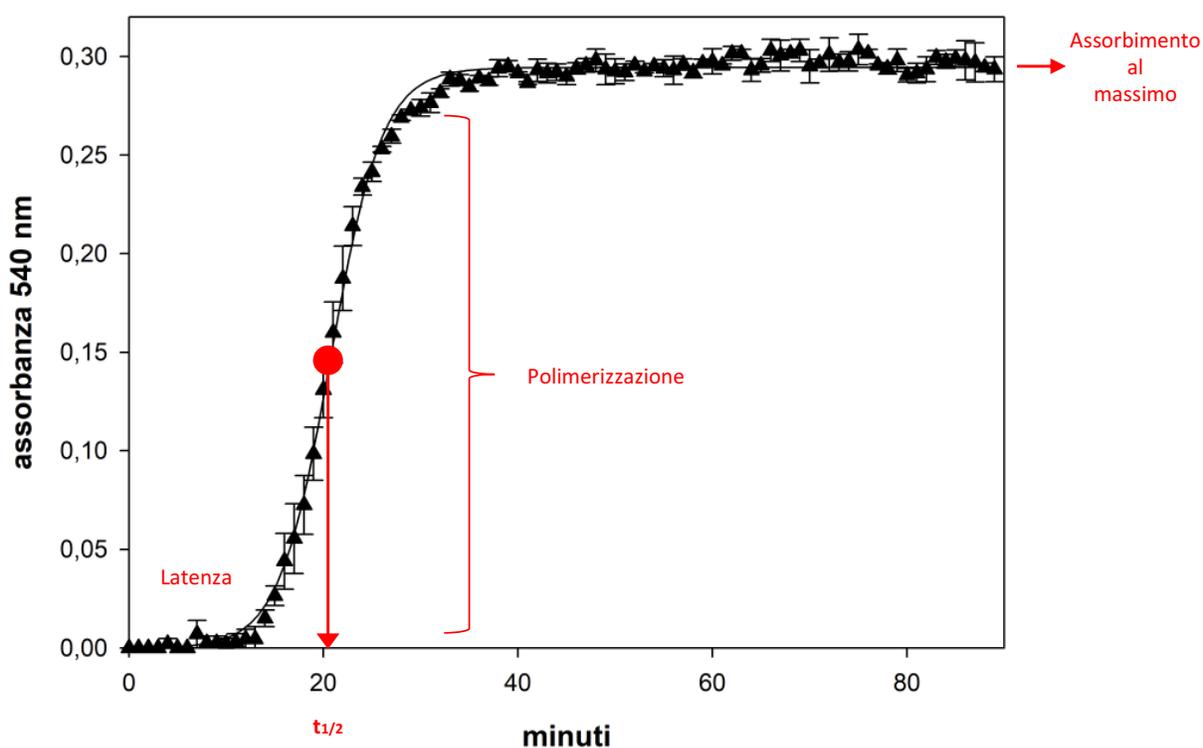


Figura 9: cinetica di coagulazione di un campione di PPP di cavallo scongelato. I punti esprimono le medie dei valori di assorbanza di due repliche. Le barre d'errore indicano le deviazioni standard risultanti dai valori delle repliche dei vari campioni.

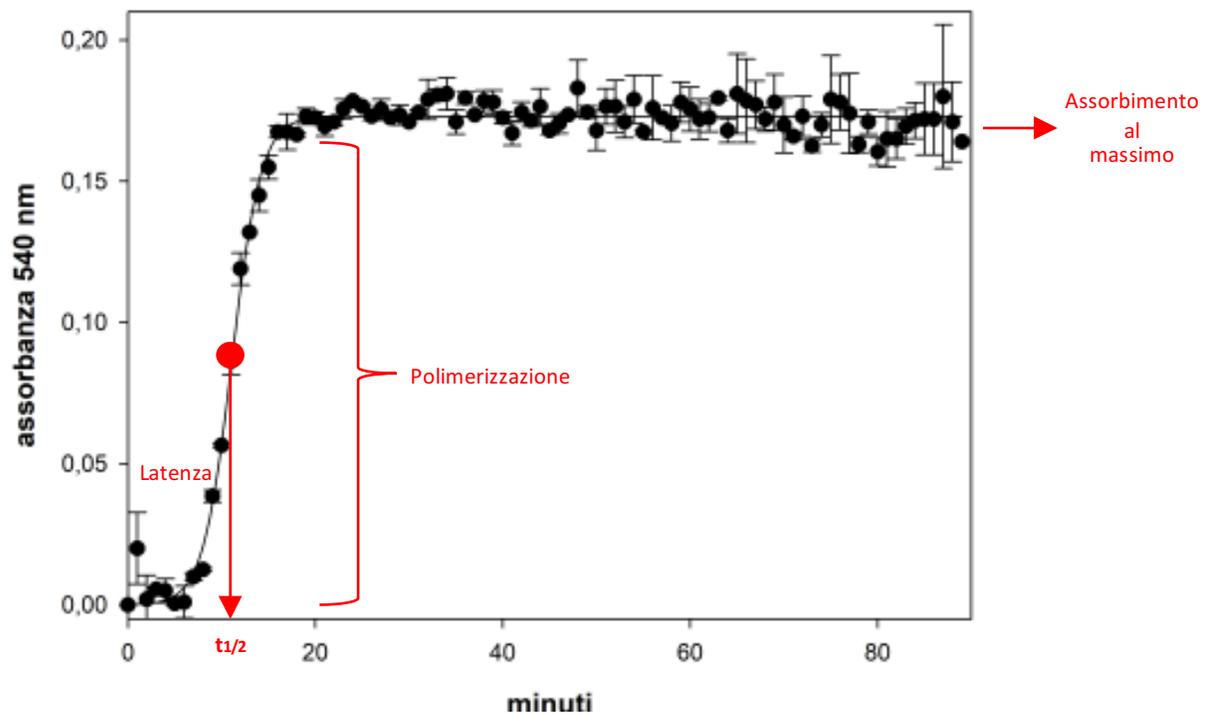


Figura 10: cinetica di coagulazione di un campione di PPP di cane scongelato. I punti esprimono le medie dei valori di assorbanza di due repliche. Le barre d'errore indicano le deviazioni standard risultanti dai valori delle repliche dei vari campioni.

La curva di torbidità si ottiene tramite la registrazione dei valori di assorbimento della luce da parte del coagulo in formazione in funzione del tempo. I dati di entrambi i grafici mostrano che la torbidità sviluppata in seguito al processo coagulativo possa essere rappresentata tramite curve di tipo sigmoide a tre parametri, per le quali l'analisi statistica rileva valori di R pari a 0,99. Le variabili che si ottengono da queste curve sono i seguenti: il tempo di latenza in cui la reazione di polimerizzazione è avviata ma non ancora evidenziabile, la pendenza, la massima assorbanza e il tempo necessario per il quale si ha il punto di flesso della curva ($t_{1/2}$).

Come si può osservare nei grafici, mentre per il PPP di cane i valori del $t_{1/2}$ (tempo che corrisponde al punto di flesso della curva) è molto rapido (circa 10 minuti), nel cavallo si riscontra un valore lento (20 minuti). Viceversa, il livello di torbidità massima raggiunto nel cane è più basso rispetto a quello raggiunto nel cavallo. È importante considerare che esiste un certo grado di variabilità, soprattutto dei valori di torbidità finale, tra campioni diversi nell'ambito della stessa prova e tra prove diverse dello stesso campione (vedi paragrafo seguente).

Nel primo caso le differenze potrebbero essere giustificate dalla diversa composizione del plasma dei soggetti presi in considerazione, in particolare in relazione al contenuto di fibrinogeno, mentre meno chiare risultano le differenze riscontrabili tra le repliche di uno stesso campione. Ulteriori studi potrebbero chiarire se queste differenze dipendano dal tipo di metodo utilizzato per la rilevazione del processo coagulativo o da una diversa consistenza del coagulo che viene a formarsi, e quindi da diverse modalità di polimerizzazione della fibrina, sia dal punto di vista qualitativo (disposizione delle molecole nella rete di fibrina) che quantitativo (numero di legami che si instaurano tra le molecole).

Poiché il processo coagulativo è influenzato positivamente dalla presenza del particolato endogeno, le figure 11 e 12 riportano, per meglio valutare l'effetto del solo liosecretoma, cinetiche di coagulazione di campioni trattati mediante centrifugazione ad elevati campi gravitazionali. Nello specifico il PPP di cavallo è stato sottoposto ad una ultracentrifugazione a 100.000xg in provette da 30 ml, mentre il PPP di cane, a causa minore disponibilità del campione, è stato sottoposto ad una centrifugazione pari a 50.000xg.

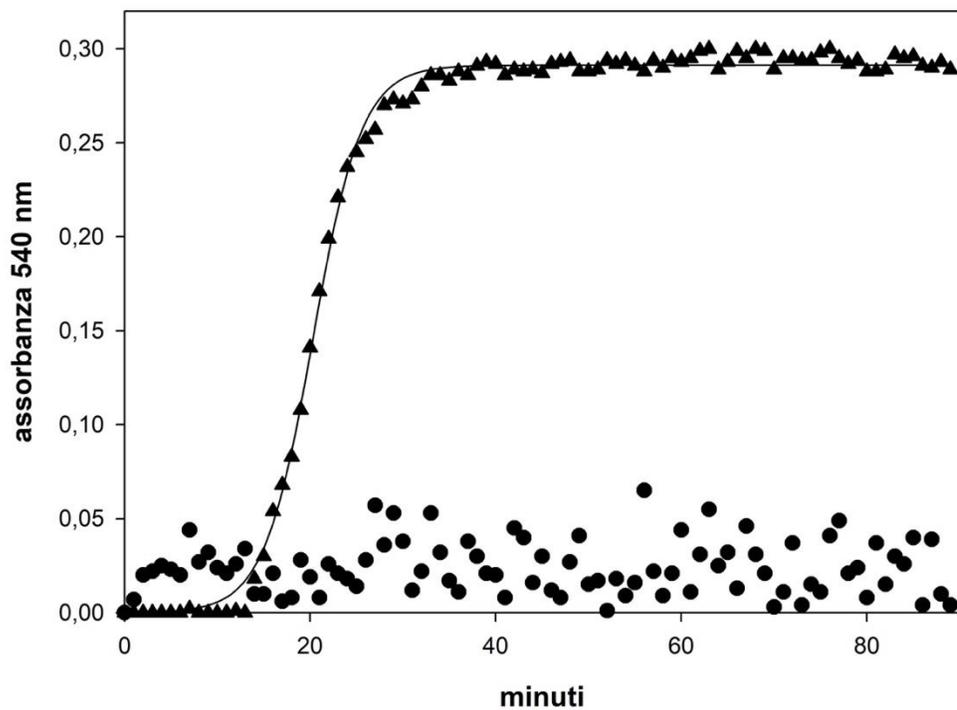


Figura 11: confronto tra le cinetiche di coagulazione di PPP di cavallo (triangoli neri) e PPP ultracentrifugato a 100.000xg per 1h.

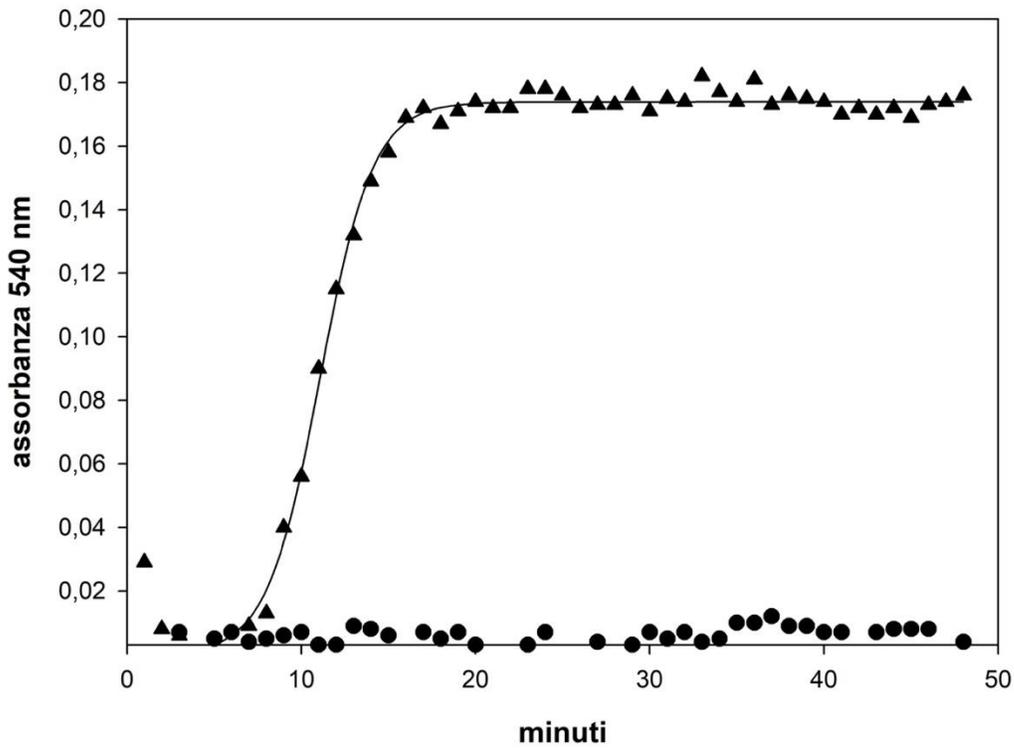


Figura 12: confronto tra le cinetiche di coagulazione di PPP di cane (triangoli neri) e PPP centrifugato a 50.000xg per 1h.

Le differenze tra le curve mostrano come la centrifugazione, che causa la sedimentazione sul fondo della provetta del particolato endogeno determini, quantomeno nei tempi adottati per le cinetiche di coagulazione, l'annullamento del processo coagulativo (cerchi neri).

4.2 Effetto del liosecretoma sulle cinetiche di coagulazione nel plasma di cavallo

Le figure 13a, 13b, 13c e 13d riportano l'esempio di un esperimento di cinetiche di coagulazione di 4 diversi campioni di PPP di cavallo ultracentrifugato a cui sono state aggiunte quantità crescenti di liosecretoma (fattore di concentrazione 3X).

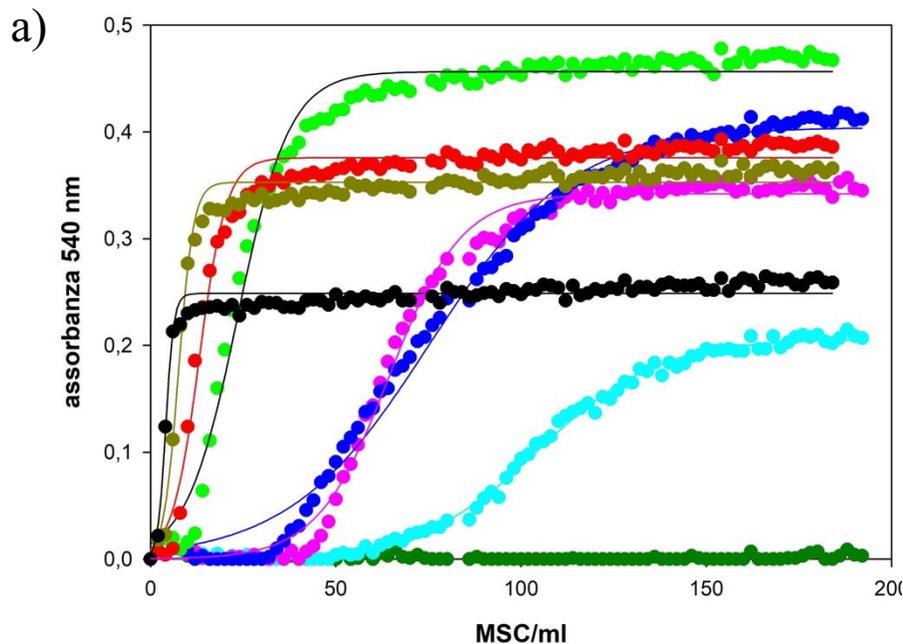


Figura 13a : cinetica di coagulazione del campione di PPP ultracentrifugato del cavallo 1 in assenza (verde scuro) e in presenza di quantità crescenti di liosecretoma (Fattore di diluizione 1:729 – ciano, 1:243 – rosa, 1:81 – blu, 1:27 – verde, 1:9 – rosso, 1:3 - giallo scuro, non diluito - nero).

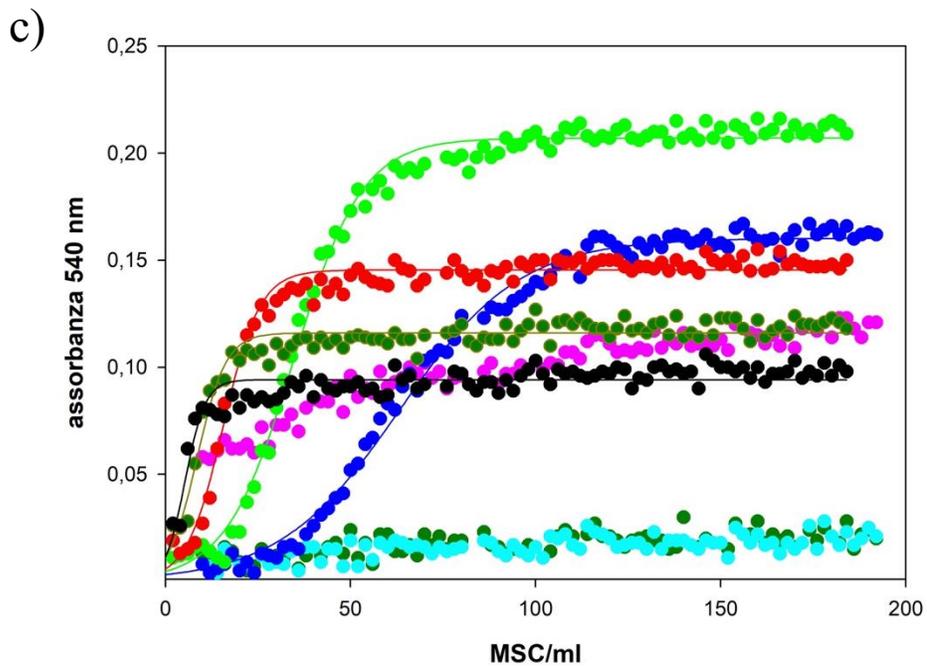
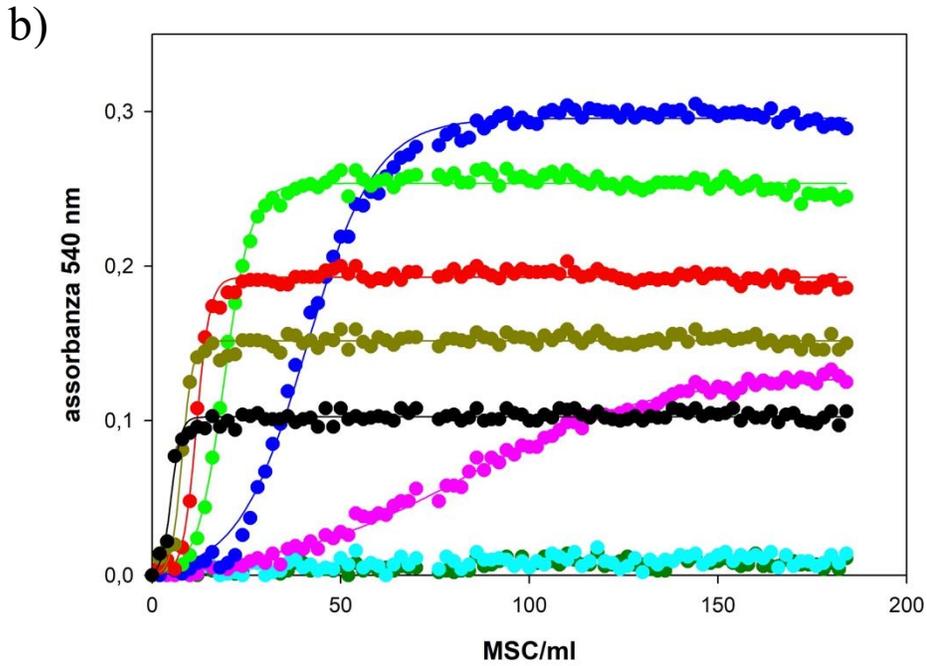


Figura 13b, 13c : cinetica di coagulazione del campione di PPP ultracentrifugato del cavallo 2 e del cavallo 3 in assenza (verde scuro) e in presenza di quantità crescenti di liosecretoma (Fattore di diluizione 1:729 – ciano, 1:243 – rosa, 1:81 – blu, 1:27 – verde, 1:9 – rosso, 1:3 - giallo scuro, non diluito - nero).

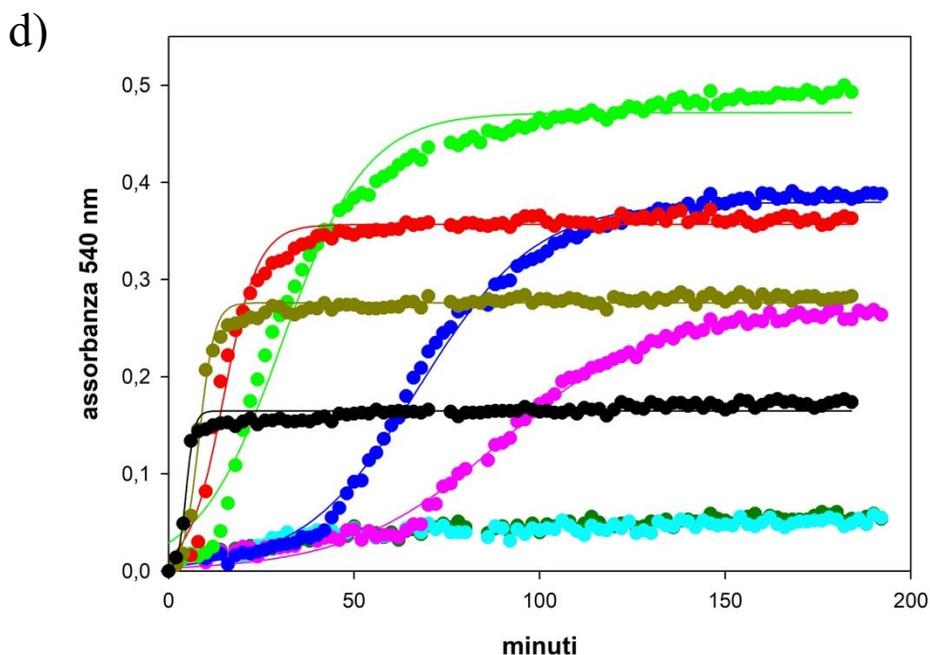


Figura 13d : cinetica di coagulazione del campione di PPP ultracentrifugato del cavallo 4 in assenza (verde scuro) e in presenza di quantità crescenti di liosecretoma (Fattore di diluizione 1:729 – ciano, 1:243 – rosa, 1:81 – blu, 1:27 – verde, 1:9 – rosso, 1:3 - giallo scuro, non diluito - nero).

La presenza del liosecretoma determina progressivamente, a partire dalla concentrazione minore fino a quella maggiore, una riduzione del tempo di latenza, un aumento della velocità di formazione della torbidità come evidenziato dai valori dei $t_{1/2}$, e un aumento dei livelli di torbidità massima. È rilevante sottolineare che la soluzione tampone in cui è stato liofilizzato (e quindi ricostituito) il liosecretoma, utilizzata come controllo, non contiene sostanze procoagulanti.

I grafici in figura 14 evidenziano le medie e gli errori standard dei $t_{1/2}$ delle curve di coagulazione dei campioni dei quattro cavalli in figura 13, eseguite in tre repliche. I risultati mostrano la tendenza dei $t_{1/2}$ a diminuire in risposta all'aumento della concentrazione del liosecretoma, seguendo un profilo di decadimento di tipo iperbolico a due parametri ($R=0,90$).

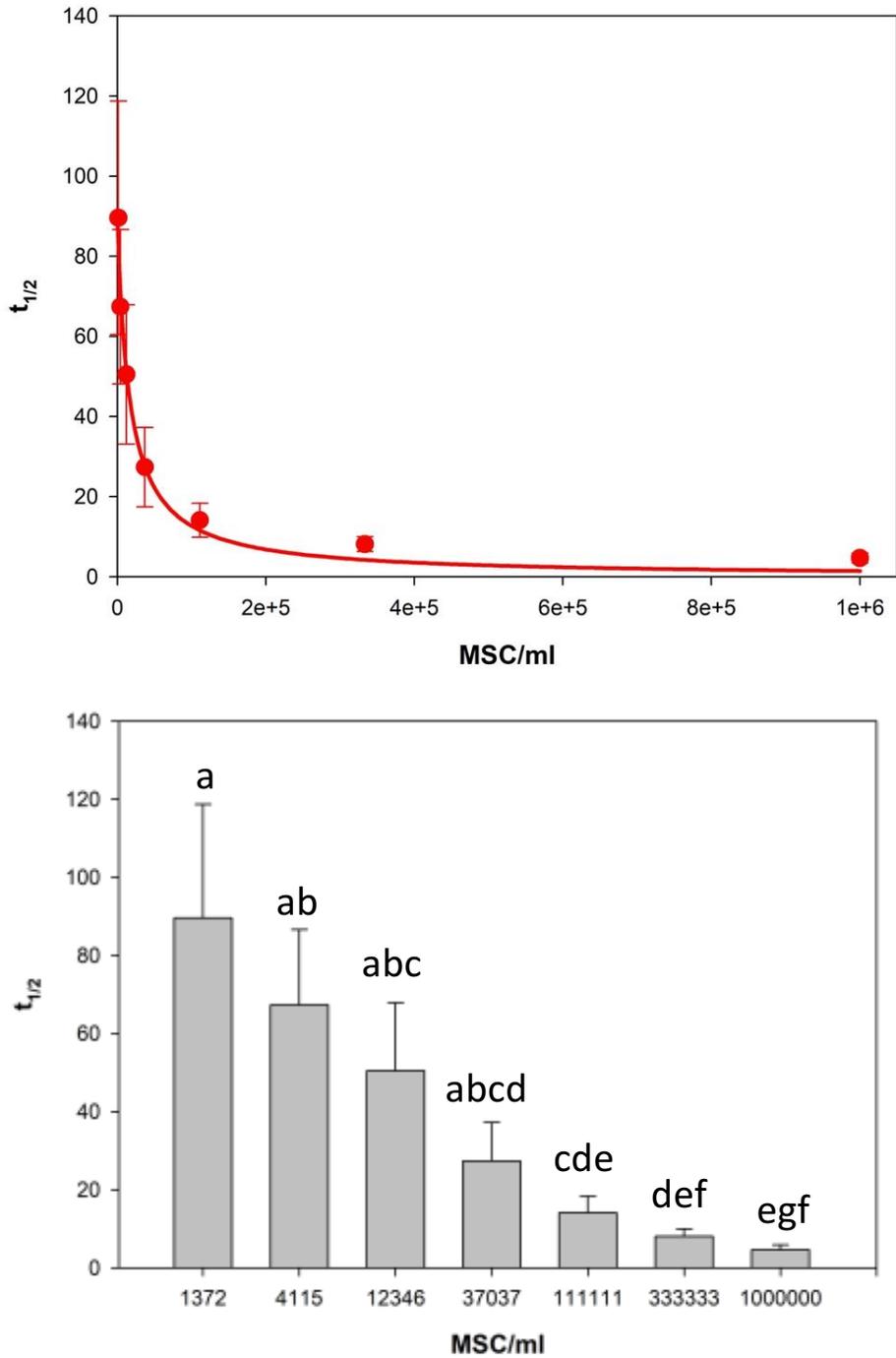


Figura 14: grafici cumulativi dei $t_{1/2}$ dei campioni di PPP ultracentrifugato dei quattro cavalli in funzione delle diverse concentrazioni di liosecretoma, espresse come numero di MSC/ml. Nel primo grafico l'analisi statistica dei dati è riportata come una curva a decadimento iperbolico a due parametri, mentre nel secondo grafico gli stessi dati sono riportati in un diagramma a barre. Le barre d'errore indicano le deviazioni standard risultanti dai valori delle repliche dei vari campioni. Le medie che presentano lettere diverse all'apice, indicano l'esistenza di differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) tra i vari gruppi, secondo il test ANOVA.

La figura 15, che riporta le pendenze delle curve sigmoidi al punto di flesso di tutte le cinetiche di coagulazione, evidenzia come la formazione del coagulo risulti progressivamente più veloce all'aumentare dei livelli di liosecretoma, con un incremento che si presenta più accentuato per quelli più elevati.

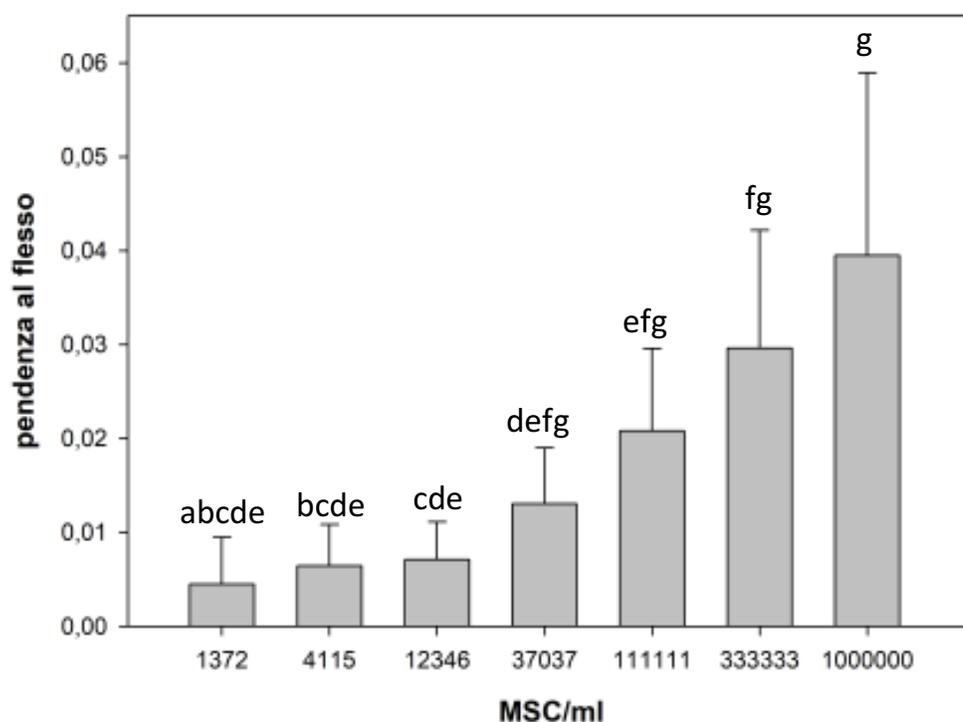


Figura 15: grafico a barre in cui vengono riportate le medie e gli errori standard delle pendenze al flesso delle curve definite dai campioni di PPP ultracentrifugato dei quattro cavalli, con l'aggiunta di diverse concentrazioni di liosecretoma espresse come numero di MSC/ml. Le medie che presentano lettere diverse all'apice, indicano l'esistenza di differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) tra i vari gruppi, secondo il test ANOVA.

La figura 16 riporta invece, in un diagramma a barre, i livelli di assorbanza massima delle cinetiche di coagulazione del PPP ultracentrifugato dei quattro cavalli. Dal grafico si può notare come questo valore raggiunga un massimo (tra 12.346 e 37.037 MSC/ml) per poi diminuire ad un aumento in corrispondenza dei livelli di liosecretoma più elevati, per i quali si registra invece un ulteriore aumento della velocità di coagulazione.

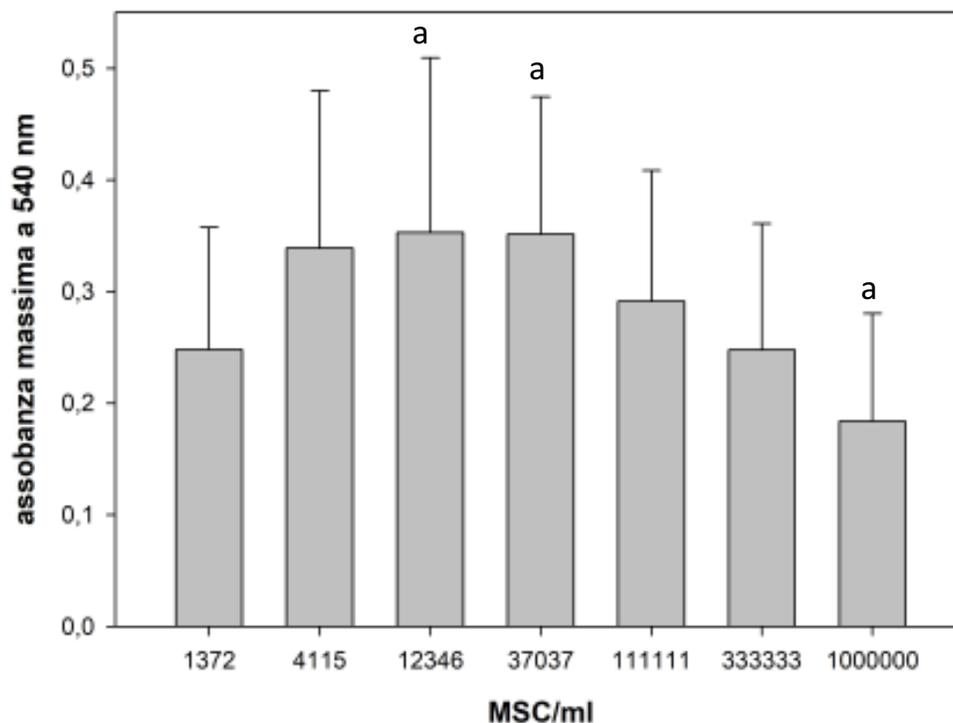


Figura 16: grafico a barre in cui vengono riportate le medie e gli errori standard dell'assorbanza massima raggiunta dai campioni di PPP ultracentrifugato dei quattro cavalli, con l'aggiunta di diverse concentrazioni di liosecretoma espresse come numero di MSC/ml. Le medie che presentano le stesse lettere, hanno differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) secondo il test ANOVA

4.3 Effetto del liosecretoma sulle cinetiche di coagulazione nel plasma di cane

Gli stessi esperimenti descritti nel paragrafo precedente, sono stati realizzati con il medesimo protocollo su campioni di PPP centrifugato di cane. I risultati ottenuti sono molto simili a quelli del cavallo, dimostrando che il liosecretoma presenta un importante effetto procoagulante anche in questa specie.

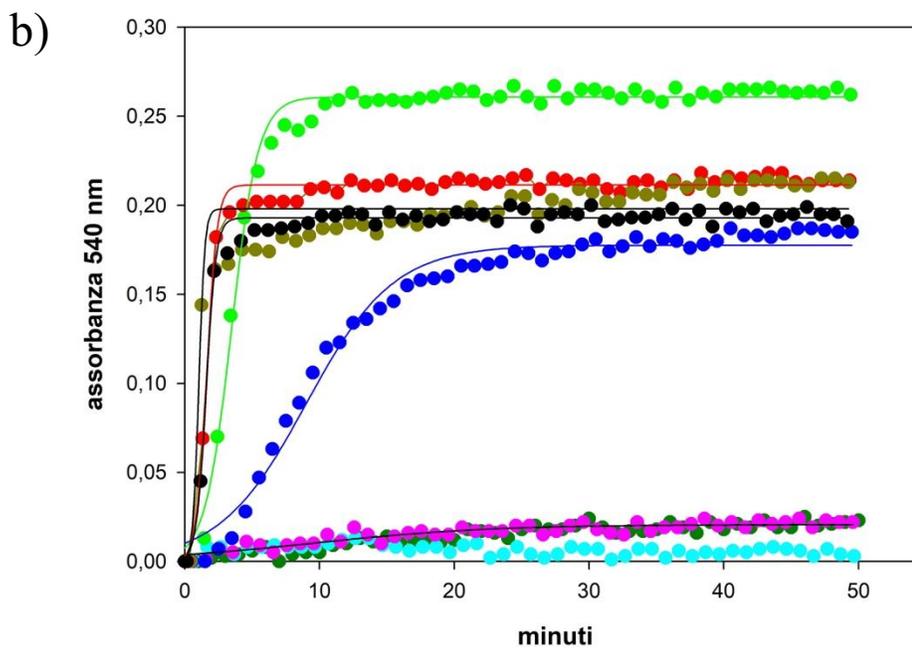
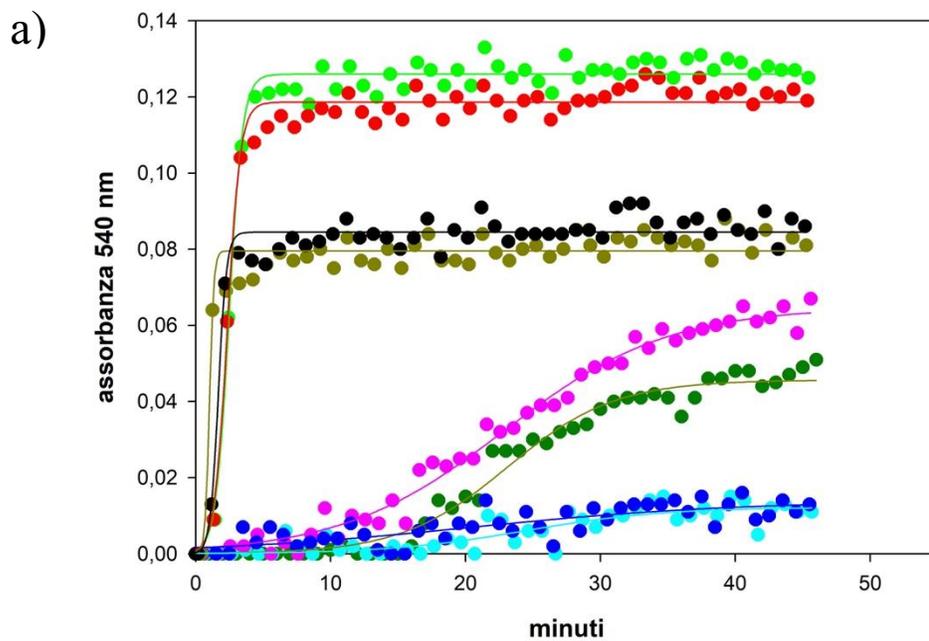


Figura 17a,17b : cinetica di coagulazione di un campione di PPP centrifugato del cane 1 e del cane 2 in assenza (verde scuro) e in presenza di quantità crescenti di liosecretoma (Fattore di diluizione 1:729 – ciano, 1:243 – rosa, 1:81 – blu, 1:27 – verde, 1:9 – rosso, 1:3 - giallo scuro, non diluito - nero).

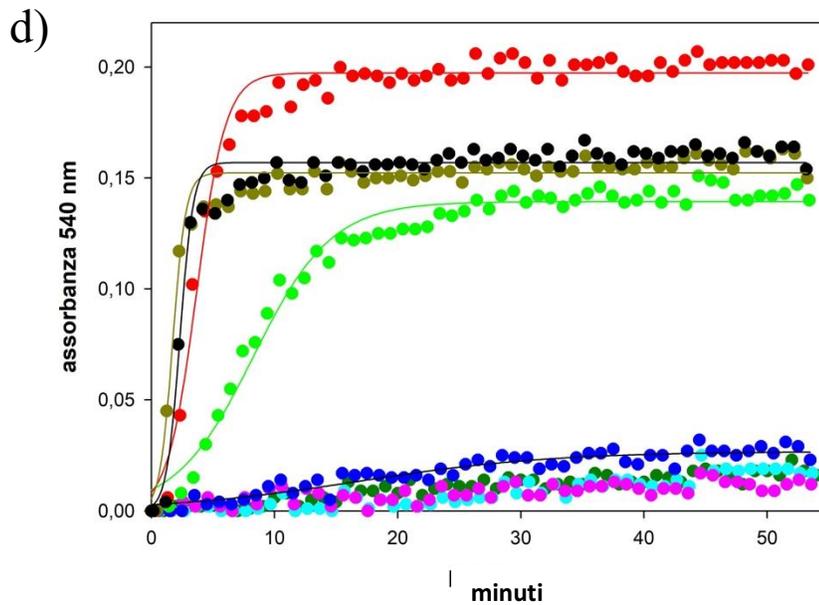
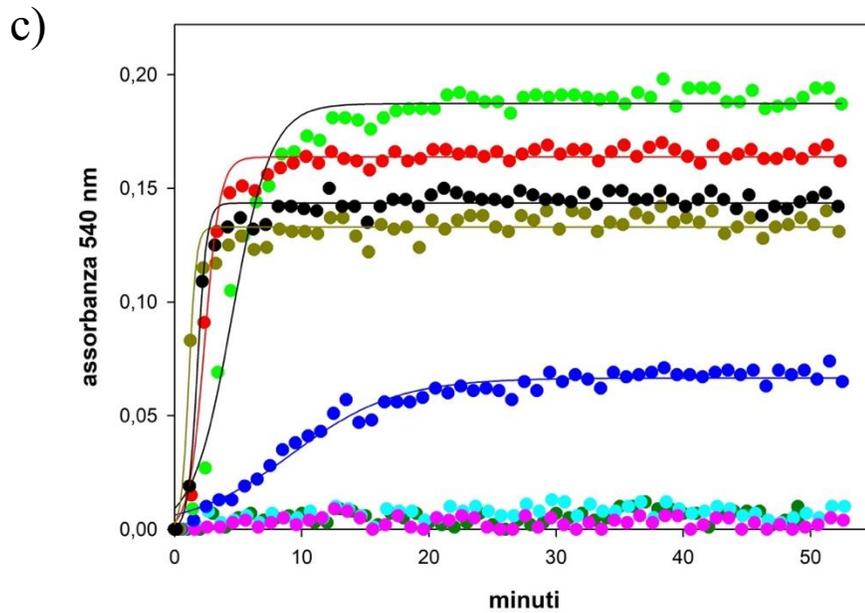


Figura 17c,17d : cinetica di coagulazione di un campione di PPP centrifugato del cane 3 e del cane 4 in assenza (verde scuro) e in presenza di quantità crescenti di liosecretoma (Fattore di diluizione 1:729 – ciano, 1:243 – rosa, 1:81 – blu, 1:27 – verde, 1:9 – rosso, 1:3 - giallo scuro, non diluito - nero).

La presenza del liosecretoma determina progressivamente, a partire dalla concentrazione minore fino a quella maggiore, una riduzione del tempo di latenza, un aumento della velocità di formazione della torbidità come evidenziato dai valori dei $t_{1/2}$, e un aumento dei livelli di torbidità massima.

A causa della ridotta quantità di PPP di cane disponibile, non è stato possibile effettuare, come per il cavallo, ulteriori repliche degli esperimenti. Perciò i grafici seguenti si riferiscono solo ai risultati ottenuti dalle cinetiche di coagulazione riportati in figura 17.

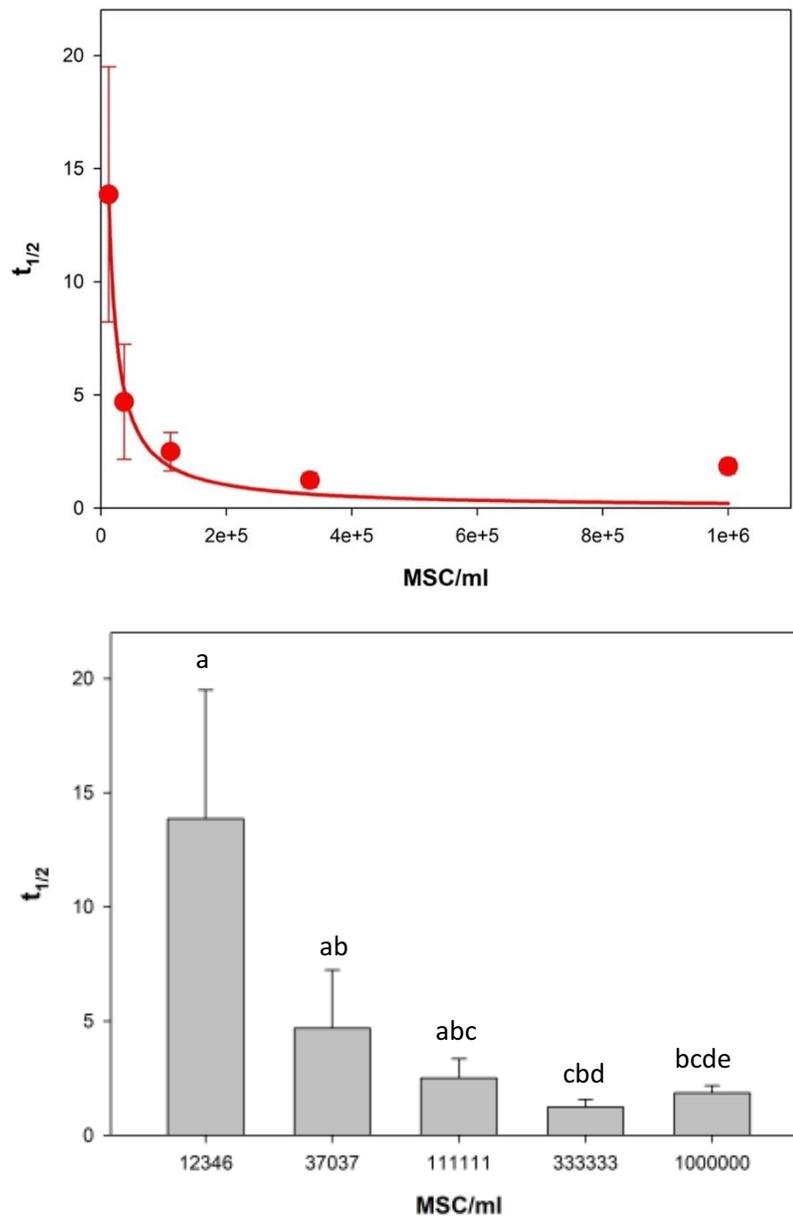


Figura 18: grafici cumulativi dei $t_{1/2}$ dei campioni di PPP centrifugato dei quattro cani in funzione delle diverse concentrazioni di liosecretoma, espresse come numero di MSC/ml. Nel primo grafico l'analisi statistica dei dati è riportata come una curva a decadimento iperbolico a due parametri, mentre nel secondo grafico gli stessi dati sono riportati in un diagramma a barre. Le barre d'errore indicano le deviazioni standard risultanti dai valori delle repliche dei vari campioni. Le medie che presentano lettere diverse all'apice, indicano l'esistenza di differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) tra i vari gruppi, secondo il test ANOVA.

I risultati in figura 18 mostrano la tendenza dei $t_{1/2}$ a diminuire in risposta all'aumento della concentrazione del liosecretoma, seguendo un profilo di decadimento di tipo iperbolico a due parametri ($R=0,86$).

La figura 19, che riporta le pendenze delle curve sigmoidi al punto di flesso di tutte le cinetiche di coagulazione, evidenzia come la formazione del coagulo risulti progressivamente più veloce all'aumentare dei livelli di liosecretoma, soprattutto nell'intervallo di valori tra 37.037 a 333.333 MSC/ml.

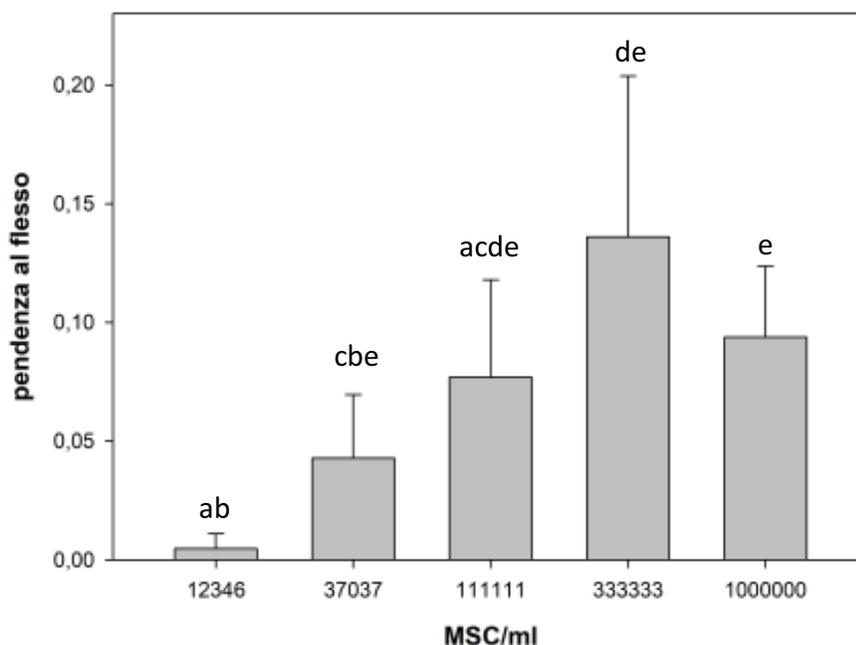


Figura 19: grafico a barre in cui vengono riportate le medie e gli errori standard delle pendenze al flesso delle curve definite dai campioni di PPP centrifugato dei quattro cani, con l'aggiunta di diverse concentrazioni di liosecretoma espresse come numero di MSC/ml. Le medie che presentano lettere diverse all'apice, indicano l'esistenza di differenze statisticamente significative ($p<0,05$) tra i vari gruppi, secondo il test ANOVA.

La figura 20 riporta invece, in un diagramma a barre, i livelli di assorbanza massima delle cinetiche di coagulazione del PPP ultracentrifugato dei quattro cani. Dal grafico si può notare come questo valore raggiunga un massimo (tra 37.037 e 111.111 MSC/ml) per poi diminuire in corrispondenza dei livelli di liosecretoma più elevati, per i quali si registra invece un ulteriore aumento della velocità di coagulazione.

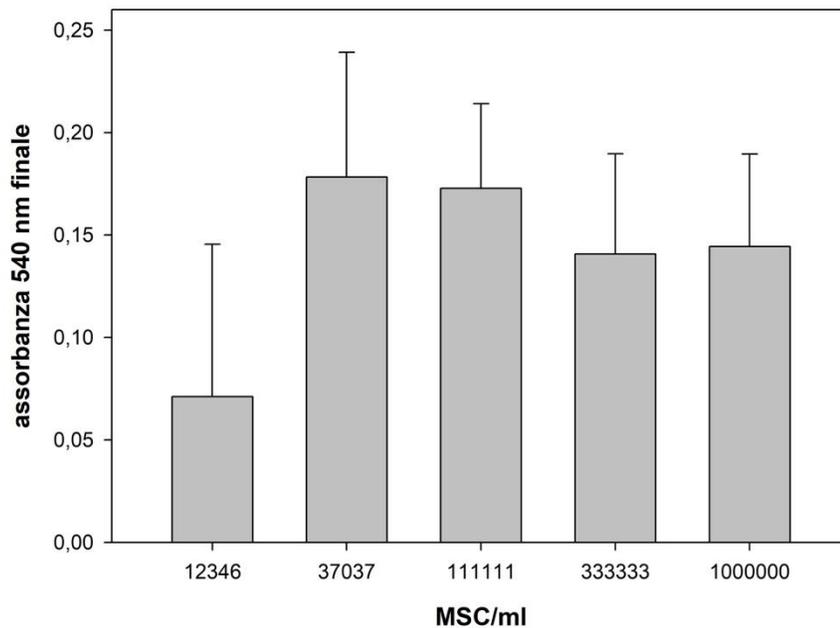


Figura 20: grafico a barre in cui vengono riportate le medie e gli errori standard dell'assorbanza massima raggiunta dai campioni di PPP centrifugato dei quattro cani, con l'aggiunta di diverse concentrazioni di liosecretoma espresse come numero di MSC/ml. Le medie non presentano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) secondo il test ANOVA.

5. DISCUSSIONE

Come si può osservare dai risultati degli esperimenti, partendo da campioni di PPP equino e di cane, il liosecretoma influenza fortemente il processo coagulativo in entrambe le specie, all'aumentare della sua concentrazione. In particolare si osservano una riduzione del tempo in cui si realizza il processo coagulativo, accompagnato da un aumento della velocità di formazione del coagulo. L'effetto maggiore è evidenziabile nei campioni della specie canina, dove gli stessi incrementi dei $t_{1/2}$ e delle pendenze delle cinetiche di coagulazione, sono ottenuti per quantità di liosecretoma prodotte da un numero di MSC circa 7 volte inferiore rispetto al cavallo.

Questo dato potrebbe essere determinato da un più elevato numero di particelle procoagulanti presenti nei campioni di PPP di cane che, a causa del loro ridotto volume, sono stati sottoposti ad una centrifugazione meno estensiva (50.000xg) rispetto a quelli di cavallo (100.000xg). Le differenze quantitative potrebbero anche riflettere una diversa efficacia dell'attività procoagulante dei liosecretomi di MSC di cane e cavallo, oppure potrebbero essere legati ai diversi preparati. L'utilizzo di ulteriori lotti di liosecretoma potrebbe permettere di chiarire questo aspetto. Poiché come evidenziato dalle curve riportate nelle figure 14 e 18, il PPP di cane coagula più velocemente rispetto a quello di cavallo, l'elevata efficacia del liosecretoma canino potrebbe anche riflettere una più alta sensibilità al microparticolato, e/o potrebbe evidenziare una maggiore propensione intrinseca alla coagulazione del plasma di questa specie animale. Gli effetti determinati dal liosecretoma, evidenziati in modo quantitativo da questo studio, sono in linea con quanto riportato in letteratura, dove una delle poche complicanze identificate nella terapia con MSC, seppur non frequente, è l'insorgenza di trombosi. Alcuni studi tromboelastometrici hanno infatti evidenziato nella specie umana che le MSC e le EV isolate dal loro mezzo di coltura posseggono proprietà procoagulanti, legate all'espressione del fattore tissutale (TF) e della fosfatidilserina sulla membrana cellulare, che costituiscono un ottimo substrato per costruire il complesso di attivazione della trombina (Silachev, et al., 2019; Tatsumi, et al., 2013).

La formazione del coagulo si sviluppa in tre passaggi: la separazione proteolitica del fibrinopeptide A del fibrinogeno ad opera della trombina, l'associazione tra monomeri di fibrina al fine di formare una protofibrilla e l'aggregazione laterale di più protofibrille per produrre fibre, che a loro volta si ramificheranno andando a costituire il coagulo vero e proprio (**Fig. 21**). In accordo con gli studi presenti in letteratura, all'inizio del processo coagulativo è presente una fase di latenza in cui si attiva la cascata della coagulazione e le protofibrille iniziano progressivamente ad allungarsi e ad aggregarsi formando singole fibre mobili, senza che si abbia un aumento della torbidità. Successivamente, nel momento che coincide con l'inizio della crescita della curva avviene la formazione di una vera e propria impalcatura, grazie alla rapida generazione di legami crociati tra le fibre che continueranno ad allungarsi e a ramificarsi. Questo processo produce una fitta rete che andrà a costituire il coagulo, e quindi si avrà il plateau finale della curva di torbidità (Chernysh & Weisel, 2008). La massima assorbanza può dipendere pertanto da diversi fattori tra cui la concentrazione del fibrinogeno presente nel campione, il diametro medio delle fibre di fibrina e la loro densità all'interno del coagulo (Pieters, Guthold, Nunes, & de Lange, 2020).

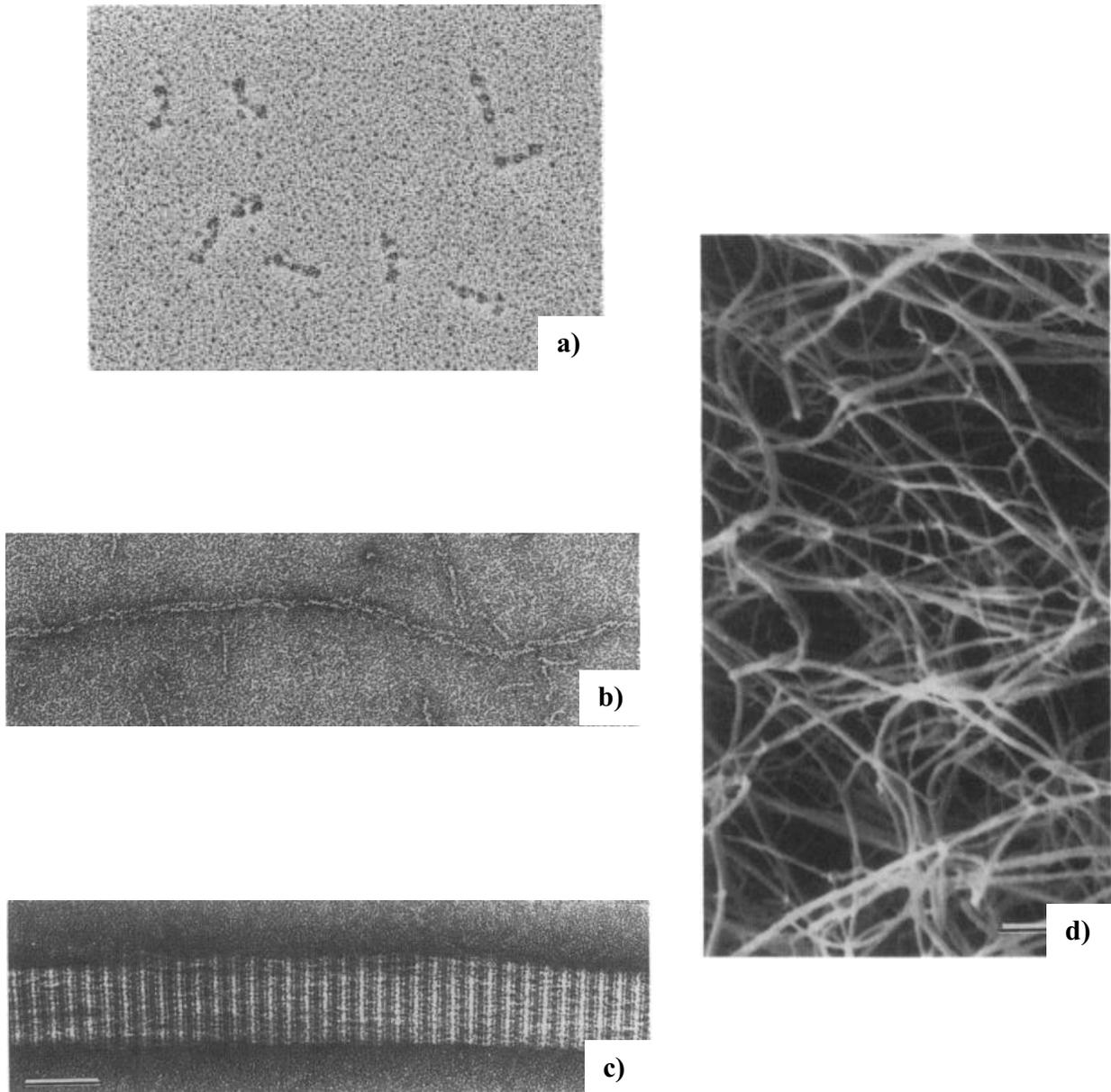


Figura 21: Immagini effettuate tramite microscopia elettronica dei vari step del processo di polimerizzazione della fibrina: **(a)** all'inizio del processo coagulativo sono presenti monomeri di fibrina liberi. **(b)** il legame tra più monomeri porta allo sviluppo in lunghezza delle protofibrille. **(c)** la struttura di una fibra di fibrina è il risultato dell'aggregazione laterale di più protofibrille. **(d)** le fibre di fibrina costituiscono una vera e propria impalcatura che definirà la formazione del coagulo e lo sviluppo di torbidità (Weisel & Nagaswami, 1992).

I risultati delle cinetiche di coagulazione ottenuti negli esperimenti del presente elaborato sono in linea con quanto riportato sopra ed i vari passaggi, quali la latenza, la formazione del coagulo e il termine del processo coagulativo vengono descritti in modo esatto dalla funzione sigmoidea ottenuta in tutte le prove.

Le differenze tra i campioni dei diversi animali potrebbero dipendere da diversi fattori, come ad esempio: la quantità di fibrinogeno e di trombina, il ph e la concentrazione di albumina (Zeng, Fagnon, Chakravarthula, & Alves, 2020) che non sono stati valutati nel presente lavoro, ma che debbono necessariamente essere oggetto di ulteriori approfondimenti. Infatti, la variabilità dei livelli di massima assorbanza, che aumentano per poi diminuire, potrebbe riflettere diversi livelli di trombina prodotta. A basse concentrazioni di trombina il processo coagulativo è reso possibile ma la separazione dei fibrinopeptidi avviene lentamente, allo stesso modo delle protofibrille, che non avranno tempo di svilupparsi in lunghezza. Il risultato sarà la formazione di fibre corte e spesse che determineranno una maggiore torbidità. Riassumendo, quando la concentrazione della trombina è bassa avremo un aumento del tempo di latenza e della torbidità massima, mentre la velocità di formazione della torbidità diminuirà. D'altro canto, una maggiore concentrazione di enzima velocizza la separazione del fibrinopeptide e favorisce lo sviluppo in lunghezza delle protofibrille piuttosto che l'aggregazione laterale, definendo la formazione di fibre lunghe e sottili che determineranno una ridotta torbidità. Alti livelli di trombina definiscono quindi una riduzione del tempo di latenza, un aumento della velocità di sviluppo della torbidità e una diminuzione del livello di torbidità massima (Zeng, Fagnon, Chakravarthula, & Alves, 2020). I diversi livelli di trombina, che tanto influenzano il processo coagulativo, potrebbero essere alla base degli incrementi del massimo valore di assorbanza che si rilevano sia ai livelli più bassi (ma efficaci) di liosecretoma nel medesimo campione, che tra campioni diversi. Cinetiche più lente in presenza di basse quantità di liosecretoma e/o valori di protrombina costitutivamente differenti nei campioni di plasma dei diversi animali, potrebbero infatti determinare diversi livelli di trombina attivata ed influenzare pertanto la modalità di formazione del coagulo e la sua consistenza. Studi cinetici come quelli proposti in questa tesi, svolti in parallelo a determinazioni della consistenza del coagulo e dei livelli di trombina, potranno eventualmente chiarire la peculiarità dell'andamento della torbidità finale che è stata qui evidenziata.

Allo stesso modo, come riportato in letteratura, con l'aumento della concentrazione di fibrinogeno i coaguli di fibrina hanno dimostrato un aumento della torbidità e della forza del coagulo (Zeng, Fagnon, Chakravarthula, & Alves, 2020). Una maggiore quantità di fibrinogeno a volume costante di plasma determina una maggiore formazione di fibre lunghe e sottili, che andranno a costituire un blocco fibroso più denso con un conseguente aumento della torbidità finale (Zeng, Fagnon, Chakravarthula, & Alves, 2020). Determinazioni del contenuto del fibrinogeno, che in questo studio non sono state realizzate, permetteranno eventualmente di correlare questo parametro con la torbidità rilevata alla fine del processo coagulativo.

Le cellule staminali e il secretoma da esse prodotto vengono ormai utilizzati nel campo della medicina rigenerativa per la terapia di diverse malattie, grazie alla loro attività immunomodulatoria e rigenerativa, di cui si è già trattato in precedenza. I risultati ottenuti nel presente elaborato di tesi suggeriscono un possibile utilizzo dell'ultracentrifugato e del liosecretoma nell'applicazione clinica. Già da tempo, soprattutto in ortopedia e traumatologia, si utilizzano gel piastrinici per il trattamento di patologie traumatiche e degenerative. Questi prodotti sfruttano i numerosi fattori di crescita fisiologicamente presenti all'interno delle piastrine, in modo da poter stimolare la ripresa dei fenomeni di riparazione e rigenerazione tissutale localmente dove applicati. Allo stesso modo la coagulazione indotta in tempi definiti dall'aggiunta di opportune quantità di liosecretoma potrebbe essere sfruttata per la preparazione di un gel "immediatamente" pronto all'uso, considerando i valori di $t_{1/2}$ (che permettono di modulare la velocità del processo coagulativo) e di assorbimento massimo (che permettono di valutare la consistenza del coagulo). Il prodotto ottenuto, dotato di notevole plasticità, avrebbe la capacità di modellarsi nel sito di applicazione e permetterebbe a tutte le sostanze terapeutiche contenute nel gel piastrinico e nel liosecretoma di rimanere e agire nella sede di danno. Inoltre, numerosi studi presenti in letteratura dimostrano la bassa immunogenicità del secretoma derivato dalle MSC rispetto all'utilizzo delle cellule vere e proprie. Allo stesso modo, il PPP sottoposto a ultracentrifugazione ha dimostrato una riduzione importante delle sostanze utili per l'avvio del processo coagulativo. Per questo motivo sarebbe ragionevole pensare che, tramite la centrifugazione ad alti campi gravitazionali, il PPP venga privato di numerose altre sostanze potenzialmente immunogene presenti fisiologicamente al suo interno.

Questo fatto renderebbe l'ultracentrifugato e il liosecretoma potenzialmente adatti per applicazioni di derivati del plasma "allogenic", al fine di ridurre la probabilità di generare reazioni immunitarie avverse da parte del ricevente.

5. CONCLUSIONI

In letteratura sono presenti alcuni studi che descrivono, tramite turbidimetria, le cinetiche di coagulazione del plasma sanguigno e di come il processo venga accelerato dalla presenza di elementi corpuscolati (microvescicole, esosomi ecc). Poiché il liosecretoma delle cellule staminali mesenchimali è costituito in larga parte da elementi corpuscolati, nel presente lavoro di tesi abbiamo investigato i suoi effetti sulle cinetiche di coagulazione del plasma sanguigno di due specie d'interesse veterinario, cavallo e cane. L'analisi dei dati ottenuti evidenzia che il liosecretoma è in grado di determinare, in entrambe le specie, da un lato la diminuzione dei $t_{1/2}$ di coagulazione e dall'altro l'aumento della velocità di formazione del coagulo. I risultati sperimentali che evidenziano un più evidente effetto del liosecretoma nei campioni di cane rispetto a quello di cavallo, lasciano ipotizzare, per questa specie, una maggiore reattività alle componenti procoagulanti del liosecretoma. Gli esperimenti condotti nell'ambito di questo elaborato di tesi non sono utili solo per evidenziare gli effetti del liosecretoma sul processo di coagulazione, ma anche per i possibili riscontri pratici in campo clinico qualora sia necessario produrre gel da derivati del plasma in tempi controllati. Sarebbe inoltre interessante condurre ulteriori esperimenti per valutare la sensibilità del plasma e derivati di altre specie animali, compreso l'uomo, nei confronti di questo nuovo prodotto "cell-free".

6. BIBLIOGRAFIA

- A. Augustyn, T. E. (2023, ottobre 20). *Coagulation of blood*. Tratto da Britannica:
<https://www.britannica.com/science/coagulation-of-blood>
- Arraud, N., Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Pasquet, C., Mornet, S., & Brisson, A. (2014). Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 12.5, 614-627.
- Asakura, A., Komaki, M., & Rudnicki, M. A. (2001). Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation,. *Differentiation*, vol. 68, no. 4-5, 245-253.
- Baghaei, K., Hashemi, S. M., Tokhanbigli, S., Rad, A. A., Assadzadeh-Aghdaei, H., Sharifian, A., & Reza Zali, M. (2017). Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench* 10.3, 208.
- Bari, E., Perteghella, S., Di Silvestre, D., Sorlini, M., Catenacci, L., Sorrenti, M., . . . Torre, M. (2018). Pilot production of mesenchymal stem/stromal freeze-dried secretome for cell-free regenerative nanomedicine: a validated GMP-compliant process. *Cells* 7.11, 190.
- Barrachina, L., Romero, A., Zaragoza, P., Rodellar, C., & Vázquez, F. J. (2018). Practical considerations for clinical use of mesenchymal stem cells: From the laboratory to the horse. *The Veterinary Journal* 238, 49-57.
- Barry, F. P., & Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36.4, 568-584.
- Bongso, A., & Lee, E. H. (2005). *Stem Cells: from bench to bedside 1*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- Boxall, S. A., & Jones, E. (2012). Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem cells international* 2012.
- Butenas, S., & Mann, K. (2002). Blood Coagulation. *Biochemistry (Moscow)*, 67, 5-15.

- Chance, T. C., Rathbone, C. R., Kamucheka, R. M., Peltier, G. C., Cap, A. P., & Bynum, J. A. (2019). The effects of cell type and culture condition on the procoagulant activity of human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 87.1S, S74-S82.
- Chen, W., Huang, Y., Han, J., Yu, L., Li, Y., Lu, Z., . . . Xiao, Y. (2016). Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells-derived exosome. *Immunologic research* 64, 831-840.
- Chernysh, I. N., & Weisel, J. W. (2008). Dynamic imaging of fibrin network formation correlated with other measures of polymerization. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 111.10, 4854-4861.
- Cianfarani, F., Toietta, G., Di Rocco, G., Cesareo, E., Zambruno, G., & Odorisio, T. (2013). Diabetes impairs adipose tissue-derived stem cell function and efficiency in promoting wound healing. *Wound repair and regeneration* 21.4, 545-553.
- Clevers, H. (2005). Stem cells, asymmetric division and cancer. *Nature genetics* 37.10, 1027-1028.
- Combi, A., Gastaldi, G., & Benazzo, F. (2011). Cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo per la medicina rigenerativa in campo ortopedico. *Bollettino della Società Medico Chirurgica di Pavia* 124.2, 293-306.
- De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., & Lutyen, F. P. (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis & Rheumatism* 44.8, 1928-1942.
- de Sousa, E. B., Casado, P. L., Neto, V. M., Aguiar, D. P., & Duarte, M. E. (2014). Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem cell research & therapy* 5, 1-6.
- Deng, W., Han, Q., Liao, L., You, S., Deng, H., & Zhao, R. C. (2005). Effects of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells on T and B lymphocytes from BXSb mice. *DNA and cell biology* 24.7, 458-463.
- Di Ianni, M., Del Papa, B., De Ioanni, M., Moretti, L., Bonifacio, E., Cecchini, D., . . . Tabilio, A. (2008). Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Experimental hematology* 36.3, 309-318.

- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanesi, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., . . . Gianni, A. M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 99.10, 3838-3843.
- Dicker, A., Le Blanc, K., Åström, G., van Harmelen, V., Götherström, C., Blomqvist, L., . . . Rydén, M. (2005). Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Experimental cell research* 308.2, 283-290.
- E.A.Loiacono. (2018, Aprile 2). *Coagulazione del sangue, cascata coagulativa, fibrinolisi*. Tratto da Medicina Online: <https://medicinaonline.co/2018/04/02/coagulazione-del-sangue-cascata-coagulativa-fibrinolisi-spiegazione-e-schema/>
- Eleuteri, S., & Fierabracci, A. (2019). Insights into the secretome of mesenchymal stem cells and its potential applications. *International journal of molecular sciences* 20.18, 4597.
- Ferreira, J. R., Teixeira, G. Q., Santos, S. G., Barbosa, M. A., Almeida-Porada, G., & Gonçalves, R. M. (2018). Mesenchymal stromal cell secretome: influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Frontiers in immunology* 9, 2837.
- Fraser, J. K., Zhu, M., Wulur, I., & Alfonso, Z. (2008). Adipose-derived stem cells. *Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols*, 59-67.
- Fu, X., Liu, G., Halim, A., Ju, Y., Luo, Q., & Song, G. (2019). Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells* 8.8, 784.
- Gazdic, M., Volarevic, V., Arsenijevic, N., & Stojkovic, M. (2015). Mesenchymal stem cells: A friend or foe in immune-mediated diseases. *Stem Cell Reviews and Reports* 11, 280-287.
- Ghorbani, A., Jalali, S. A., & Varedi, M. (2014). Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: a non-enzymatic method. *Tissue and Cell* 46.1, 54-58.
- Glennie, S., Soiero, I., Dyson, P. J., Lam, E. W., & Dazzi, F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 105.7, 2821-2827.
- Gnecchi, M., Danieli, P., Malpasso, G., & Ciuffreda, M. (2016). Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cells in tissue repair. *Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols*, 123-146.

- Griffin, M. D., Ryan, A. E., Alagesan, S., Lohan, P., Treacy, O., & Ritter, T. (2013). Anti-donor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells: what have we learned so far? *Immunology and cell biology* 91.1, 40-51.
- Guercio , A., Di Marco, P., Casella, S., Cannella, V., Russotto, L., Purpari, G., . . . Piccione, G. (2012). Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell biology international* 36.2, 189-194.
- Guillamat-Prats, R. (2021). The role of MSC in wound healing, scarring and regeneration. *Cells* 10.7 , 1729.
- Han, Y., Li, X., Zhang, Y., Han, Y., Chang, F., & Ding , J. (2019). Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Cells* 8.8, 886.
- Harrell, C. R., Fellabaum, C., Jovicic, N., Djonov, V., Arsenijevic, N., & Volarevic, V. (2019). Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome. *Cells* 8.5, 467.
- Harrell, C. R., Markovic, B. S., Fellabaum, C., Arsenijevic, A., Djonov, V., Arsenijevic, N., & Volarevic, V. (2018). Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes in the treatment of eye diseases. *Cell Biology and Translational Medicine, Volume 2: Approaches for Diverse Diseases and Conditions*, 47-57.
- Harrell, Carl R.; Gazdic, Marina; Fellabaum, Crissy; Jovicic, Nemanja; Valentin , Djonov; Nebojsa, Arsenijevic; Vladislav, Volarevic;. (2019). Therapeutic potential of amniotic fluid derived mesenchymal stem cells based on their differentiation capacity and immunomodulatory properties. *Current stem cell research & therapy* 14.4, 327-336.
- Harting, M. T., Srivastava, A. K., Zhaorigetu, S., Bair, H., Prabhakara, K., Furman, N. E., . . . Olson, S. D. (2018). Inflammation-stimulated mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate inflammation. *Stem cells* 36.1, 79-90.
- Herrick, S., Blanc-Brude, O., Gray, A., & Laurent, G. (1999). Fibrinogen. *The international journal of biochemistry & cell biology* 31.7, 741-746.
- Hocking, A. M. (2012). Mesenchymal stem cell therapy for cutaneous wounds. *Advances in wound care* 1.4, 166-171.

- Hong, S. H., Lee, M. H., Koo, M.-A., Seon, G. M., Park, Y. J., Kim, D., & Park, J.-C. (2019). Stem cell passage affects directional migration of stem cells in electrotaxis. *Stem cell research* 38, 101475.
- Hwai-Shi, W., Hung, S.-C., Peng, S.-T., Huang, C.-C., Wei, H.-M., Guo, Y.-J., . . . Chen, C.-C. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, vol. 22, no. 7, 1330-1337.
- Jung, H.-G., Ahn, E.-K., Lee, J.-H., Kim, Y.-H., Leem, S.-H., Heo, J., & Kim, H. (2014). Effects of harvesting sites and ages on adipose tissue-derived stem cells in rat. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 11, 137-142.
- Kolios, G., & Moodley, Y. (2012). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration* 85.1 , 3-10.
- Krampera , M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Iaylor, R., Simpson, E., & Dazzi, F. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 101.9 , 3722-3729.
- Kuhbier, J. W., Weyand, B., Radtke, C., Vogt, P. M., Kasper, C., & Reimers, K. (2010). Isolation, characterization, differentiation, and application of adipose-derived stem cells. *Bioreactor systems for tissue engineering II: strategies for the expansion and directed differentiation of stem cells* , 55-105.
- Kuntal, K., & Pushpa, T. C. (2014). Stem cell: basics, classification and applications. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics* 2.7, 919-930.
- Kuriyan, A. E., Albin, T. A., Townsend, J. H., Rodriguez, M., Pandya, H. K., Leonard, R. E., . . . Goldberg, J. L. (2017). Vision loss after intravitreal injection of autologous “stem cells” for AMD. *New England Journal of Medicine* 376.11 , 1047-1053.
- Li , H., Ghazanfari, R., Zacharaki, D., Ching Lim, H., & Scheduling, S. (2016). Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1370.1, 109-118.
- Li, L., & Ting, X. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 605-631.

- Ling, K. X., Peng, L., Feng, Z. J., Wei, C., Yan, Y. W., Nan, S., . . . Wei, W. Z. (2016). Stromal derived factor-1/CXCR4 axis involved in bone marrow mesenchymal stem cells recruitment to injured liver. *Stem cells international* 2016.
- Locke, M., Windsor, J., & Dunbar, P. R. (2009). Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ journal of surgery* 79.4, 235-244.
- Lohan, P., Coleman, C. M., Murphy, J., Griffin, M. D., Ritter, T., & Ryan, A. E. (2014). Changes in immunological profile of allogeneic mesenchymal stem cells after differentiation: should we be concerned?. *Stem Cell Research & Therapy* 5.4, 1-11.
- Lötvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Gardiner, C., . . . Witwer, K. W. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of extracellular vesicles* 3.1, 26913.
- Lubkowska, A., Dolegowska, B., & Banfi, G. (2012). Growth factor content in PRP and their applicability in medicine. *J Biol Regul Homeost Agents* 26.2 Suppl 1, 3S-22S.
- Mackman, N., Tilley, R. E., & Key, N. S. (2007). Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 1687-1693.
- Maguire, G. (2013). Stem cell therapy without the cells. *communicative & integrative Biology* 6.6, e26631.
- Manzato Franco, e. a. (2004). Fisiopatologia della coagulazione: nuove acquisizioni. *Biochimica Clinica*.
- Marigo, I., & Dazzi, F. (2011). The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells. In *Seminars in immunopathology*. Vol. 33. (p. 593-602). Springer-Verlag.
- Meisel, R., Heseler, K., Nau, J., Schmidt, S. K., Leineweber, M., Pudelko, S., . . . Sorg, R. V. (2014). Cytomegalovirus infection impairs immunosuppressive and antimicrobial effector functions of human multipotent mesenchymal stromal cells. *Mediators of inflammation* 2014.
- Mensing, N., Gasse, H., Hambruch, N., Haeger, J.-D., Pfarrer, C., & Staszky, C. (2011). Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. *BMC veterinary research* 7.1, 1-13.
- Merino, Ana Maria; Hoogduijn, Martin Johannes; Borrás, Francesc E.; Franquesa, Marcella (2014). Therapeutic potential of extracellular vesicles. *Frontiers in Immunology* 5, 658

- Mocchi, M., Bari, E., Dotti, S., Villa, R., Berni, P., Conti, V., . . . Grolli, S. (2021). Canine Mesenchymal Cell Lyosecretome Production and Safety Evaluation after Allogenic Intraarticular Injection in Osteoarthritic Dogs. *Animals* 11.11, 3271.
- Mocchi, M., Grolli, S., Dotti, S., Di Silvestre, D., Villa, R., Berni, P., . . . Mauri, P. (2021). Equine Mesenchymal Stem/Stromal Cells Freeze-Dried Secretome (Lyosecretome) for the Treatment of Musculoskeletal Diseases: Production Process Validation and Batch Release Test for Clinical Use. *Pharmaceuticals* 14.6, 553.
- Moretti, A. (2002). Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nature Reviews Immunology* 2.12, 957-965.
- Morrison, S. J., & Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *nature* 441.7097, 1068-1074.
- Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A* 93.1, 19-31.
- Nauta, A. J., Westerhuis, G., Kruisselbrink, A. B., Lurvink, E. G., Willemze, R., & Fibbe, W. E. (2006). Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 108.6, 2114-2120.
- Nie, Y., Lau, C. S., Lie, A. K., Chan, G. C., & Mok, M. Y. (2010). Defective phenotype of mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 19.7.
- Nitzsche, F., Müller, C., Lukomska, B., Jolkkonen, J., Deten, A., & Boltze, J. (2017). Concise review: MSC adhesion cascade—insights into homing and transendothelial migration. *Stem cells* 35.6, 1446-1460.
- Nomura, S. (2017). Extracellular vesicles and blood diseases. *The Japanese Society of Hematology*.
- O.v. sjaastad, o. s. (2010). *Fisiologia degli animali domestici*. Biblioteca ambrosiana.
- Oh, E. J., Lee, H. W., Kalimuthu, S., Kim, T. J., Kim, H. M., Baek, S. H., . . . Ahn, B.-C. (2018). In vivo migration of mesenchymal stem cells to burn injury sites and their therapeutic effects in a living mouse model. *Journal of Controlled Release* 279, 79-88.
- Oldenburg, Johannes; Bevans, Carville G.; Müller, Clemens R.; Watzka, Matthias (2006). Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1): the key protein of the vitamin K cycle. *Antioxidants & redox signaling* 8.3-4, 347-353.

- Panteleev, M., & et al. (2017). Extracellular Vesicles of Blood Plasma: Content, Origin, and Properties. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* 11, 187-192.
- Park, S.-R., Kim, J.-W., Jun, H.-S., Roh, J. Y., Lee, H.-Y., & Hong, I.-S. (2018). Stem cell secretome and its effect on cellular mechanisms relevant to wound healing. *Molecular Therapy* 26.2, 606-617.
- Pearson, J., López-Onieva, L., Rojas-Ríos, P., & González-Reyes, A. (2009). Recent advances in Drosophila stem cell biology. *International Journal of Developmental Biology* 53.8-9-10, 1329-1339.
- Periyah, M., Halim, A., & Mat Saad, A. Z. (2017). Mechanism action of platelets and crucial blood coagulation pathways in hemostasis. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*, 319.
- Pessina, A., Bonomi, A., Coccè, V., Bernardo, M. E., Cometa, A. M., Ferrari, M., . . . Locatelli, F. (2009). Assessment of human herpesvirus-6 infection in mesenchymal stromal cells ex vivo expanded for clinical use. *Transplant Infectious Disease* 11.6, 491-496.
- Pieters, M., & Wolberg, A. S. (2019). Fibrinogen and fibrin: An illustrated review. *Research and practice in thrombosis and haemostasis* 3.2, 161-172.
- Pieters, M., Guthold, M., Nunes, C. M., & de Lange, Z. (2020). Interpretation and validation of maximum absorbance data obtained from turbidimetry analysis of plasma clots. *Thrombosis and haemostasis* 120.01, 044-054.
- Podolnikova, N. P., Gorkun, O. V., Loreth, R. M., Yee, V. C., Lord, S. T., & Ugarova, T. P. (2005). A cluster of basic amino acid residues in the γ 370–381 sequence of fibrinogen comprises a binding site for platelet integrin α IIb β 3 (glycoprotein IIb/IIIa). *Biochemistry* 44.51, 16920-16930.
- Podoplelova, N., Sveshnikova, A., Kotova, Y., Eckly, A., Receveur, N., Nechipurenko, D., . . . Panteleev, M. (2016). Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 1745-1755.
- Rajabzadeh, N., Fathi, E., & Farahzadi, R. (2019). Stem cell-based regenerative medicine. *Stem cell investigation* 6.

- Rojas-Ríos, P., & González-Reyes, A.. (2014). Concise review: The plasticity of stem cell niches: a general property behind tissue homeostasis and repair. *Stem cells* 32.4 , 852-859.
- Rombouts, W. J., & Ploemacher , R. E. (2003). Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* 17.1, 160-170.
- Sang, Y., Roest, M., de Laat, B., de Groot, P. G., & Huskens, D. (2021). Interplay between platelets and coagulation. *Blood reviews* 46, 10073.
- Sanjeev Palta, e. a. (2014). Overview of the coagulation system. *Indian Journal of Anaesthesia*.
- Santos, S. C., & et al. (2018). Blood plasma derivatives for tissue engineering and regenerative medicine therapies. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 24.6, 454-462.
- Schaller. (2008). *Human blood Plasma proteins- structure and function*. Wiley.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells* 4.1-2 , 7-25.
- Selvasandran, K., Makhoul, G., Jaiswal, P. K., Jurakhan, R., Li, L., Ridwan, K., & Cecere, R. (2018). A tumor necrosis factor- α and hypoxia-induced secretome therapy for myocardial repair. *The Annals of thoracic surgery*, 105(3), 715-723.
- Shen, S. e. (2023). "High-Throughput Blood Plasma Extraction in a Dimension-Confined Double-Spiral Channel.". *Analytical Chemistry*.
- Silachev, Denis N.; Goryunov, Kirill V.; Shpilyuk, Margarita A.; Beznoschenko, Olga S.; Morozova, Natalya Y.; Kraevaya, Elizaveta E.; Popkov, Vasily A.; Pevzner, Irina B.; Zorova, Ljubava D.; Evtushenko, Ekaterina A.; Starodubtseva, Natalia L.; Kononikhin (2019). Effect of MSCs and MSC-derived extracellular vesicles on human blood coagulation. *Cells* 8.3, 258.
- Simons, B. D., & Clevers, H. (2011). Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell* 145.6, 851-862.
- Sinauridze, E., Kireev, D. A., Popenko, N. Y., Pichugin, A. V., Panteleev, M. A., Krymskaya, O. V., & Ataulakhanov, F. I. (2007). Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thrombosis and haemostasis* 97.03, 425-434.

- Sinha, N., & Dabla, P. K. (2015). Oxidative stress and antioxidants in hypertension—a current review. *Current hypertension reviews* 11.2 , 132-142.
- Sohni, A., & Verfaillie, C. M. (2013). Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem cells international* 2013.
- Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N., & Papamichail, M. (2006). Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem cells* 24.1, 74-85.
- Sun, Y., Deng, W., Geng, L., Zhang, L., Liu, R., Chen, W., . . . Sun, L. (2015). Mesenchymal stem cells from patients with rheumatoid arthritis display impaired function in inhibiting Th17 cells. *Journal of immunology research* 2015.
- Tao, H., Han, Z., Han, Z. C., & Li, Z. (2016). Proangiogenic features of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Stem cells international* 2016 .
- Tatsumi, Kohei; Ohashi, Kazuo; Matsubara, Yoshinori; Kohori, Ayaka; Ohno, Takahiro; Kakidachi, Hiroshi; Horii, Akihiro; Kanegae, Kazuko; Utoh, Rie; Iwata, Takanori; Okano, Teruo (2013). Tissue factor triggers procoagulation in transplanted mesenchymal stem cells leading to thromboembolism. *Biochemical and biophysical research communications* 431.2, 203-209.
- Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K. J., Barnabé-Heider, F., Saikot, A., Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biology*, vol. 3, no. 9, 778–784.
- Troyer, D. L., & Weiss, M. L. (2008). Concise review: Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem cells* 26.3, 591-599.
- Ullah, M., Liu, D. D., & Thakor, A. S. (2019). Mesenchymal stromal cell homing: mechanisms and strategies for improvement. *Iscience* 15, 421-438.
- Undas, A., & Ariëns, R. (2011). Fibrin clot structure and function: a role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases. *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology* , e88-e99.
- Valujskikh, A., & Li, X. (2007). Frontiers in nephrology: T cell memory as a barrier to transplant tolerance. *Journal of the American Society of Nephrology* 18.8 , 2252-2261.

- Vishnubhatla, I., Corteling, R., Stevanato, L., Hicks, C., & Sinden, J. (2014). The development of stem cell-derived exosomes as a cell-free regenerative medicine. *Journal of Circulating Biomarkers* 3 , 2.
- Vizoso, F. J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. (2017). Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International journal of molecular sciences* 18.9 , 1852.
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., . . . Ho, A. D. (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental hematology* 33.11, 1402-1416.
- Wakabayashi, K., Nagai, A., Sheikh, A. M., Shiota, Y., Narantuya, D., Watanabe, T., . . . Yamaguchi, S. (2010). Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model. *Journal of neuroscience research* 88.5, 1017-1025.
- Wang, M., Yuan, Q., & Xie, L. (2018). Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem cells international* 2018.
- Warren, B., & Vales, O. (1972). The release of vesicles from platelets following adhesion to vessel walls in vitro. *British Journal of experimental pathology* 53.2, 206.
- Weisel, J. W. (2007). Structure of fibrin: impact on clot stability. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5, 116-124.
- Weisel, J. W. (2005). Fibrinogen and fibrin. *Advances in protein chemistry* 70, 247-299.
- Weisel, J., & Nagaswami, C. (1992). Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophysical journal* 63.1, 111-128.
- Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British journal of haematology*, 269-288.
- Yaqiu Sang, e. a. (2021). Interplay between platelets and coagulation. *Blood reviews*.
- Zagoura, D., Roubelakis, M. G., Bitsika, V., Trohatou, O., Pappa, K., Kapelouzou, A., . . . Anagnou, N. P. (2012). Therapeutic potential of a distinct population of human amniotic fluid mesenchymal stem cells and their secreted molecules in mice with acute hepatic failure. *Gut* 61.6, 894-906.

- Zanotti, L., Angioni, R., Calì, B., Soldani, C., Ploia, C., Moalli, F., . . . Viola, A. (2016). Mouse mesenchymal stem cells inhibit high endothelial cell activation and lymphocyte homing to lymph nodes by releasing TIMP-1. *Leukemia* 30.5, 1143-1154.
- Zeng, Z., Fagnon, M., Chakravarthula, T. N., & Alves, N. J. (2020). Fibrin clot formation under diverse clotting conditions: Comparing turbidimetry and thromboelastography. *Thrombosis Research* 187, 48-55.
- Zhang, H., Li, X., Zhong, L., Chen, X., & Chen, S. (2021). SDF-1 mediates mesenchymal stem cell recruitment and migration via the SDF-1/CXCR4 axis in bone defect. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 39, 126-138.
- Zhang, J., Huang, X., Wang, H., Liu, X., Zhang, T., Wang, Y., & Hu, D. (2015). The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. *Stem cell research & therapy* 6, 1-7.
- Zhao, Z.-G., Xu, W., Sun, L., You, Y., Li, F., Li, Q.-B. L., & Zou, P. (2012). Immunomodulatory function of regulatory dendritic cells induced by mesenchymal stem cells. *Immunological investigations* 41.2, 183-198.
- Zhou, H., Yuen, P. S., Pisitkun, T., Gonzales, P. A., Yasuda, H., Dear, J. W., . . . Star, R. A. (2006). Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney international* 69.8, 1471-1476.
- Zou, C., Song, G., Luo, Q., Yuan, L., & Yang, L. (2011). Mesenchymal stem cells require integrin β 1 for directed migration induced by osteopontin in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 47, 241-250.

7. RINGRAZIAMENTI

A conclusione vorrei dedicare questo spazio a chi, con dedizione e pazienza, ha contribuito alla realizzazione di questo elaborato.

Un ringraziamento particolare va al mio relatore Prof. Roberto Ramoni che mi ha seguito, con la sua infinita disponibilità e pazienza, in ogni fase della realizzazione dell'elaborato, fin dalla scelta dell'argomento. I suoi consigli e il suo continuo supporto sono stati fondamentali per l'esecuzione degli esperimenti condotti in laboratorio e per il completamento del presente lavoro di tesi.

Grazie anche alla mia correlatrice Dott.ssa Priscilla Berni e al Prof. Stefano Grolli per la loro disponibilità e assistenza riguardo qualsiasi mio dubbio riscontrato durante la stesura.

Un grazie anche alla Prof.ssa Maria Luisa Torre e al suo gruppo di ricerca per la preziosa collaborazione.