

INDICE

Introduzione	3
1. Le cellule staminali.....	4
1.1 Le cellule staminali mesenchimali.....	4
1.2 La nicchia delle cellule staminali.....	5
1.3 Il differenziamento delle MSC in senso adipogenico.....	6
2. Polifenoli.....	6
2.1 L'importanza dei polifenoli in ambito Biomedico.....	8
2.2 Proprietà dei polifenoli.....	8
2.3 Foglie d'Olivio: estratto, contenuto e proprietà.....	9
3. La senescenza cellulare, l'invecchiamento e le patologie età associate.....	10
Scopo del Lavoro	14
Materiali e Metodi	16
1. OLE: Metodo di estrazione.....	17
2. Caratterizzazione di OLE: determinazione del contenuto dei fenoli totali.....	17
3. Colture cellulari.....	18
3.1 Differenziazione adipogenica.....	19
3.2 Colorazione con Oil Red.....	19
3.3 Saggio di β -Galattosidasi per la valutazione della senescenza cellulare.....	20
3.4 Saggio MTT per la valutazione della vitalità cellulare.....	21
4. Estrazione dell'RNA totale dalle cellule.....	22
5. Retrotrascrizione.....	24
6. Real-Time PCR.....	26
7. Valutazione dell'espressione genica: statistica ed elaborazione dei dati....	28
8. Analisi statistiche.....	29

Risultati	30
1. Valutazione della senescenza cellulare delle MSC.....	31
2. Quantificazione della concentrazione di TFC e valutazione della citotossicità di OLE.....	32
3. Valutazione dell'effetto anti-infiammatorio di OLE sulle MSC in senescenza replicativa.....	33
4. Valutazione dell'effetto di OLE sui marcatori adipogenici nelle MSC dopo 3 e 15 giorni.....	34
Conclusioni	37
Bibliografia	40

INTRODUZIONE

1. Le cellule staminali

Le cellule staminali sono cellule indifferenziate dotate di due singolari proprietà, ovvero della capacità di dividersi per mitosi numerose volte mantenendo lo stato indifferenziato (*self renewal*, “autorinnovamento”) e di differenziare in tipi cellulari specializzati attraverso una divisione cellulare definita “mitosi asimmetrica”. Grazie a quest’ultimo tipo di meccanismo biologico, la cellula staminale progenitrice dà origine a due cellule figlie con destino differenziativo diverso: una rimane cellula staminale, consentendo il mantenimento di un pool cellulare dal quale originano poi gli elementi differenziati, una si orienta verso il differenziamento, diventando quindi cellula specializzata (Dulak J et al, 2015). A causa della vita limitata della maggior parte delle cellule somatiche, le proprietà di cui godono le cellule staminali si sono rivelate di cruciale importanza per il mantenimento di una corretta omeostasi tissutale dell’organismo umano. Inoltre, recenti evidenze scientifiche hanno dimostrato che alcuni specifici pathways metabolici -Glicolisi, Ciclo di Krebs e Fosforilazione ossidativa- possono influenzare il destino di una cellula staminale: in particolare, il rilascio di molecole-segnale nell’ambiente extracellulare influenza il destino delle cellule in termini di modifiche nell’epigenetica, proliferazione e differenziamento. Il metabolismo delle cellule staminali è dunque condizionato sia dalle esigenze metaboliche intrinseche e sia dai vincoli metabolici esterni, quali, soprattutto, la disponibilità di nutrienti e la presenza di Ossigeno.(Shyh-Chang N & Ng HH, 2017)

Le popolazioni staminali si differenziano sulla base del loro potenziale differenziativo. Sono distinguibili quattro classi di cellule staminali:

- *cellule staminali totipotenti*, in grado di differenziare in ogni tessuto embrionale o extraembrionale e di dare origine a un intero individuo;
- *cellule staminali pluripotenti*, capaci di generare i tessuti embrionali;
- *cellule staminali multipotenti*, che possono differenziarsi in tessuti diversi ma appartenenti allo stesso foglietto embrionale;
- *cellule staminali unipotenti*, presenti nei tessuti adulti, in grado di autorinnovarsi e di specializzarsi nel tipo cellulare del tessuto di cui fanno parte garantendo rinnovo cellulare e mantenimento del pool staminale.

1.1 Le cellule staminali mesenchimali (MSC)

Fra le cellule staminali adulte multipotenti, rivestono particolare importanza le *cellule staminali mesenchimali (MSC)*. La capacità delle MSC di dare origine a

più linee cellulari è stata studiata accuratamente fin dalla loro scoperta. Le MSC, a seconda delle condizioni microambientali, in particolare in relazione all'esposizione a citochine, fattori di crescita, molecole della matrice extracellulare e fattori di trascrizione, sono in grado di differenziare in vari tipi cellulari tra i quali i fibroblasti (cellule che producono l'impalcatura della maggior parte dei tessuti), gli osteoblasti (cellule indispensabili nella genesi dell'osso), gli adipoblasti (cellule costituenti il tessuto adiposo) e i condroblasti della cartilagine (Antebi B et al, 2019).

Le MSC possono essere isolate dal midollo osseo, dal cordone ombelicale e meno frequentemente da altri tessuti adulti (Bader R et al, 2019). Tali cellule sono identificabili mediante l'individuazione di alcuni marcatori di superficie, fra cui CD90+, CD73+, CD105+, CD14-, CD34-, CD45-, CD79-, or CD19 and HLA-DR- secondo gli standard della International Society for Cellular Therapy (Loibl M et al, 2019). Le MSC sono in grado di esercitare una spiccata attività antiinfiammatoria ed immunomodulatoria (Gugliandolo A et al, 2019).

Le MSC riescono ad influenzare profondamente la risposta immunitaria attraverso le loro interazioni con le cellule principali del sistema immunitario, quali cellule NK, linfociti B e linfociti T. L'immunoregolazione può avvenire con il semplice contatto fra cellule e/o con la produzione di diverse molecole (Maisel R et al, 2004; Ryan J. Et al, 2007). Grazie a queste proprietà, le MSC possono prevenire l'attivazione anomala dei Linfociti T e generare un ambiente di tolleranza immunologica contribuendo così a mantenere la giusta omeostasi immunitaria (Ma S. et al, 2014). Studi recenti hanno messo in luce la capacità delle MSC di intervenire in ciascuna fase del processo di maturazione dei linfociti T, dalla loro attivazione fino al raggiungimento della loro piena funzionalità.

Inoltre, le MSC possono inibire la maturazione delle cellule dendritiche e quindi impedire l'attivazione dei Linfociti T e diminuire la proliferazione e l'attività citotossica de NK. Tuttavia, affinché l'immunoregolazione avvenga correttamente, è necessario che le cellule staminali mesenchimali siano attivate da molecole pro-infiammatorie. (Castro-Manrreza M.E. & Montesinos J.J., 2015)

Viste queste importanti proprietà, le MSC negli ultimi anni hanno trovato sempre più spunti per l'applicazione nei campi della riparazione tissutale, delle terapie anticancro e nella regolazione del processo infiammatorio. (Baek G et al, 2019).

1.2 La nicchia delle cellule staminali

Le cellule staminali adulte risiedono in un microambiente specializzato chiamato *nicchia*. La nicchia rappresenta non solo l'ambiente fisico in cui le cellule sono localizzate ma anche l'insieme di tutti i fattori molecolari con cui la staminale interagisce e di cui ha bisogno per regolare il proprio mantenimento e le proprie funzioni (MR Walker et al, 2009).

L'ipotesi dell'esistenza di una nicchia staminale è stata formulata per la prima volta nel 1978 da Schofield per descrivere il microambiente specializzato della cellula staminale e per chiarirne il legame con la corretta funzionalità cellulare. (Schofield R, 1978).

1.3 Il differenziamento delle MSC in senso adipogenico

Nel differenziamento delle MSC in senso *adipogenico*, l'*attivazione sequenziale* dei diversi fattori di trascrizione risulta fondamentale affinché avvengano i tipici cambiamenti morfologici e fisiologici osservati nelle cellule progenitrici. Tali cambiamenti riguardano in particolare l'arresto del ciclo cellulare, una riprogrammazione metabolica e l'accumulo di lipidi all'interno della cellula stessa (Ghabenand Scherer, 2019).

In particolare l'attivazione del peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) gioca un ruolo chiave nella promozione del processo di differenziamento e nel mantenimento in vita dell'adipocita adulto (Rosen et al., 2002). Evidenze scientifiche dimostrano che PPAR γ risulta essere il principale regolatore dell'adipogenesi e che l'inibizione di questo fattore di trascrizione sopprime il processo stesso (Rosen et al., 2002).

PPAR γ appartiene alla famiglia dei recettori nucleari ormonali, noti per il loro ruolo nella regolazione di diversi geni coinvolti nella omeostasi del glucosio, nel metabolismo lipidico e nella differenziazione degli adipociti (Xiao-Feng Li et al, 2017). La sua attivazione induce l'espressione di altri geni coinvolti nella sensibilità all'insulina, nella lipogenesi e nella lipolisi. Tra questi è importante menzionare la fatty-acid-binding protein (FABP4) che, insieme a PPAR γ , rappresenta un componente chiave nelle prime fasi del processo, perilipin (PLIN) (coinvolto nella sintesi e nell'immagazzinamento degli acidi grassi negli adipociti) (Arimura et al., 2004), la leptina (LEP) (Zhang et al., 2018) e l' adiponectina (ADIPOQ) (Lefterova et al., 2008), entrambe secrete.

2. Polifenoli

I polifenoli costituiscono uno dei gruppi maggiormente estesi e diffusi di metaboliti secondari, presenti nel regno vegetale.. Strutturalmente si presentano come composti organici che possiedono uno o più gruppi ossidrilici legati ad un anello aromatico (Figura 1).

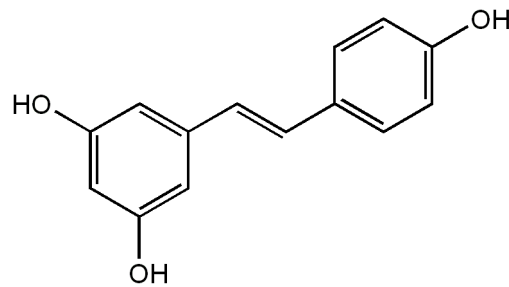


Figura 1: Struttura chimica dei polifenoli

Ad oggi, sono state identificate oltre 8000 strutture tra cui diverse centinaia isolate da piante commestibili. Le principali fonti da cui questi composti possono essere isolati sono frutta, verdura, noci e semi, foglie di diverse piante, ed alimenti processati quali caffè, cacao, tè e vino rosso. (Gorzynik-Debicka M. et al, 2018).

Questi composti possono essere classificati in diversi gruppi in funzione del numero di anelli fenolici che contengono e degli elementi strutturali che legano tali anelli fra loro. E' possibile individuare quattro classi (Mojtahedin A et al, 2018) (Figura 2).

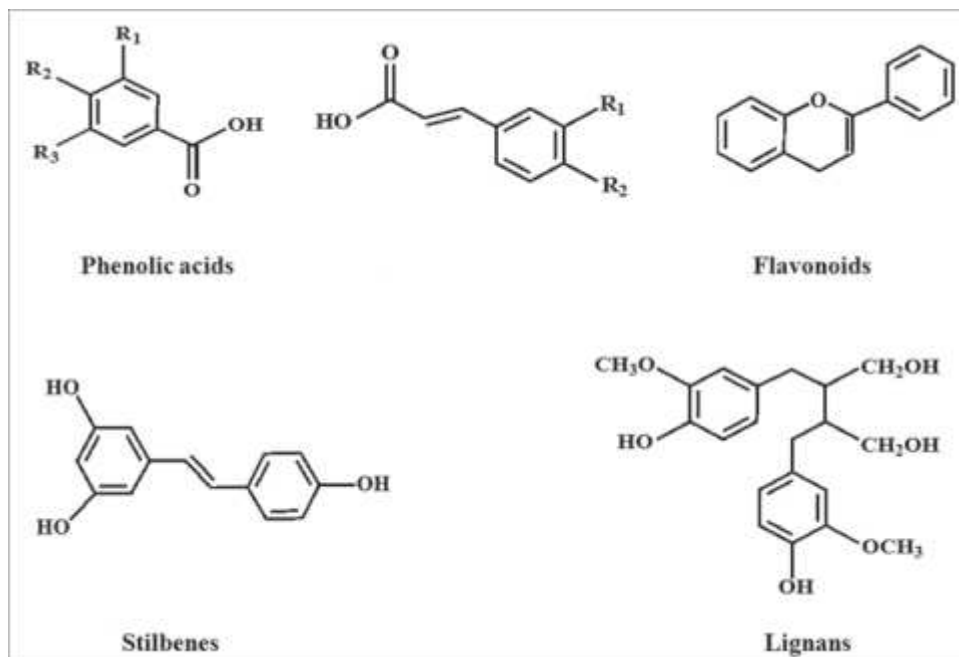


Figura 2: Strutture chimiche delle principali classi di polifenoli

:

- **Acidi fenolici:** sono composti organici che contengono almeno un gruppo ossidrilico fenolico e un gruppo carbossilico. In base alla loro derivazione è possibile distinguerli in due gruppi, gli *acidi idrossibenzoici* con derivazione dall'acido benzoico e gli *acidi idrossicinnamici* con derivazione dall'acido cinnamico. Il contenuto di acidi idrossibenzoici nelle piante di cui l'uomo può nutrirsi è molto basso; gli acidi idrossicinnamici sono invece più comuni e possono essere trovati in abbondanza nel mondo vegetale. L'*acido gallico* è una delle molecole più rappresentative di questa classe.
- **Flavonoidi:** sono composti organici assolutamente caratteristici ed ubiquitari delle piante superiori. Fra questi rivestono particolare importanza i *flavonoli* che hanno come maggiori rappresentanti la *quercetina* e il *canferolo*, presenti soprattutto nelle cipolle, nei broccoli e nei mirtili. I flavonoidi presentano tre sottoclassi costituite dai *Flavoni*, *Isoflavoni* e *Neoflavoni*.
- **Stilbeni:** sono composti organici poco presenti nella dieta umana. Uno di questi, il *Resveratrolo*, è stato oggetto di studi per i suoi effetti anticancerogeni ed è contenuto a basse concentrazioni nel vino rosso (5mg/L)
- **Lignine:** sono composti organici principalmente presenti nella parete cellulare di alcune cellule vegetali

2.1 L'importanza dei polifenoli in ambito Biomedico

Storicamente i polifenoli sono stati oggetto di studio per il loro importante potere antiossidante ed antiinfiammatorio. L'interesse verso queste molecole, per possibili applicazioni in ambito biomedico, è aumentato esponenzialmente negli ultimi decenni. Diversi studi, condotti prevalentemente *in vitro*, dimostrano effetti benefici da parte di questi composti tra cui attività anti-infiammatorie, -virali, -batteriche, -ossidanti, cardioprotettive e neuroprotettive. (Barbieri R. et al, 2017; Veljković M. et al, 2017)

2.2 Proprietà dei polifenoli

Oltre ad avere un ruolo importante nella prevenzione di alcune patologie dell'uomo, i polifenoli modulano l'attività di diversi enzimi e recettori cellulari (Manach et al, 2005). Inoltre, possono essere coinvolti nella risposta immunitaria grazie alla loro capacità di regolare la proliferazione di globuli bianchi, la produzione di importanti citochine e di altri fattori legati alla difesa immunologica; possiedono infatti proprietà anti-allergiche, anti-aterogeniche ed anti-trombotiche

(Gorzynik-Debicka M. et al, 2018). Gli effetti di queste molecole sulla salute dipendono dalla quantità consumata e dalla loro biodisponibilità. Uno dei principali obiettivi delle indagini di biodisponibilità è di determinare, tra le centinaia di polifenoli alimentari, quelli che vengono maggiormente assorbiti e metabolizzati con conseguente produzione di metaboliti attivi. Studi recenti hanno dimostrato che gli *isoflavoni* e *l'acido gallico* sono i polifenoli che vengono maggiormente assimilati nell' organismo umano, seguiti da *flavoni* e *quercitina* (Manach et al, 2004).

2.3 Foglie d' Olivo: estratto, contenuto e proprietà

L'albero d'Olivo è una delle specie maggiormente coltivate nel Mediterraneo. La sua presenza è largamente diffusa in molte altre regioni del Mondo, come l'Arabia, l'India e l'Asia. (Somova LI et al., 2003)

Uno dei principali prodotti ottenibili dalla lavorazione dei frutti d'Olivo è l'olio, che rappresenta sicuramente uno fra gli alimenti più noti della dieta mediterranea e che è stato largamente studiato per le sue proprietà anti-ossidanti.(Japon-Lujan R et al., 2006) dovute alla grande quantità di composti fenolici di cui tale elemento dispone. (Vogel P et al., 2014)

Le foglie d'Olivo (*Olea europaea*) sono un sottoprodotto del processo di lavorazione dell'olio d'oliva. Vengono comunemente usate come mangime per animali oppure bruciate assieme a rami in eccesso provenienti dalla potatura. L'interesse verso questo sottoprodotto, per possibili applicazioni in campo biomedico, è cresciuto molto negli ultimi anni grazie all'elevata concentrazione di composti fenolici contenuti e per i bassi costi di reperibilità. In particolare, le foglie d'olivo hanno un contenuto in polifenoli molto più elevato rispetto all'olio d'oliva. (Japon-Lujan R et al, 2006)

I fenoli presenti nelle foglie d'olivo sono numerosi e di diversa natura. E' possibile individuarne cinque classi (Vogel P et al, 2014):

- Oleuropeosidi (oleuropeina e verbascoside)
- Flavoni (luteolin-7-glucoside, apigenin-7-glucoside, diosmetin-7-glucoside, luteolina e diosmetina),
- Flavonoli (rutina),
- Flavan-3-oli (catechina),
- Fenoli derivati (tirosolo, idrossitirosolo, vanillina, acido vanillico e acido caffeico)

L'oleuropeina è sicuramente il composto fenolico maggiormente presente nelle foglie. Sono state inoltre individuate alte concentrazioni di composti come idrossitirosole, luteolin-7-glucoside, apigenin-7-glucoside e verbascoside. (Goldsmith C.D., 2015; Vogel P et al, 2014)

Le molteplici proprietà benefiche derivanti dal consumo di olio d'oliva, sono state attribuite principalmente alla presenza di oleuropeina. Numerosi studi condotti sia *in vitro* che *in vivo* hanno dimostrato le sue proprietà anti-aterogeniche, -infiammatorie, -microbiche, -ipertensive, ipoglicemiche, ipocolesterolemiche e cardioprotettive (Vogel P et al, 2014).

L'oleuropeina è stata inoltre studiata per la sua possibile attività anti-cancerogena. Diversi studi condotti *in vitro* dimostrano che è in grado di inibire la proliferazione e la migrazione di molte linee cellulari tumorali umane (Hamdi H.K., 2005; Imrna M et al, 2018).

Numerose ricerche hanno dimostrato come l'estratto di foglie d'Olivo abbia la capacità di diminuire la pressione sanguigna negli animali, aumentare il flusso sanguigno all'interno delle arterie coronarie, alleviare l'aritmia e prevenire gli spasmi muscolari intestinali (Garcia O.B. et al, 2000).

Grazie agli studi effettuati da Olmez et al su alcuni esemplari di topi da laboratorio è stata registrata una sensibile diminuzione della percentuale di colesterolo LDL nel sangue dei roditori dopo una dieta che prevedeva il consumo regolare dell'estratto. Tali risultati suggeriscono una possibile implicazione nel miglioramento del quadro lipidico nell'ipercolesterolemia (Olmez E. et al, 2015).

3 La senescenza cellulare, l'invecchiamento e le patologie età associate

L'invecchiamento cellulare è definito come il cambiamento persistente e tempo dipendente delle funzionalità e riproducibilità che interessa ogni sistema vivente superiore. L'aumento dell'aspettativa di vita nei paesi sviluppati ha determinato un aumento dell'incidenza delle più comuni patologie legate all'età quali disordini neurodegenerativi, patologie cardiovascolari, il diabete, osteoartrite e il cancro (Flatt T., 2012).

Le ricerche scientifiche degli ultimi anni hanno suggerito differenti teorie che cercano di spiegare questo processo biologico. Finora non esiste una teoria unificante che spieghi tutte le possibili modalità attraverso cui l'invecchiamento si realizza (Höhna A. et al, 2017).

Durante la vita di un organismo le cellule sono costantemente esposte ad agenti di stress esogeni ed endogeni. Le cellule possono far fronte a questi elementi stressogeni attraverso vari meccanismi di risposta o, in caso di danno irreparabile, andare incontro a morte cellulare programmata (apoptosi) o arrestare in modo irreversibile il ciclo cellulare (senescenza cellulare). (Salama R. et al., 2014)

Lo stato di senescenza cellulare è caratterizzato dall'arresto irreversibile del ciclo cellulare accompagnato, diversamente da quello che accade nella quiescenza e in altri tipi di condizioni che non prevedono la proliferazione, da una caratteristico fenotipo secretorio associato a questo stato (senescence-associated secretory phenotype, SASP). Il precedente acronimo fa riferimento ad un eterogeneo gruppo di molecole che le cellule senescenti, metabolicamente attive ma non più proliferanti, riescono a produrre e che contribuisce ad uno stato pro-infiammatorio sistemico (inflammaging) (Gurău F et al., 2018).

Tra le varie molecole liberate e che contribuiscono alla propagazione e al mantenimento di questo stato vi sono le citochine proinfiammatorie, in particolare IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , NF- κ B, TGF- β , (Uchide N. et al, 2012; Rea IM et al, 2018).

Diversi fattori, sia ambientali che genetici, contribuiscono all'invecchiamento cellulare, caratterizzato principalmente da accumulo di DNA danneggiato, deterioramento telomerico e diverse alterazioni epigenetiche.

Tali cambiamenti biochimici sono accompagnati da alterazioni morfologiche: le cellule senescenti mostrano una forma allargata, appiattita e irregolare, un nucleo più grande ed un aumento del numero di vacuoli citoplasmatici (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007).

Non esiste una singola caratteristica in grado di definire in maniera univoca e specifica la senescenza cellulare ma, attraverso la valutazione di un pattern di marcatori che la cellula esprime, è possibile individuare tale stato biologico. (Coppé JP et al., 2010). Tuttavia, nella senescenza cellulare è stata riscontrata un'intensa attività da parte dei lisosomi nella produzione dell'enzima β -galattosidasi. Quest'ultimo è uno dei marcatori più usati nell'identificazione della senescenza nelle cellule e nei tessuti sia *in vivo* che *in vitro*. (Lidzbarsky G. et al., 2018).

Le cellule senescenti, accumulandosi nei tessuti e negli organi, causano disfunzione d'organo, compromettendo così la salute dell'organismo (Lidzbarsky G. et al, 2018).

Diversi studi hanno evidenziato che l'infiammaging e l'alterazione delle funzioni d'organo sono responsabili dell'insorgenza delle malattie associate all'età, come l'aterosclerosi, l'artrite reumatoide, le patologie neurodegenerative ed il cancro (Erusalimsky JD & Kurz DJ, 2005; Chalan P et al, 2015)

La senescenza cellulare è un fenomeno biologico che interessa anche le MSC. Anche nelle MSC infatti, arrivate ad uno stato di senescenza, si registra l'arresto del ciclo cellulare in fase G1, il cambiamento della propria morfologia e un aumento dell'espressione di geni che codificano per proteine associate alla senescenza, come la β -galattosidasi e la α -L-fucosidasi.(Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Le MSC senescenti tendono a diventare ipertrofiche, con nuclei irregolari e citoplasma granulare. Mostrano inoltre una elevata quantità di fibre di actina e risultano, *in vitro*, meno aderenti alla superficie della piastra (Li Y et al, 2017).

Diversi studi sono stati rivolti verso le conseguenze del raggiungimento dello stato di senescenza nelle MSC. Quello che è emerso è che, al pari delle altre cellule senescenti, le MSC possono essere coinvolte nella propagazione di segnali pro-senescenti e presentare delle alterazioni funzionali (Turinetti V et al, 2016). Inoltre, le MSC senescenti mostrano lo stesso fenotipo secretorio associato alla senescenza (SASP) che contribuisce all'aumento del quadro infiammatorio sistemico andando così ad alterare il funzionamento delle cellule vicine e la qualità del microambiente tissutale (Sepúlveda JC et al, 2014). Tali eventi, considerando il ruolo fondamentale delle MSC nella riparazione e rigenerazione tissutale, contribuiscono alla riduzione della capacità di adattamento e di guarigione (Acosta JC et al, 2008).

L'invecchiamento cellulare, insieme ad altri processi di interesse Biologico, contribuisce all'aumento del tessuto adiposo midollare (Barcenilla-Wong AL et al, 2015). Quest'ultimo possiede delle caratteristiche che lo differenziano da tutti gli altri tipi di tessuto ed è stato perciò studiato per il suo probabile ruolo nella fisiopatologia di importanti disordini metabolici (Cordes C et al, 2016). Il tessuto adiposo midollare (MAT) Infatti, è funzionalmente distinto sia dal tessuto adiposo bianco che dal tessuto adiposo bruno tanto da essere considerato un vero e proprio organo che può contribuire al metabolismo sistemico e scheletrico. (Scheller EL & Rosen CJ, 2014).

Diversi studi condotti *in vivo* si sono soffermati sulla relazione tra il MAT e il tessuto osseo. Ciò che è emerso è stata una diminuzione dell'attività degli osteoblasti, del numero degli osteoclasti e della responsività a stimoli di natura osteoanabolica proporzionale all'accumulo eccessivi di MAT (Pun S et al, 2001).

Tali risultati suggeriscono una correlazione fra l'accumulo di MAT e perdita di massa ossea, situazione che si può riscontrare in importanti patologie per l'uomo, come l'osteoporosi (Scheller EL & Rosen CJ, 2014).

L'osteoporosi è una malattia sistemica, età associata, caratterizzata da una riduzione della massa ossea e da un'alterazione della microarchitettura del tessuto scheletrico, che diventa più fragile e quindi più soggetto a rischio di fratture (Sözen T et al, 2017).

SCOPO DEL LAVORO

L'infiammazione cronica sistemica è una caratteristica dell'invecchiamento ed i suoi livelli sono direttamente correlati al rischio di sviluppare patologie età-associate (Age Related Diseases, ARDs), quali malattie cardiovascolari, diabete di tipo 2, malattie neurodegenerative ed osteoporosi. Pertanto ogni azione mirata a ridurre tale infiammazione può risultare utile nella prevenzione o nel controllo di tali patologie.

Attualmente c'è un grande interesse nei confronti dei potenziali effetti benefici, e tra questi quelli anti-infiammatori, dei nutraceutici, ovvero quei principi nutritivi contenuti in alcuni cibi e che possono essere estratti e utilizzati come integratori alimentari, oppure addizionati negli alimenti. Infatti è raro trovarli negli alimenti naturali in quantità sufficienti ad ottenere dei benefici.

Le foglie di olivo sono una matrice vegetale che contiene alte concentrazioni di composti bioattivi (Oleuropeina, tirosolo ed idrossitirosolo in primis) con potenziale attività antiossidante e antiinfiammatoria e potrebbero essere sfruttati per contrastare i meccanismi attraverso cui le cellule senescenti diffondono l'infiammazione a livello sistemico.

Lo scopo della mia tesi è stato quello di valutare se un estratto ottenuto a partire da foglie di olivo (OLE, Olive Leaf Extract) provenienti da coltura biologica, non trattate con alcuna sostanza chimica, potesse avere effetti anti-infiammatori e "anti-senescenza".

A tale scopo l'effetto anti-infiammatorio dell'estratto OLE è stato testato *in vitro* su modelli cellulari già studiati nel laboratorio di Patologia Sperimentale, in particolare le cellule mesenchimali staminali (MSC) umane prelevate da midollo osseo e gli adipociti ottenuti dalle stesse MSC coltivandole in terreno pro-differenziante.

Per valutare l'effetto antiinfiammatorio di OLE sono stati analizzati dei marcatori biomolecolari. In particolare, è stata valutata l'espressione genica delle citochine IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α .

Inoltre, considerando che con l'invecchiamento si osserva un aumento del tessuto adiposo midollare, che è associato all'osteoporosi, è stata valutata l'ipotesi che OLE potesse avere un effetto anti-adipogenico valutando l'espressione di diversi marcatori specifici, quali PPAR- γ , FABP4, PLIN1, LEPTIN e ADIPQ e la presenza di goccioline lipidiche.

MATERIALI E METODI

1. OLE: Metodo di estrazione

Le foglie d'Olivo, una volta raccolte, vengono disidratate e poi sottoposte a macinatura. Per l'eliminazione dell'acqua dalla matrice vegetale è stato utilizzato un liofilizzatore (Heto DryWinner 6-85).

Dalla precedente lavorazione si ottiene una polvere sottile, che viene messa a macerare in PBS a 4°C per 24 ore. L'estratto così ottenuto, denominato OLE (Olive leaves extract), viene centrifugato per separare le particelle di dimensioni maggiori e poi filtrato con l'uso di una membrana dotata di appositi filtri dal diametro di 0,22 µm per ottenere la sterilità del prodotto senza alterare le sue caratteristiche biochimiche (Figura 3). Il prodotto ottenuto è stato aliquotato in eppendorf da 0,5 ml e conservato a -20 °C fino all'utilizzo.

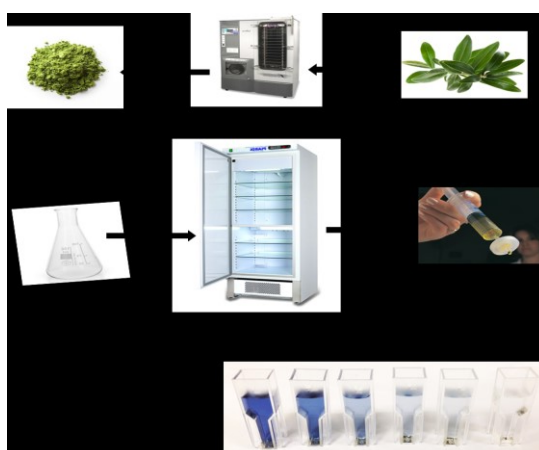


Figura 3: Le fasi del metodo di estrazione di OLE

2. Caratterizzazione di OLE: determinazione del contenuto totale dei composti fenolici

Per stimare la concentrazione totale dei composti fenolici presenti nell'estratto (TPC, Total Phenol Content) è stato effettuato il saggio di caratterizzazione Folin-Ciocalteu. Il Folin-Ciocalteu Reagent (FCR) è formato da due acidi, il fosfomolibdeno ed il fosfotungsteno. La reazione fra il FCR e i fenoli avviene in condizioni basiche a pH ~10 (ottenuto con l'aggiunta di una soluzione di Na₂CO₃). In queste condizioni i fenoli sono dissociati (anione fenolato) e in grado di ridurre il FCR. Vengono così a crearsi dei composti con una caratteristica colorazione blu. Il colore che si sviluppa è indipendente dalla struttura dei composti fenolici,

ma la sua intensità è legata in maniera direttamente proporzionale alla quantità di polifenoli totali presenti nell'estratto. Questo significa che maggiore è l'intensità della colorazione, maggiore sarà la quantità di polifenoli contenuta nell' OLE. Per valutare l'intensità della colorazione e risalire alla concentrazione, partendo dall'Assorbanza, è stato utilizzato uno spettrofotometro. Grazie alla curva standard realizzata ad inizio esperimento, sarà quindi possibile ricavare le concentrazioni incognite per interpolazione dei risultati contro curva.

Il protocollo usato prevede i seguenti passaggi:

- Preparazione della retta di taratura con l'utilizzo dell'acido gallico disciolto in acqua a diverse concentrazioni.
- Preparare la soluzione di Na_2CO_3 per alcalinizzare l'ambiente di reazione
- Stabilire, confrontandosi con la letteratura scientifica, 6 valori di concentrazione da usare come standard di riferimento
- Preparare la soluzione madre, costituita da 1000 μg di acido gallico in 1 mL di acqua.
- Preparare le diverse aliquote dalla soluzione madre, ricavando la giusta concentrazione di acqua e acido gallico con le opportune diluizioni

Applicare ora il seguente protocollo sperimentale:

- Aggiungere 100 μL di campione insieme ad 1 mL di reagente diluito con acqua 1:10
- Dopo 3', aggiungere 900 μL di Na_2CO_3 al 7%
- Incubare a temperatura ambiente e al buio per 90'
- Lettura allo spettrofotometro a 760nm per ricavare la concentrazione di polifenoli totali

3. Colture cellulari

Le cellule mesenchimali staminali sono state acquistate dalla Lonza (Basel, Switzerland). Una volta scongelate, le cellule sono state seminate in una fiaschetta T25 e coltivate in atmosfera umida a 37°C al 5% di CO_2 in terreno di mantenimento α -MEM, addizionato con 10% FBS, 1% di 2mM L-glutammina e 1% di 100 U/mL penicillina/streptomicina. Per il loro mantenimento, raggiunta una confluenza ottimale, non superiore al 70%, le cellule vengono staccate dalla superficie della fiasca grazie all'azione della tripsina e seminate in nuove fiasche o piastre (a seconda delle esigenze) alla concentrazione di 6000 cellule per cm^2 (Figura 4).

Multi-well	Superficie(cm ²)	Volume(mL)
96	0,32	0,1-0,2
48	1	0,3-0,6
24	1,88	0,5-1,2
12	3,83	1,0-2,4
6	9,40	2,0-3,0

Figura 4: Tabella con le principali piastre per la coltura cellulare e loro caratteristiche

3.1 Differenziazione adipogenica

Per il differenziamento adipogenico, le cellule vengono coltivate per 15 giorni in terreno adipogenico α -MEM 10% FBS addizionato con:

- IBMX 0,45 mM
- Indometacina 0,2 mM
- Insulina 5 ug/mL
- Desametasone 0,5 uM

In questo periodo di tempo si assiste ad un cambiamento morfologico delle MSC che consiste nell'aumento delle dimensioni, nella variazione della forma e nel progressivo accumulo di vescicole lipidiche intracellulari.

3.2 Colorazione con Oil Red

La colorazione Oil Red è utilizzata nella caratterizzazione degli adipociti e consiste in una soluzione di sei parti di soluzione satura di colorante (0,5% Oil Red in isopropanolo) e quattro parti di acqua deionizzata. La colorazione viene realizzata come di seguito descritto:

- Lavaggio delle colture cellulari con PBS
- Fissaggio con paraformaldeide al 4% per 5'
- Incubazione per 20' a temperatura ambiente in leggera agitazione con la soluzione Oil Red
- Filtrazione dopo 10' con un filtro da 0,2 μ m
- Lavaggio con acqua deionizzata per eliminare tutto il colorante in eccesso
- Contro-colorazione con blu di metilene per visualizzare le MSC non differenziate

Gli adipociti vengono quindi osservati al microscopio ottico. Questi appaiono come cellule tonde contenenti vescicole lipidiche di colore arancio-rosso.

3.3 Saggio β -Galattosidasi per la valutazione della senescenza cellulare

Il saggio per lo studio della senescenza cellulare si basa sulla valutazione dell'enzima β -Galattosidasi, che risulta essere iper-espresso nelle cellule senescenti.

Il saggio è di natura colorimetrica: viene utilizzata una particolare mix di reazione contenente il marcatore X-GAL che, legando la β -Galattosidasi, conferisce una colorazione blu alle cellule senescenti, visibile al microscopio ottico.

Nel nostro lavoro, è stato valutato il livello di senescenza delle cellule MSC. Le MSC, andando incontro a senescenza replicativa, perdono progressivamente diverse proprietà tra cui proprio il potenziale differenziativo.

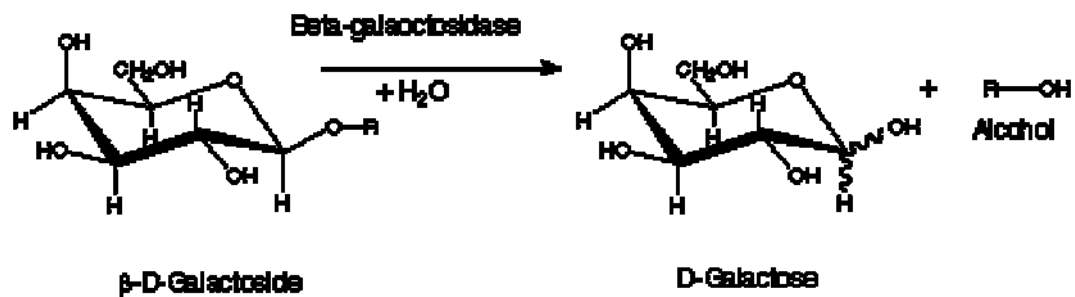


Figura 5: reazione della Beta-galattosidasi

Per i successivi esperimenti, colture di cellule giovani (P3-P6) sono state utilizzate per valutare l'effetto dell'estratto di foglie di olivo sul differenziamento adipogenico; Colture cellulari in uno stato avanzato di senescenza replicativa (P19-P21) sono state invece utilizzate al fine di valutare il potenziale effetto anti-infiammatorio dell'estratto.

Il saggio viene allestito come di seguito descritto:

- Rimozione del terreno di coltura da ogni pozzetto
- Lavaggio con 500 μ L di PBS
- Aggiunta di 300 μ L di fissativo
- Preparazione della mix di reazione: In una Falcon da 15 verranno inserite Staining Solution 282 μ L, Staining Supplement 3 μ L e X-GAL 15 μ L (le concentrazioni riportate si riferiscono ad un pozzetto di una piastra da 24 well)
- Eseguire due lavaggi con 500 μ L di PBS

- Aggiunta di 300 μ L di mix
- Coprire la piastra con della carta stagnola (per la fotosensibilità dell'X-GAL)
- Incubazione in stufa a 37°C
- Conta delle cellule al microscopio e valutazione colorimetrica della senescenza

3.4 Saggio MTT per la valutazione della vitalità cellulare

Il saggio MTT, dove la sigla indica il composto bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, è un saggio colorimetrico standard per la misurazione dell'attività degli enzimi che riducono l'MTT a formazano, conferendo alla sostanza un colore blu/violaceo. Ciò accade prevalentemente nei mitocondri. Il saggio può essere utilizzato per determinare la citotossicità di farmaci o altri tipi di sostanze chimicamente attive e potenzialmente tossiche. L'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, è attivo infatti soltanto nelle cellule vive, e la sua funzione consiste nel tagliare l'anello di tetrazolio dell'MTT (sostanza di colore giallo) con la formazione di formazano (un sale blu). Quindi il saggio MTT serve a valutare la diminuzione di vitalità delle cellule servendosi di un agente ossidante cromogeno. Tale reazione è valutata e misurata mediante la lettura spettrofotometrica del campione, alla lunghezza d'onda di 570 nm. Il risultato è un dosaggio sensibile con eccellente linearità fino a circa 106 cellule per pozzetto. Le condizioni di coltura utilizzate per far crescere le cellule possono influenzare i risultati e devono essere presi in considerazione durante l'analisi dei dati. L'età della coltura, il numero di passaggi e le caratteristiche del mezzo di crescita possono essere tutti fattori importanti.

I reagenti necessari per allestire il saggio sono:

- MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide (MW = 414, Component A), 5 mg/ml
- SDS sodiododecilsolfato (MW = 288, Component B), 1g
- PBS
- HCl sterile
- DMSO

Il protocollo sperimentale utilizzato prevede i seguenti passaggi:

- Per le cellule adese alla superficie si inizia con la rimozione del terreno; lo si sostituisce poi con 100 μ l di terreno fresco. Per le

cellule non adese, ma in sospensione, si fa centrifugare la fiasca ottenendo un pellet di cellule e si rimuove poi velocemente il terreno e lo si risospende con 100 µl di terreno fresco.

- Aggiungere 10 µl della soluzione madre 12 mM MTT in ogni well. Incluso nel controllo negativo di 10 µl della soluzione stock MTT.
- Incubare a 37° per quattro ore. Ad alte densità cellulare il tempo di incubazione può essere ridotto a due ore.
- Aggiungere 100 µl della soluzione SDS-HCl in ogni well e mescolare bene.
- Incubare la piastra a 37° per quattro ore in una camera umida.
- Mescolare nuovamente ciascun campione con una pipetta e leggere l'assorbanza a 570nm.

4. Estrazione dell'RNA totale da pellet cellulari e quantificazione al NANODROP

Il campione di partenza è rappresentato da pellet cellulari trattati precedentemente con l'estratto naturale e conservati a -80 °C.

L'Estrazione dell'RNA totale viene eseguita con l'utilizzo del Total RNA Purification Kit (Norgen, Biotek Corporation)(Figura 5):

Il kit contiene i reagenti ed il materiale di seguito elencato per completare in autonomia l'intera procedura di estrazione, seguendo quanto riportato dal relativo protocollo esecutivo.

Il protocollo prevede i seguenti passaggi:

- Aggiungere 350 µL di BUFFER RL
- Vortexare per 15"
- Aggiungere 200 µL di Etanolo
- Vortexare per 10"
- Centrifugare velocemente ciascun campione in modo da concentrare il più possibile la quantità di cellule presenti
- Trasferire l'intero lisato nella *collection tube*
- Centrifugare a 6000.0 RPM per 1'
- Eliminare l'eluato presente e riassemblare la *collection tube*
- Aggiungere 400 µL di *wash solution*
- Centrifugare a 11000.0 RPM per 1'

- Eliminare l'eluato presente e riassemblare la *collection tube*
- Ripetere gli ultimi tre passaggi per un totale di tre volte
- Centrifugare a 13000.0 RPM per 2'
- Eliminare la *collection tube*
- Conservare la colonna di estrazione
- Inserire la colonna di estrazione nella *elution tube*
- Aggiungere 30 μ L di *Elution Solution*
- Centrifugare a 2000.0 RPM per 2'
- Centrifugare a 14000.0 RPM per 1'
- Eliminare la colonna di estrazione
- Conservare l'eppendorf di eluizione

L'ultima eppendorf conterrà l'RNA estratto presente come eluato, pronto per essere utilizzato o conservato.

Una volta conclusa l'estrazione, l'RNA, mantenuto in ghiaccio, viene quantificato mediante lo strumento NANODROP. Le concentrazioni ottenute dallo strumento vanno confrontate con degli standard di riferimento per verificare la purezza dell'estratto.

Flowchart
Procedure for Purifying Total RNA using Norgen's Total RNA Purification Kit

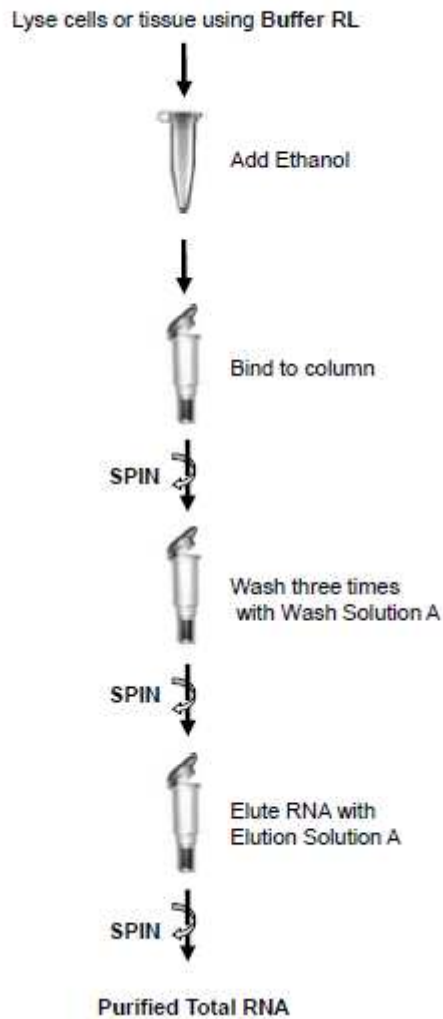


Figura 6: protocollo di estrazione di Total RNA

5. Retrotrascrizione

La Retrotrascrizione (RT) è una tecnica di Biologia Molecolare che permette di ottenere una sequenza di DNA a singolo filamento, detto cDNA o DNA complementare, a partire da una sequenza di RNA a singolo filamento. La RT viene effettuata seguendo il protocollo dedicato presente nel kit di riferimento (*PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser*); tale metodica prevede i seguenti passaggi:

- Preparare un numero sufficiente di eppendorf da 0,2 mL, una per ogni campione da retrotrascrivere, che conterranno la prima mastermix, il cui allestimento viene illustrato nel punto seguente.
- Preparare la soluzione per l'eliminazione del DNA genomico in ghiaccio (prima mastermix). Quest'ultima avrà un volume sufficiente per tutte le

reazioni necessarie. Il volume totale di reazione è di 10 µL. Il kit prevede che, per ogni singolo campione, la mastermix sia composta da (Figura 7)

2,0 µL di gDNA Eraser Buffer
1,0 µL di gDNA Eraser
1,0 µg di Total RNA for SYBR® Green qPCR assay
RNase Free dH2O

Figura 7: Concentrazioni e reagenti utilizzati per il protocollo della retrotrascrizione nella prima mastermix

- L'RNA campione va aggiunto alla fine, dopo aver dispensato una corretta quantità di mix (Volume totale – volume del Total RNA) nelle eppendorf dedicate.
- Alla fine dell'allestimento, la soluzione ottenuta viene fatta incubare a 42°C per 2' oppure a temperatura ambiente per circa 30'.
- Preparare un numero sufficiente di eppendorf da 0,2 µL in base alla numerosità dei campioni presenti
- Preparare la soluzione per la reazione di RT in ghiaccio (seconda mastermix). Anche in questo caso occorre un volume sufficiente per coprire tutte le reazioni necessarie e considerare un eccesso di due. Il volume totale di reazione è di 10 µL. Il kit utilizzato specifica che, per ogni singolo campione, la seconda mastermix sia composta da:

4,0 µL di 5X PrimeScript Buffer 2 (for Real Time)
1,0 µL di PrimeScript RT Enzyme Mix
1,0 µL di RT Primer Mix
4,0 µL di RNase Free dH2O

Figura 8 : Concentrazioni e reagenti utilizzati per il protocollo della retrotrascrizione nella seconda mastermix

- Aggiungere alla soluzione così ottenuta 10 µL della prima mastermix. In questo modo si otterrà una soluzione finale di 20 µL.
- Ripetere il punto precedente per ogni campione presente
- Dare una leggera vortexata
- Incubare a 37°C per 15'
- Centrifugare ogni singolo campione

- Posizionare i campioni nel termociclatore scegliendo il programma dedicato

A corsa conclusa, le eppendorf saranno messe in ghiaccio pronte per la Real-Time PCR.

6. Real-Time PCR

La Real-Time PCR (RT-PCR) è una variante della PCR in grado di offrire un'analisi qualitativa e quantitativa del cDNA presente nel campione di partenza.

Questa tecnica di Biologia Molecolare sfrutta delle sonde di DNA marcate con specifici fluorocromi complementari alla sequenza che deve essere amplificata.

In questo lavoro è stato utilizzato il *SYBR Green* come sonda, un agente intercalante ad alta affinità per le molecole di DNA e cDNA.

La RT-PCR lavora su campioni di DNA o di cDNA nel caso in cui si debba valutare l'espressione genica.

L'intera reazione viene eseguita all'interno di un termociclatore. (Figura 8)

Maggiore è il segnale che viene emesso dal fluorocromo, maggiore sarà la quantità di DNA/cDNA estratto. Grazie ad un rilevatore ottico installato nel termociclatore stesso e ad un software dedicato è possibile convertire il segnale luminoso in valore numerico, ricavando così la concentrazione dell'acido nucleico di interesse.

In questa tesi verrà descritta la RT-PCR relativa alla valutazione dell'espressione genica e quindi effettuata a partire da un campione di cDNA.

Prima di procedere, occorre controllare di avere a disposizione:

- Foglio di lavoro sul quale è stato riportato l'ordine di dispensazione da seguire durante la preparazione
- Reagenti necessari per l'amplificazione (specificati nella tabella relativa alla mix)
- Eppendorf da 1.5 mL per la preparazione delle mix
- Strip di quattro provette (PCR Tubes 0,2 mL) ciascuna per la dispensazione del volume di mix stabilito dal protocollo

La RT-PCR prevede che si lavori in doppio e che venga inoltre preparata per un campione in più rispetto a quelli presenti.

Si inizia con l'allestimento delle mix di reazione, una per ogni gene di interesse. Per questo passaggio viene utilizzata una Eppendorf da 1.5 mL.

Il protocollo adottato specifica che una singola mix, per un totale di 10 µL di volume di reazione, sia composta da (Figura 9)

3,6 µL di acqua milliQ
5,0 µL di SYBR Green
0,2 µL di FW primer
0,2 µL di RW primer
1,0 µL di cDNA (aggiunto soltanto alla fine)

Figura 9 : Concentrazioni e reagenti utilizzati nel protocollo della RT-PCR

Le sequenze dei primer utilizzati nella reazione di Real Time PCR sono:

- IPO8 FW: CGTTCCTCCTGAGACTCTGC
- IPO8 RV: GAATGCCCACTGCATAGGTT
- PPAR- γ FW: AGCCTCATGAAGAGCCTTCCA
- PPAR- γ RV: ACCCTTGCATCCTTCACAAGC
- FABP4 FW: TCACCTGGAAGACAGCTCCT
- FABP4 RV: AAGCCCACTCCCCTTCTTT
- PLIN1 FW: GAAAAGATCCCCGCCCTCC
- PLIN1 RV: CTGATGCTGTTTCTGGCACTG
- LEPTIN FW: GGCTTTGGCCCTATCTTTTC
- LEPTIN RV: CCAAACCGGTGACTTTCTGT
- ADIPQ FW: CCTAAGGGAGACATCGGTGA
- ADIPQ RV: GTAAAGCGAATGGGCATGTT
- ACTIN FW: TGAGAGGGAAATCGTGCGTG
- ACTIN RV: TGCTTGCTGATCCACATCTGC
- IL-1 β FW: CTCGCCAGTGAAATGATGGCT
- IL-1 β RV: GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT
- IL-8 FW: AAGAGAGCTCTGTCTGGACC
- IL-8 RV: GATATTCTCTTGGCCCTTGG

- IL-6 FW: TGCAATAACCACCCCTGACC
- IL-6 RV: GTGCCCATGCTACATTTGCC
- TNF- α FW: AGGACCAGCTAAGAGGGAGA
- TNF- α RV: CCCGGATCATGCTTTTCAGTG

Una volta pronte, da ciascuna mix vengono prelevati 9 μ L e trasferiti nelle corrispettive strip, seguendo l'ordine di dispensazione riportato sul foglio di lavoro.

A questo punto è possibile aggiungere 1 μ L di cDNA(campione) in ogni strip.

Una volta ultimata la dispensazione, le strip vengono chiuse e trasferite al Rotor-Gene Q per l'amplificazione.

Ad analisi ultimata, della durata di circa 90', vengono valutati i risultati registrati nel processo di amplificazione attraverso una Statistica dei dati.

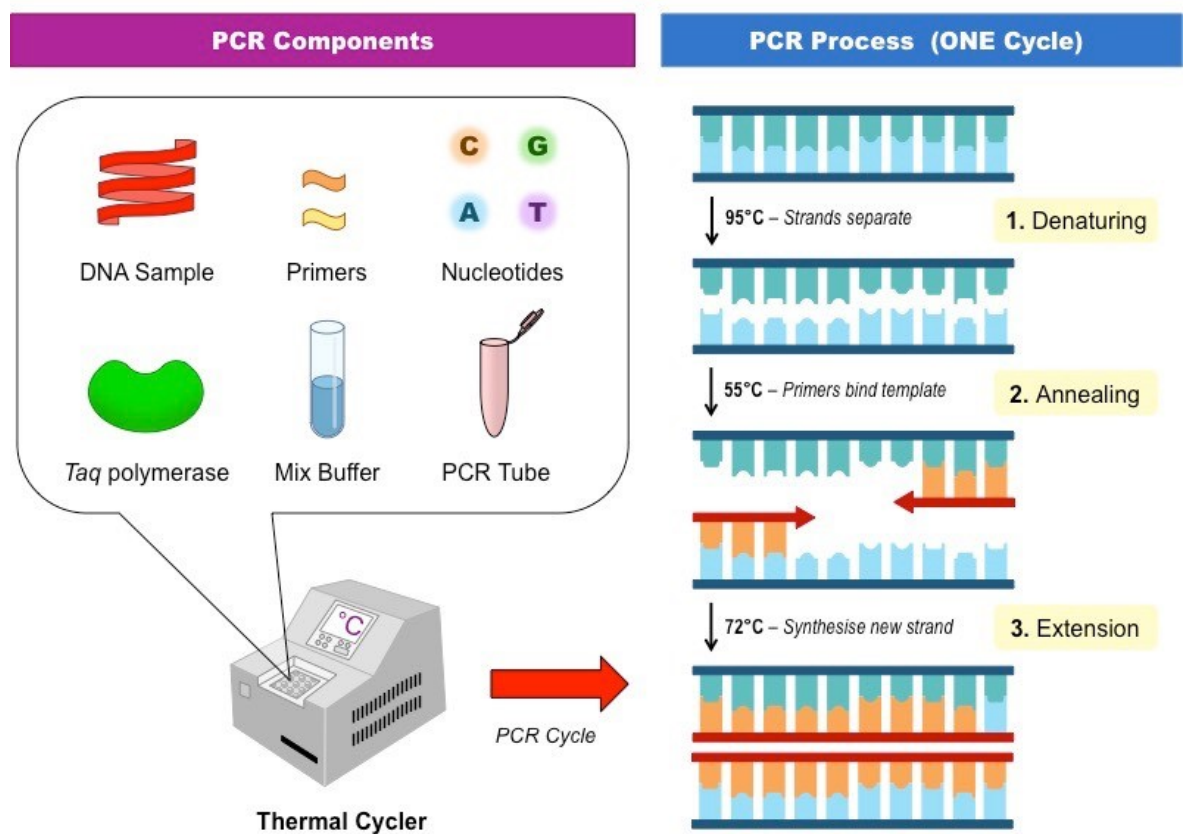


Figura 10: Schema generale sul funzionamento di una PCR

7. Valutazione dell'espressione genica: statistica ed elaborazione dei dati

Per osservare l'amplificazione dei geni studiati occorre, a fine corsa, estrapolare i dati forniti dal software dedicato e, in particolare, evidenziare i valori dei CT (*Threshold Cycle*). Il CT è il valore soglia a partire dal quale si valutano, in successione, le diverse fluorescenze degli amplificati e, una volta impostato, lo

si mantiene uguale per ciascun gene. A partire da questo valore è poi possibile ricavare la quantità di cDNA amplificato attraverso la realizzazione di una curva standard. Nel nostro lavoro di tesi la quantificazione del cDNA è relativa: ogni singolo CT viene confrontato con i CT di geni di riferimento (*housekeeping genes*) che funge da normalizzatore. L'actina e IPO8 sono stati utilizzati per normalizzare rispettivamente le HUVEC e le MSC.

Poiché ogni campione viene trattato in doppio, a fine corsa si otterranno due CT per ciascuno di questi. Una volta riportati su di un foglio Excel, viene valutata la differenza dei due valori: se quest'ultima è minore di 1, allora i due CT sono accettabili e si può procedere facendo la media fra i due. Si procede poi valutando il ΔCT : ad ogni CT campione viene sottratto il CT del normalizzatore. Dal ΔCT si ricava l'espressione relativa del gene di interesse mediante la formula $2^{-\Delta CT}$.

A questo punto è possibile, partendo dall'espressione relativa, costruire un grafico per ogni gene in modo da visualizzare l'andamento dell'espressione durante l'amplificazione.

8. Analisi statistiche

Sono state eseguite tre repliche indipendenti per tutti gli esperimenti. I dati sono stati confrontati usando T Test al fine di valutare la significatività dei risultati ottenuti. Le differenze con $p < 0.05$ sono state considerate statisticamente significative.

RISULTATI

1. Valutazione della senescenza cellulare delle MSC

Il raggiungimento dello stato di senescenza replicativa delle cellule mesenchimali ottenute da midollo osseo umano è stato valutato con il saggio dell'attività della β -galattosidasi (β -gal) a pH 6.

Le colture con una percentuale di cellule positive alla colorazione β -gal-superiore al 75% sono state considerate senescenti, mentre quelle con una percentuale di colorazione inferiore al 5% giovani e utilizzate per gli esperimenti sul differenziamento.



Figura 11: MSC in stato di senescenza replicativa dopo colorazione con saggio della β -galattosidasi

Come ulteriore conferma dello stato di senescenza cellulare, il livello di espressione della proteina P16 è stato valutato tramite tecnica Western Blot presso il laboratorio di Patologia Sperimentale. La proteina P16 appartiene alla famiglia delle CDKI, proteine che hanno la funzione di inibire l'azione delle chinasi dipendenti da ciclina (CDK), e quindi sono in grado di bloccare il ciclo cellulare ed impedire la mitosi (Alcorta DA et al, 1996). Per questi motivi, P16 è considerato uno dei principali marker della senescenza cellulare.

Nella figura 12, è possibile osservare il livello di espressione di tale proteina nelle colture cellulari di MSC giovani (P2) a confronto di colture a passaggi avanzanti per le quali si presupponeva il raggiungimento dello stato di senescenza replicativa. L'espressione di P16 è stata normalizzata con la β -actina.

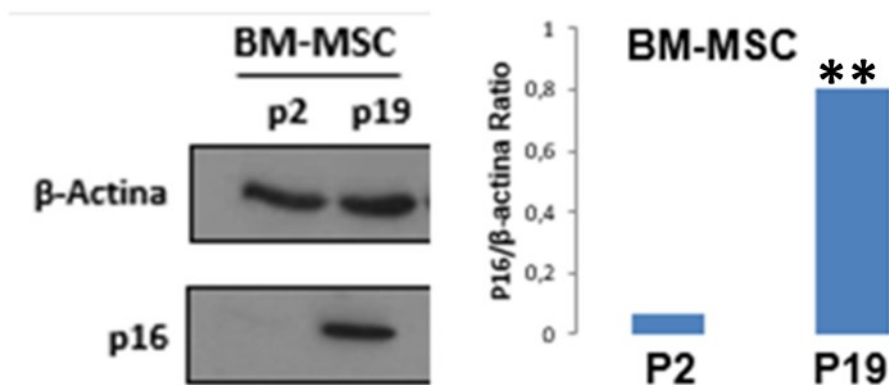


Figura 12 : Livello di espressione di P16 in MSC giovani e senescenti. $P < 0.01 = **$

In figura 13 viene rappresentato la population doubling. Andando avanti con i passaggi si osserva una progressiva diminuzione della capacità replicativa dovuta all'aumento della percentuale delle cellule senescenti.

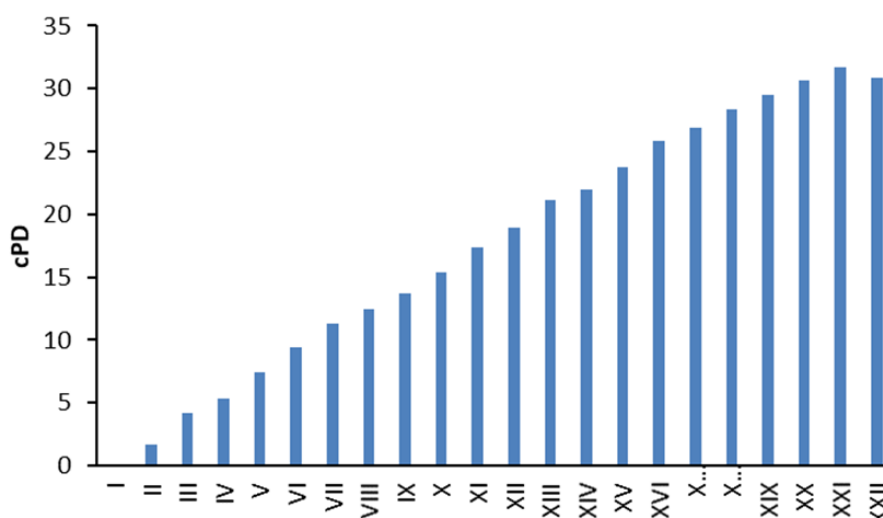


Figura 13 : population doubling; andamento della capacità replicativa delle MSC nei vari passaggi

2. Quantificazione della concentrazione di TFC e valutazione della citotossicità di OLE

Dopo aver preparato l'estratto OLE secondo le procedure descritte nella sezione materiali e metodi, e aver calcolato la concentrazione di TFC (total flavonoid content) (80-150 µg/ml di estratto), è stata valutata la sua eventuale tossicità sulle cellule MSC esponendole alle concentrazioni di 2-4-8-16 µg/ml per 24 ore.

In base alla percentuale di vitalità cellulare per ogni concentrazione testata, è stata scelta la concentrazione di 4 µg/ml da utilizzare per i successivi esperimenti (Figura 14), ovvero la massima dose con basso effetto citotossico.

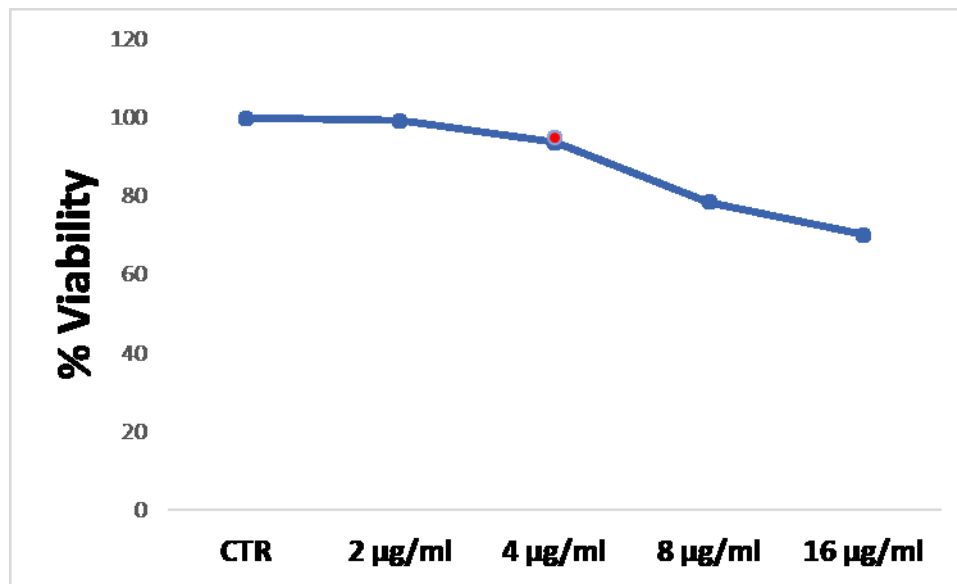


Figura 14 : Saggio di vitalità cellulare su MSC a 24 ore

3. Valutazione dell'effetto anti-infiammatorio di OLE sulle MSC in senescenza replicativa

Dopo aver definito la concentrazione di TFC in OLE da utilizzare per i successivi esperimenti, si è deciso di investigare il suo effetto anti-infiammatorio sulle stesse MSC ma senescenti. Queste infatti, come tutte le cellule senescenti, presentano, oltre all'arresto irreversibile del ciclo cellulare, il fenotipo secretorio SASP, caratterizzato dalla produzione di molecole con elevato potere pro-infiammatorio. Tra le molteplici molecole pro-infiammatorie prodotte dalle cellule senescenti, le citochine IL- β , IL-6, IL-8 e TNF- α sono ad oggi tra quelle maggiormente studiate e caratterizzate.

Pertanto è stata valutata l'espressione genica degli mRNA delle quattro citochine sopra citate dopo la somministrazione dell'estratto (4 µg/ml) per 24 e 72 ore.

La Figura 15 mostra come l'estratto abbia un effetto inibente significativo già dopo 24 ore di trattamento sull'espressione di IL1- β e IL-6 e come questo effetto sia efficace su tutte le citochine analizzate a 72 ore (i risultati mostrati sono relativi alle medie di 3 esperimenti).

I risultati ottenuti, suggeriscono una possibile implicazione di OLE nella regolazione dell'infiammazione nelle MSC senescenti.

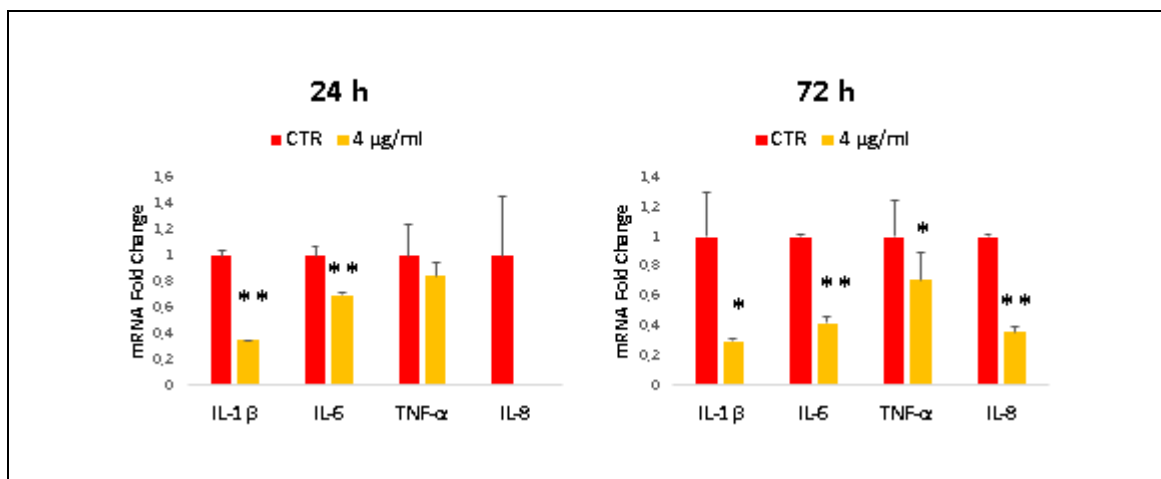


Figura 15 : Valutazione dell'effetto di OLE su MSC in senescenza replicativa. Generale diminuzione delle citochine di interesse. La significatività (p) dei risultati è rappresentata dagli asterischi in figura: $p < 0,05$ corrisponde “*”, $p < 0,001$ corrispondono “***” e $p < 0,001$ corrispondono “****”.

4. Valutazione dell'effetto di OLE sui marcatori adipogenici nelle MSC dopo 3 e 15 giorni

Per indagare il ruolo di OLE nella modulazione del differenziamento in senso adipogenico, sono state allestite delle colture cellulari di MSC indotte a differenziamento in presenza e meno dell'estratto.

Nel differenziamento adipogenico vengono attivati una serie di fattori che giocano un ruolo chiave nella promozione del processo. PPAR γ in particolare, risulta essere il principale regolatore dell'adipogenesi: numerosi report scientifici dimostrano che l'inibizione di questo recettore determina la soppressione del processo stesso (Ghabenand Scherer, 2019). Nel presente lavoro di tesi è stata effettuata una valutazione del livello di espressione di PPAR γ e di altri biomarkers coinvolti nel processo di adipogenesi, quali FABP4, adiponectina, leptina e PLIN1.

Nelle figure 16 e 17 è possibile osservare l'espressione degli mRNA dei geni analizzati tramite RT-PCR. Già dopo 3 giorni di differenziamento in terreno adipogenico (AM) si può osservare un aumento dell'espressione di tutti gli mRNA analizzati, che viene ridotta significativamente quando il terreno AM viene addizionato con OLE , eccetto che per l'espressione di FABP4 (Figura 17), la cui espressione risulta significativamente ridotta dopo 15 giorni di differenziamento, così come quella di tutti gli altri mRNA.

Molto interessante risulta anche il confronto dei livelli di espressione relativa ($2^{-\Delta\text{ct}}$ a.u.) degli stessi biomarkers analizzati dopo 3 e 15 giorni. Sebbene infatti come suddetto, sia evidente una riduzione dell'espressione tra i campioni "Adipogenic Medium" e "Adipogenic Medium + 4 $\mu\text{g/ml}$ " sia a 3 che a 15 giorni, l'effetto inibente è più efficace dopo 15 giorni eccetto che per la leptina.

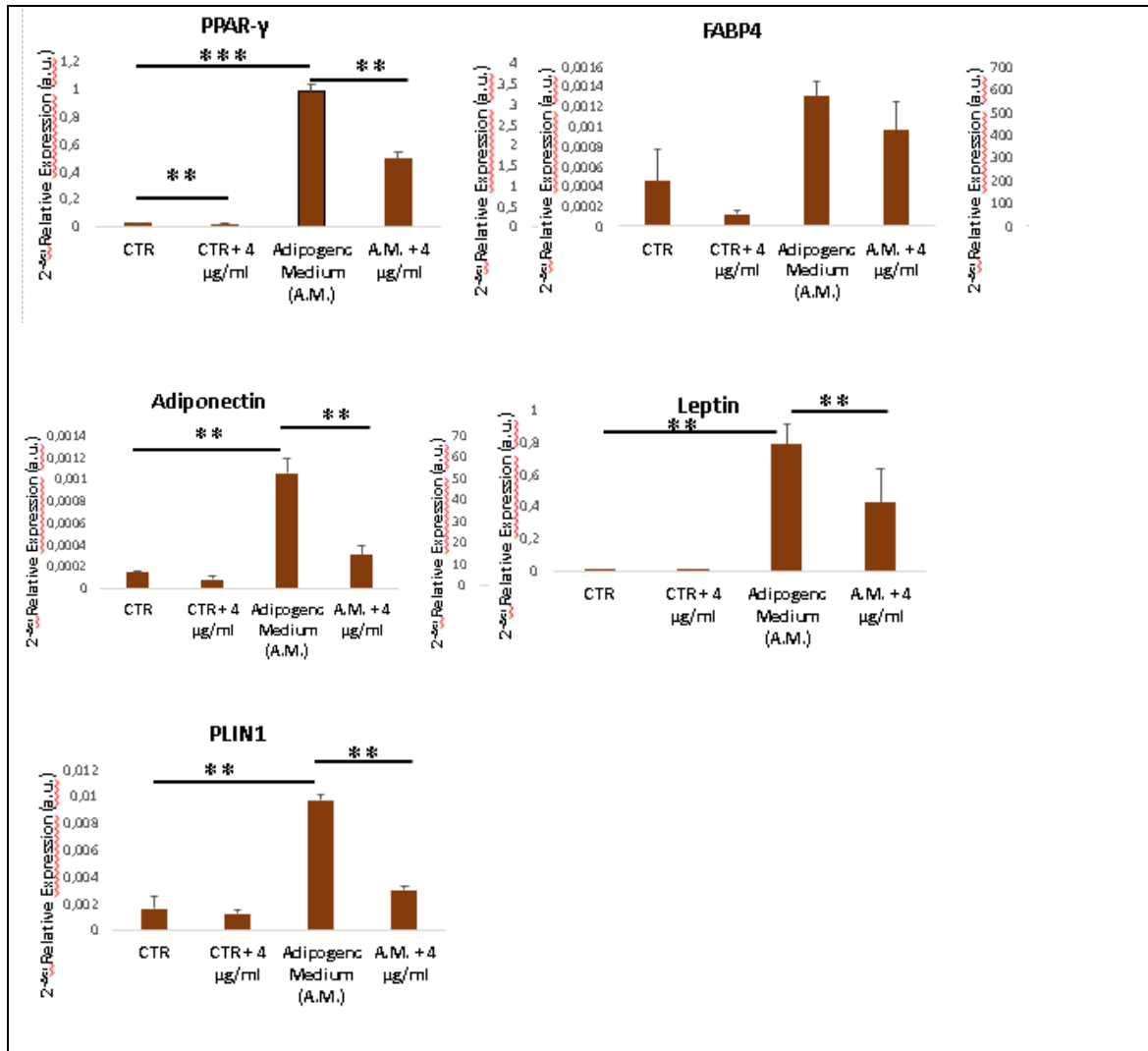


Figura 16 : Espressione relativa dei biomarcatori per lo studio dell'adipogenesi nelle MSC trattate con OLE dopo 3 giorni. La significatività (p) dei risultati è rappresentata dagli asterischi in figura. $p < 0,05$ corrisponde "*", $p < 0,001$ corrispondono "**" e $p < 0,001$ corrispondono "***".

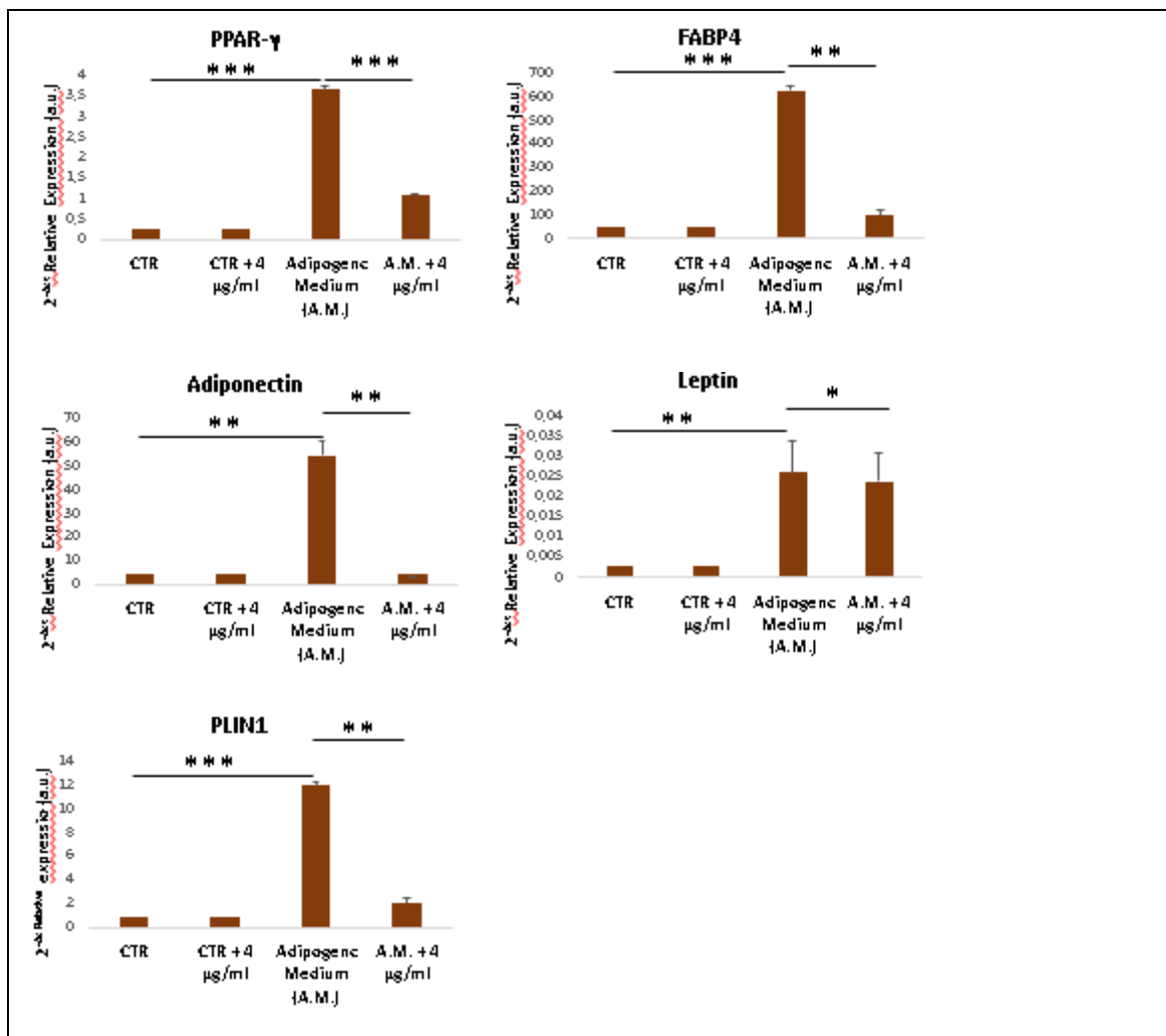


Figura 17 : Espressione relativa dei biomarcatori per lo studio dell'adipogenesi nelle MSC trattate con OLE dopo 15 giorni. La significatività (p) dei risultati è rappresentata dagli asterischi in figura. $p < 0,05$ corrisponde "*", $p < 0,001$ corrispondono "**" e $p < 0,001$ corrispondono "***".

CONCLUSIONI

L'interesse verso il mondo vegetale per applicazioni in campo bio-medico è aumentato esponenzialmente negli ultimi decenni. Le proprietà benefiche per l'uomo di molti composti estratti dalle piante sono note fin dall'antichità. Le attuali pressioni sociali ed economiche verso un'integrazione tra le medicine naturali e quelle convenzionali, sono state determinate in gran parte dall'enorme diffusione delle malattie cronico-degenerative non trasmissibili e dalla complessa gestione dei pazienti affetti da tali patologie. Si è quindi osservato un incremento delle ricerche scientifiche sugli effetti di numerose sostanze naturali utilizzando sia modelli *in vitro* che *in vivo*. Gli studi *in vitro* hanno permesso di identificare numerose proprietà di composti di origine vegetale, antivirali, antibatteriche, antitumorali, antiossidanti, cardioprotettive, neuroprotettive che, in diversi casi, hanno trovato conferma anche in studi *in vivo*.

Un aspetto molto innovativo riguarda le proprietà anti-invecchiamento di alcuni composti naturali, una proprietà di grande interesse considerato l'incremento dell'incidenza delle patologie degenerative legate all'aumento dell'aspettativa di vita, almeno nella popolazione dei paesi sviluppati. La senescenza cellulare è ormai considerata uno dei meccanismi causali del processo di invecchiamento e un fattore di rischio per le patologie degenerative.

Le foglie di olivo rappresentano una matrice vegetale con alte concentrazioni di sostanze naturali potenzialmente coinvolte in molti processi di preservazione della salute dell'uomo.

I risultati ottenuti in questo studio preliminare suggeriscono un effetto anti-infiammatorio dell'estratto, ottenuto da foglie di olivo coltivato senza alcun trattamento in un ambiente incontaminato, sulle MSC in senescenza replicativa e caratterizzate da un fenotipo SASP.

In particolare i risultati hanno dimostrato una generale diminuzione dei livelli di espressione di citochine pro-infiammatorie molto importanti e caratterizzanti il fenotipo SASP.

Inoltre, poiché il tessuto adiposo midollare aumenta con l'età ed è associato a diverse patologie dell'invecchiamento come ad esempio le mielodisplasie e l'osteoporosi, abbiamo testato tale estratto in un modello di adipogenesi midollare *in vitro*, per valutarne il potenziale anti-adipogenico. Anche in questo caso gli esperimenti effettuati suggeriscono delle importanti proprietà di OLE poiché esso è in grado di ridurre l'espressione di una serie di marcatori di attività delle cellule adipose. Altri esperimenti già programmati valuteranno l'efficacia del composto di

ridurre l'accumulo di lipidi nelle cellule e l'espressione delle proteine i cui messaggeri vengono modulati.

Tale effetto è molto probabilmente dovuto alla sua ricchezza in composti fenolici, ma non possiamo escludere altri componenti. Per questo motivo tale estratto, ottenuto come infuso a freddo in soluzione acquosa (PBS per poterlo utilizzare nelle colture cellulari) dovrà essere nel prossimo futuro ben caratterizzato. E' infatti noto che le proprietà dei composti naturali sono strettamente dipendenti tra di loro. Diversi studi hanno dimostrato effetti sinergici tra vari composti bioattivi; pertanto la conoscenza delle varie frazioni di polifenoli presenti in OLE è necessaria per capire quali siano le principali molecole responsabili degli effetti studiati.

Inoltre, occorre valutare la biodisponibilità dei composti fenolici nel vivente: infatti la quantità di principio attivo che *in vitro* ha dato luogo agli effetti presentati in questo lavoro non è necessariamente quella di cui si dovrebbe disporre, *in vivo*, per ottenere i medesimi risultati. E' perciò fondamentale conoscere quale sia la giusta concentrazione per poter individuare i potenziali benefici dei composti fenolici nell'organismo umano e valutare la sua efficacia in modelli animali sperimentali quale quello murino.

I dati ottenuti suggeriscono comunque un utilizzo dell'estratto nella prevenzione e come coadiuvante nel trattamento delle patologie sopra citate. Tuttavia, per avere una conferma dell'ipotesi che questo studio profila, è necessaria una pianificazione di studi clinici guidati, con l'obiettivo di individuare, con maggiore chiarezza, i diversi possibili benefici per la salute dell'uomo.

In fine sarebbe interessante, in virtù degli outcome positivi ottenuti, valutare se l'estratto abbia anche un effetto sull'osteogenesi e in quale misura, così da avere un quadro più completo sul probabile ruolo che tale sostanza naturale potrebbe possedere nella regolazione di importanti processi metabolici umani.

BIBLIOGRAFIA

- Acosta J.C., O'Loghlen A., Banito A., Raguz S., Gil J. Control of senescence by CXCR2 and its ligands. *Cell Cycle*. 2008;7:2956–2959.
- Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(24):13742-7.
- Antebi B, Asher AM, Rodriguez LA 2nd, Moore RK, Mohammadipoor A, Cancio LC. Cryopreserved mesenchymal stem cells regain functional potency following a 24-h acclimation period. *J Transl Med*. 2019;17(1):297.
- Arimura, N., Horiba, T., Imagawa, M., Shimizu, M., Sato, R. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes. *J Biol Chem*. 2004;279, 10070-10076.
- Bader R, Ibrahim JN, Mourad A, Moussa M, Azoury J, Azoury J, Alaaeddine N. Improvement of Human Sperm Vacuolization and DNA Fragmentation Co-Cultured with Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Secretome: In Vitro Effect. *Int J Stem Cells*. 2019.
- Baek G, Choi H, Kim Y, Lee HC, Choi C. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Therapeutics and as a Drug Delivery Platform. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(9):880-886.
- Barbieri R, Coppo E, Marchese A, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, Nabavi SF, Nabavi SM. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiol Res*. 2017;196:44-68.
- Barcenilla-Wong AL, Chen JS, Cross MJ, March LM. The Impact of Fracture Incidence on Health Related Quality of Life among Community-Based Postmenopausal Women. *J Osteoporos*. 2015;2015:717914.
- Campisi J. and d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2007;8:729–740.

- Castro-Manrreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res.* 2015;2015:394917.
- Chalan P, van den Berg A, Kroesen BJ, Brouwer L, Boots A. Rheumatoid Arthritis, Immunosenescence and the Hallmarks of Aging. *Curr Aging Sci.* 2015;8(2):131-46.
- Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:99-118.
- Cordes C, Baum T, Dieckmeyer M, Ruschke S, Diefenbach MN, Hauner H, Kirschke JS, Karampinos DC. MR-Based Assessment of Bone Marrow Fat in Osteoporosis, Diabetes, and Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7:74.
- Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Józkowicz A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol.* 2015;62(3):329-37.
- Erusalimsky JD, Kurz DJ. Cellular senescence in vivo: its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Exp Gerontol.* 2005;40(8-9):634-42.
- Garcia, O.B.; Castillo, J.; Lorente, J.; Ortuno, A.; Del-Rio, J.A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.* 2000;68, 457–462.
- Ghaben AL, Scherer PE. Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(4):242-258.
- Goldsmith CD, Vuong QV, Sadeqzadeh E, Stathopoulos CE, Roach PD, Scarlett CJ. Phytochemical properties and anti-proliferative activity of *Olea europaea* L. leaf extracts against pancreatic cancer cells. *Molecules.* 2015;20(7):12992-3004.

- Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Marino Gammazza A, Knap N, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M. Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3). pii: E686.
- Gugliandolo A, Caraffa AL, Gallenga CE, Kritas SK, Ronconi G, Trubiani O, Conti P, Di Emidio P, Mazzon E. Mesenchymal stem cells and IL-37: a powerful combination. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2019;33(4):1019-1022.
- Gurău F, Baldoni S, Prattichizzo F, Espinosa E, Amenta F, Procopio AD, Albertini MC, Bonafè M, Olivieri F. Anti-senescence compounds: A potential nutraceutical approach to healthy aging. *Ageing Res Rev.* 2018;46:14-31.
- Hamdi, H.K.; Castellon, R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;334, 769–778.
- Höhn A, Weber D, Jung T, Ott C, Hugo M, Kochlik B, Kehm R, König J, Grune T, Castro JP. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biol.* 2017;11:482-501.
- i XF, Sun YY, Bao J, Chen X, Li YH, Yang Y, Zhang L, Huang C, Wu BM, Meng XM, Li J. Functional role of PPAR- γ on the proliferation and migration of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Sci Rep.* 2017;7(1):12671.
- Imran M, Nadeem M, Gilani SA, Khan S, Sajid MW, Amir RM. Antitumor Perspectives of Oleuropein and Its Metabolite Hydroxytyrosol: Recent Updates. *J Food Sci.* 2018;83(7):1781-1791.
- Japon-Lujan R, Luque-Rodriguez JM, Luque de Castro MD. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related polyphenols from olive leaves. *J Chromatogr A.* 2006;1108: 76–82.
- Lefterova, M.I., Zhang, Y., Steger, D.J., Schupp, M., Schug, J., Cristancho, A., Feng, D., Zhuo, D., Stoeckert, C.J., Jr., Liu, X.S., Lazar, M.A. PPAR γ and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes & development* 22, 2941-2952.

- Li Y, Wu Q, Wang Y, Li L, Bu H, Bao J. Senescence of mesenchymal stem cells (Review). *Int J Mol Med*. 2017;39(4):775-782.
- Lidzbarsky G, Gutman D, Shekhidem HA, Sharvit L, Atzmon G. Genomic Instabilities, Cellular Senescence, and Aging: In Vitro, In Vivo and Aging-Like Human Syndromes. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:104.
- Loibl M, Wuertz-Kozak K, Vadala G, Lang S, Fairbank J, Urban JP. Controversies in regenerative medicine: Should intervertebral disc degeneration be treated with mesenchymal stem cells? *JOR Spine*. 2019;2(1): e1043.
- Ma S., Xie N., Li W., Yuan B., Shi Y., Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*. 2014;21(2):216–225.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(5):727-47.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *AmJ Clin Nutr*. 2005;81(1 Suppl):230S-242S.
- Meisel R., Zibert A., Laryea M., Göbel U., Däubener W., Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004;103(12):4619–4621.
- Mojtahedin A, Seifdavati J, Seyedsharifi R. Effects of different levels of dietary Citrus Limon essential oil on some blood parameters and antioxidant status in Afshari Ewes. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2018;64(1):47-51.
- Olmez E, Vural K, Gok S, Ozturk Z, Kayalar H, Ayhan S, Var A. Olive Leaf Extract Improves the Atherogenic Lipid Profile in Rats Fed a High Cholesterol Diet. *Phytother Res*. 2015;29(10):1652-7.

- Pun S, Dearden RL, Ratkus AM, Liang H, Wronski TJ. Decreased bone anabolic effect of basic fibroblast growth factor at fatty marrow sites in ovariectomized rats. *Bone*. 2001;28(2):220-6.
- Rea IM, Gibson DS, McGilligan V, McNerlan SE, Alexander HD, Ross OA. Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines. *Front Immunol*. 2018;9:586.
- Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev*. 2002;16(1):22-6.
- Ryan J. M., Barry F., Murphy J. M., Mahon B. P. Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*. 2007;149(2):353–363.
- Salama R, Sadaie M, Hoare M, Narita M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev*. 2014;28(2):99-114.
- Scheller EL, Rosen CJ. What's the matter with MAT? Marrow adipose tissue, metabolism, and skeletal health. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1311:14-30.
- Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7-25.
- Sepúlveda JC, Tomé M, Fernández ME, Delgado M, Campisi J, Bernad A, González MA. Cell senescence abrogates the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in the lethal endotoxemia model. *Stem Cells*. 2014;32(7):1865-77.
- Shyh-Chang N, Ng HH. The metabolic programming of stem cells. *Genes Dev*. 2017;31(4):336-346.
- Somova LI, Shode FO, Ramnanan P, Nadar A. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *Africana* leaves. *J Ethnopharmacol*. 2003;84: 299–305.

- Sözen T, Özışık L, Başaran NÇ. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol.* 2017;4(1):46-56.
- T Flatt. A new definition of aging?, *Front. Genet.* 2012;3:148.
- Turinetto V, Vitale E, Giachino C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7). pii: E1164.
- Uchide N, Ohyama K, Bessho T, Takeichi M, Toyoda H. Possible roles of proinflammatory and chemoattractive cytokines produced by human fetal membrane cells in the pathology of adverse pregnancy outcomes associated with influenza virus infection. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:270670.
- Veljković M, Pavlović DR, Stojiljković N, Ilić S, Jovanović I, Poklar Ulrih N, Rakić V, Veličković L, Sokolović D. Bilberry: Chemical Profiling, in Vitro and in Vivo Antioxidant Activity and Nephroprotective Effect against Gentamicin Toxicity in Rats. *Phytother Res.* 2017;(1):115-123.
- Vogel P, Kasper Machado I, Garavaglia J, Zani VT, de Souza D, Morelo Dal Bosco S. Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health. *Nutr Hosp.* 2014;31(3):1427-33.
- Walker MR, Patel KK, Stappenbeck TS. The stem cell niche. *J Pathol.* 2009;217(2):169-80.
- Zhang, Y., Dallner, O.S., Nakadai, T., Fayzikhodjaeva, G., Lu, Y.H., Lazar, M.A., Roeder, R.G., Friedman, J.M. A noncanonical PPARgamma/RXRalpha-binding sequence regulates leptin expression in response to changes in adipose tissue mass. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018;115, E6039-E6047.

