



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
MEDICINA TRASLAZIONALE DELLO SVILUPPO E DELL'INVECCHIAMENTO ATTIVO**

**CURRICULUM “GESTIONE INTEGRATA DELLA FRAGILITÀ, DELLE CONDIZIONI  
CRONICHE E DELLE MULTIMORBIDITÀ”**

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

***Tutor***  
***Ch.mo Prof. Carmine SELLERI***

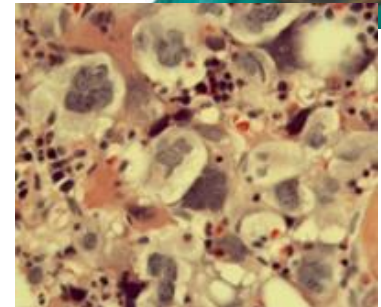
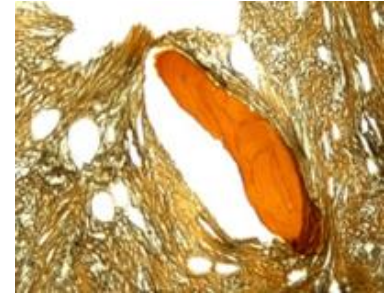
***Candidato***  
***Luigi MARINO***



# MIELOFIBROSI

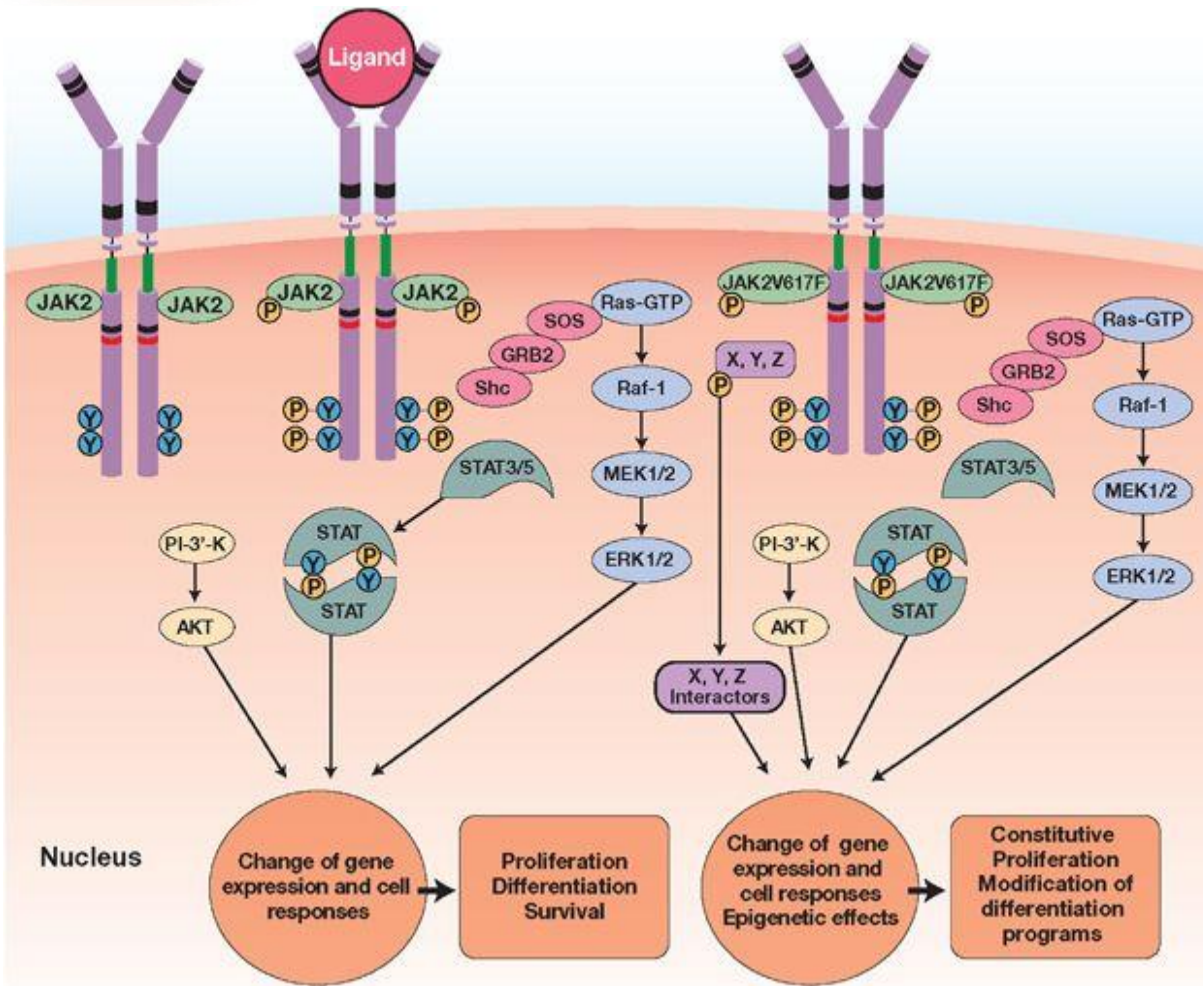
## CARATTERISTICHE CLINICHE E MOLECOLARI

- **Disordine emopoietico neoplastico caratterizzato da:**
  - **fibrosi midollare**
  - **emopoiesi extramidollare soprattutto splenica**
  - **eritropoiesi inefficace**
- **Della MFI si riconoscono tre forme cliniche**
  - **Mielofibrosi Idiopatica (MFI)**
  - **MFI post-Policitemia Vera (PV-MFI)**
  - **MFI post-Trombocitemia Essenziale (TE-MFI)**
- **In più del 50% dei casi, la MFI è da imputare a mutazioni somatiche del gene *JAK2*, in particolare alla sostituzione V617F**
- **Altri geni che possono essere coinvolti nello sviluppo della MFI sono: *MPL* e *CALR***





# ALTERAZIONI DEL PATHWAY JAK/STAT NELLA FISIOPATOLOGIA DELLA MFI



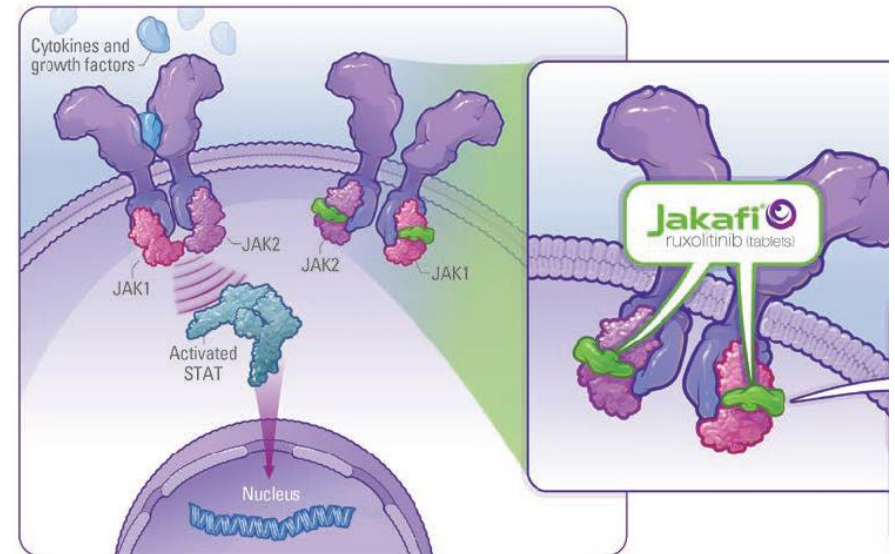
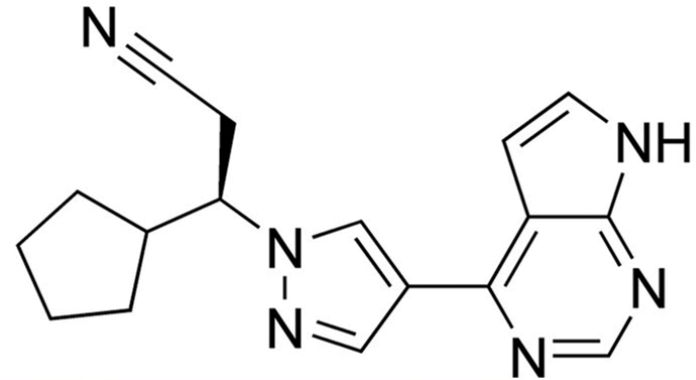
La deregolazione della via  
JAK/STAT determina:

- Incontrollata proliferazione indipendente dal tipo di stimolazione (EPO, TPO altri fattori di crescita)
- Elevata secrezione di citochine pro-infiammatorie



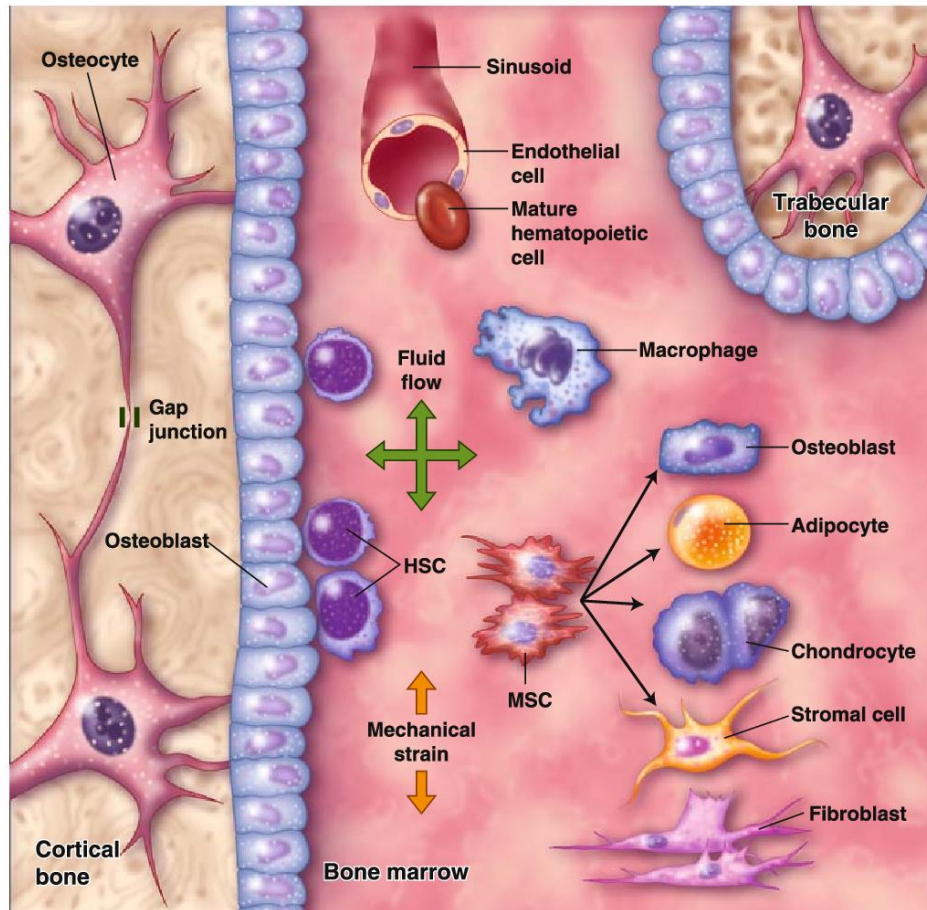
# AZIONE DEL RUXOLITINIB SULLA VIA JAK/STAT NELLA FISIOPATOLOGIA DELLA MFI

- Ruxolitinib (Jakafi) è stato approvato nel 2011 per il trattamento di pazienti con MFI ad intermedio ed alto rischio (studi COMFORT-I e II)
- Ruxolitinib è un inibitore JAK1/2 che determina il blocco della via di segnale JAK/STAT
- Inibisce la costitutiva attivazione di JAK2 V617F in pazienti con MFI





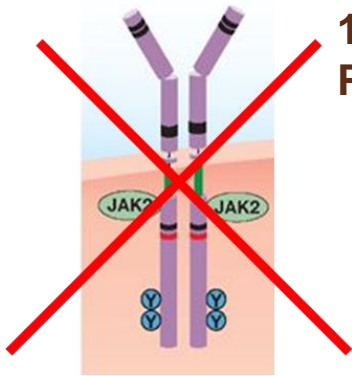
# LA NICCHIA EMOPOIETICA E IL RUOLO DELLE CELLULE MESENCHIMALI



- La nicchia EMOPOIETICA è il microambiente nel quale risiedono le cellule staminali emopoietiche
- Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono cellule staminali di supporto presenti in molti tessuti, tra cui il midollo osseo
- Supportano l'emopoiesi attraverso la secrezione di fattori di crescita
- Possono differenziarsi in varie linee cellulari, tra cui osteoblasti

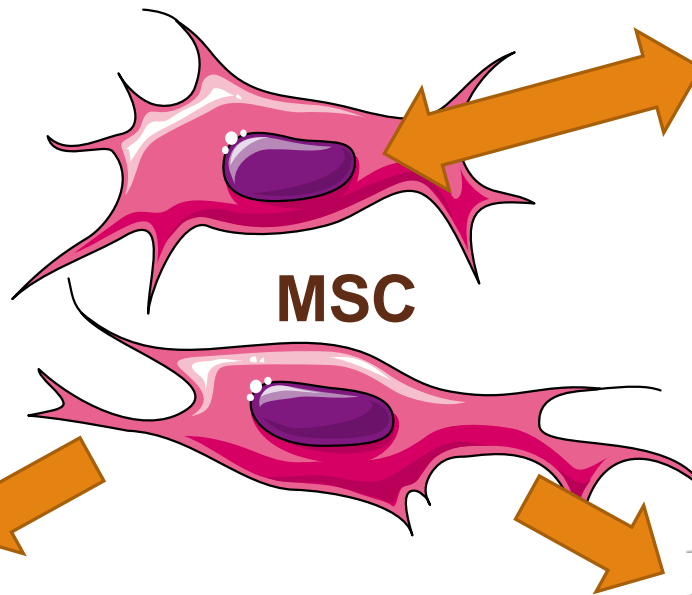
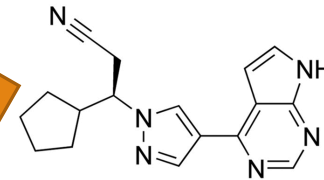


# IPOTESI (I)



1. ASSENZA DEL  
PATHWAY JAK/STAT

2. DIFFUSIONE PASSIVA  
RUXOLITINIB

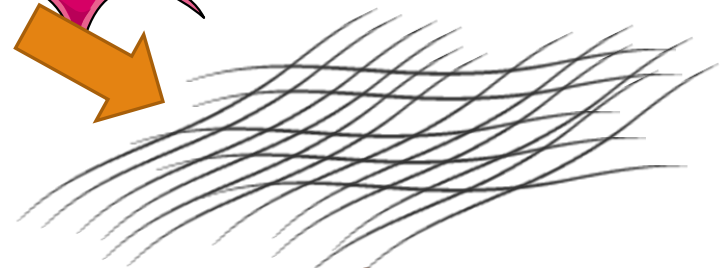


MSC



HSC

4. SUPPORTO EMOPOIESI



3. DEPOSIZIONE FIBRINA →  
FIBROSI MIDOLLARE

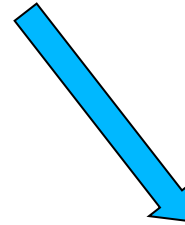
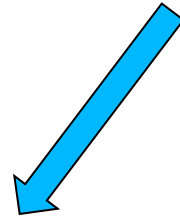


# IPOSTESI (II)



HEMATOPOIETIC  
STEM CELLS (HSC)

*RUXOLITINIB*



BONE MARROW MESENCHYMAL  
STEM CELLS (BM-MSC)



È POSSIBILE CHE LE BM-MSC SVOLGANO UN'AZIONE  
DI RESERVOIR DEL RUXOLITINIB POTENZIANDO  
L'EFFETTO DEL FARMACO SULLE HSC NEL  
MICROAMBIENTE MIDOLLARE ?



## FASI SPERIMENTALI (I)

- *Espansione di linee cellulari di MSC primarie da pazienti con MFI o PV-MFI con presenza della mutazione JAK2 V617F*
- *Valutazione dei livelli colturali di Ruxolitinib in BM-MSC trattate col farmaco tramite metodica HPLC*
- *Valutazione in vitro dell'effetto anti-proliferativo di Ruxolitinib e del mezzo condizionato ottenuto da BM-MSC trattate con il farmaco*
- *Valutazione in vitro del potenziale inibitorio delle BM-MSC trattate o non con Ruxolitinib sulla proliferazione di cellule immortalizzate SET-2*



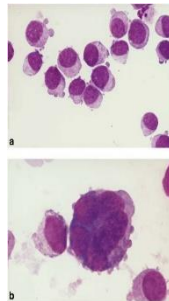


# LINEE CELLULARI PRIMARIE DI BM-MSC E LINEA CELLULARE STABILIZZATA SET-2

ID	Sesso	Età (anni)	Codice Lab	Diagnosi
L.D.C.	F	86	BMMSC201673	MFI JAK2+
R.D.M.	F	44	BMMSC201684	MFI JAK2+
V.R.	M	48	BMMSC201764	PV-MFI JAK2+
G.M.	M	68	BMMSC201775	MFI JAK2+
D.V.G.	M	55	BMMSC201806	PV-MFI JAK2+

## Cell line SET-2

Cells carry the *JAK2 V617F* mutation



CD34+  
CD4+  
CD33+  
HLA-DR+  
CD14-  
CD3-

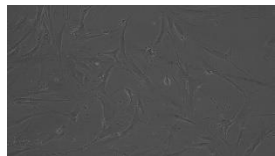
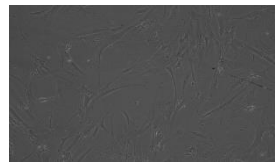
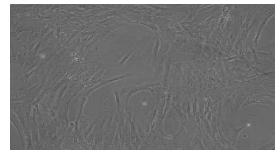
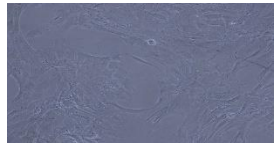
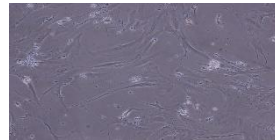


# BM-MSC

## CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA

### BM-MSC<sup>1</sup>

CD90+  
CD73+  
CD105+  
CD14-  
CD34-  
CD45-  
HLA-DR-



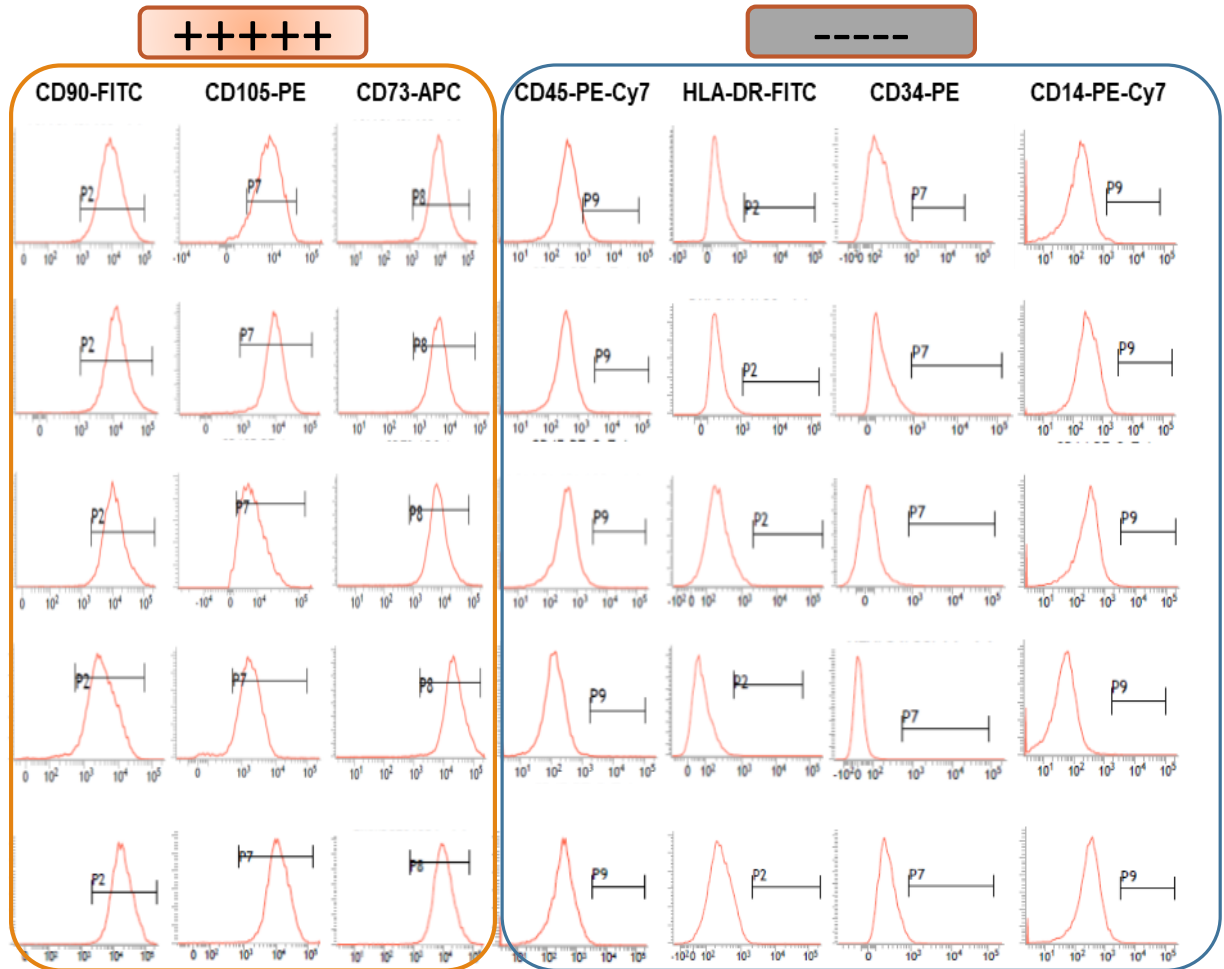
**BMMSCs**  
201673  
Count

**BMMSCs**  
201764  
Count

**BMMSCs**  
201775  
Count

**BMMSCs**  
201806  
Count

**BMMSCs**  
201684  
Count



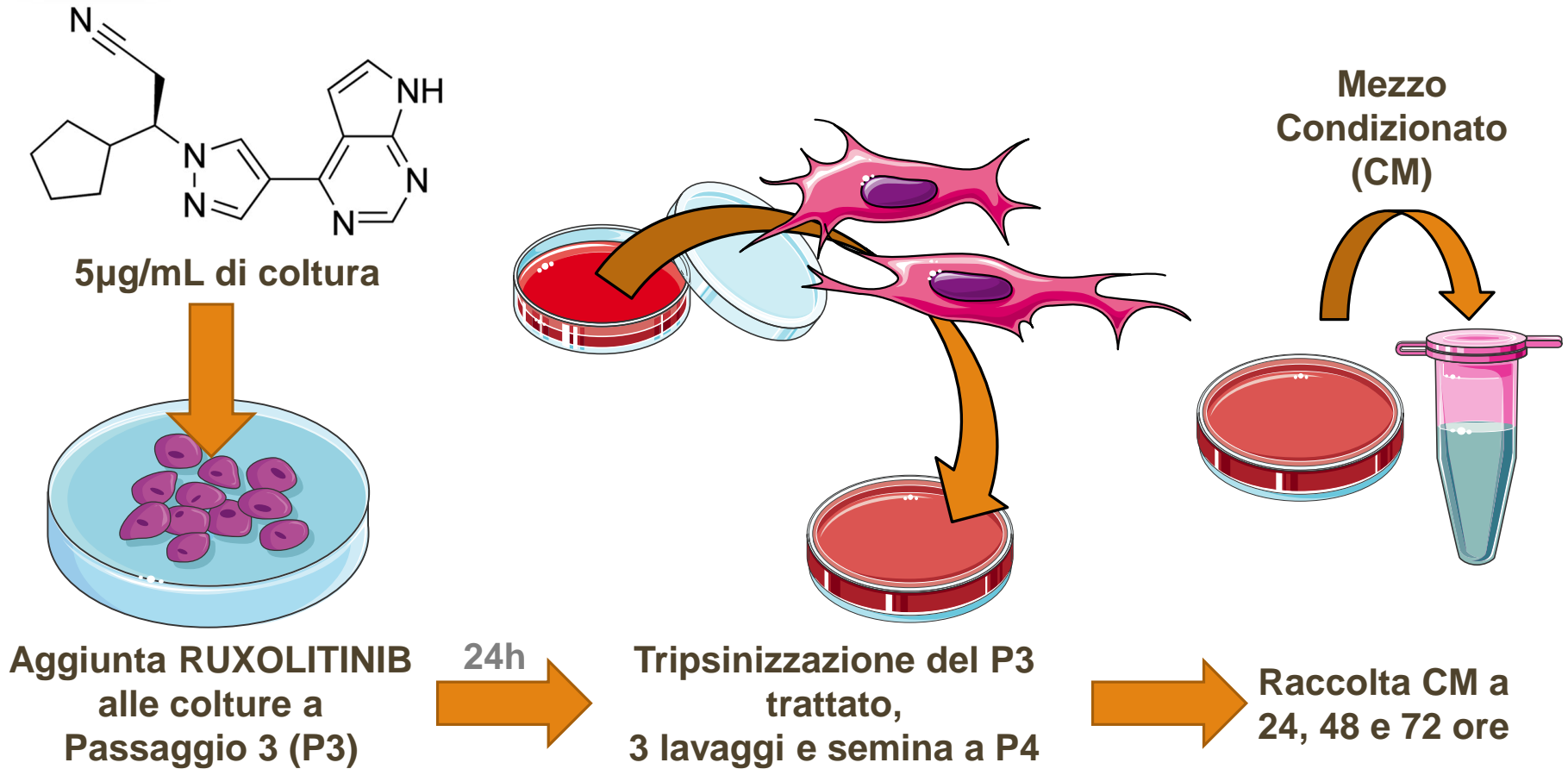


## FASI SPERIMENTALI (II)

- *Espansione di linee cellulari di MSC primarie da pazienti con MFI o PV-MFI con presenza della mutazione JAK2 V617F*
- *Valutazione dei livelli colturali di Ruxolitinib in BM-MSC trattate col farmaco tramite metodica HPLC*
- *Valutazione in vitro dell'effetto anti-proliferativo di Ruxolitinib e del mezzo condizionato ottenuto da BM-MSC trattate con il farmaco*
- *Valutazione in vitro del potenziale inibitorio delle BM-MSC trattate o non con Ruxolitinib sulla proliferazione di cellule immortalizzate SET-2*



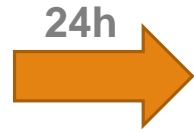
# DOSAGGIO DI RUXOLITINIB IN HPLC NEL MEZZO CONDIZIONATO (CM) DOPO TRATTAMENTO





# DOSAGGIO DI RUXOLITINIB IN HPLC NEL MEDIUM CONDIZIONATO (CM) DOPO TRATTAMENTO

Aggiunta RUXOLITINIB  
alle colture a  
Passaggio 3 (P3)



Tripsinizzazione del P3  
trattato,  
3 lavaggi e semina a P4



Raccolta CM a  
24, 48 e 72 ore

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



## FASI SPERIMENTALI (III)

- *Espansione di linee cellulari di MSC primarie da pazienti con MFI o PV-MFI con presenza della mutazione JAK2 V617F*
- *Valutazione dei livelli colturali di Ruxolitinib in BM-MSC trattate col farmaco tramite metodica HPLC*
- *Valutazione in vitro dell'effetto anti-proliferativo di Ruxolitinib e del mezzo condizionato ottenuto da BM-MSC trattate con il farmaco*
- *Valutazione in vitro del potenziale inibitorio delle BM-MSC trattate o non con Ruxolitinib sulla proliferazione di cellule immortalizzate SET-2*



# POTENZIALE ANTI-PROLIFERATIVO DI RUXOLITINIB E CM-RUXOLITINIB SU SET-2

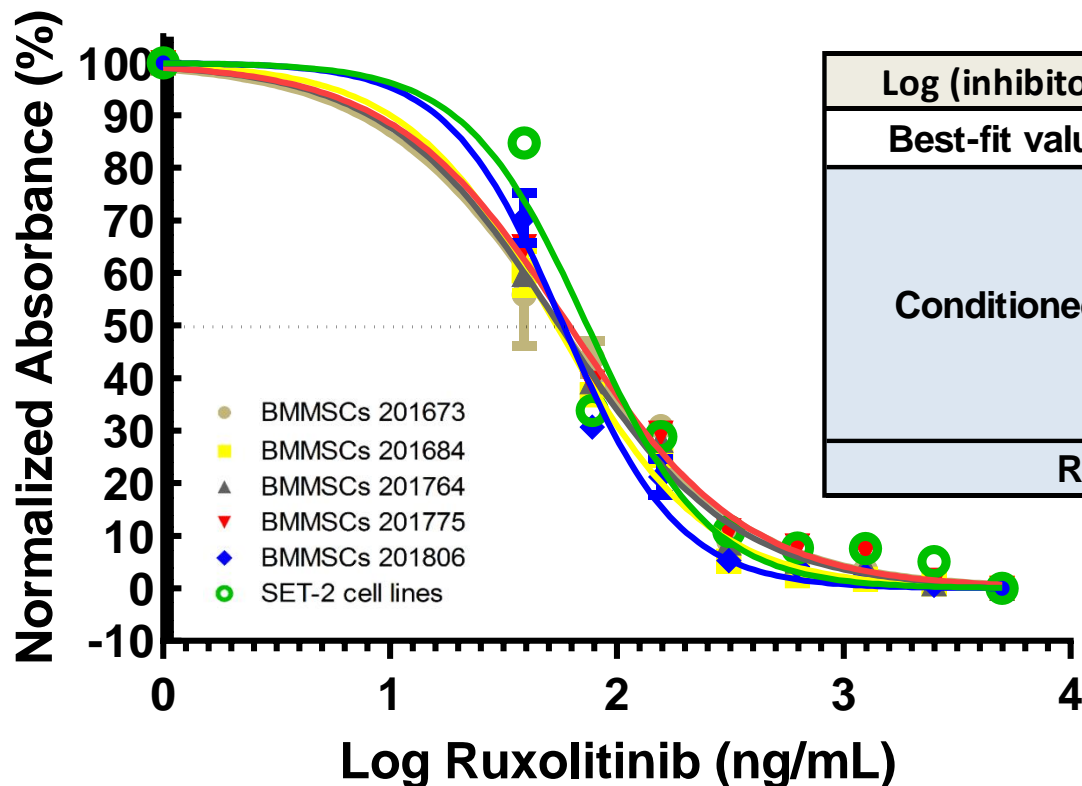
Diluizioni seriali 1:2 (100 $\mu$ L/well)  
Aggiunta Ruxolitinib o CM-Ruxolitinib



Aggiunta  $3 \times 10^5$  SET-2/well <sup>7gg</sup>



CCK-8 assay



Log (inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope		
Best-fit values	IC <sub>50</sub> - Inhibitor	IC <sub>50</sub> (ng/mL)
Conditioned Medium BM-MSC	201673	56.28
	201684	54.34
	201764	56
	201775	61.75
	201806	58.31
Ruxolitinib	SET-2	74.2



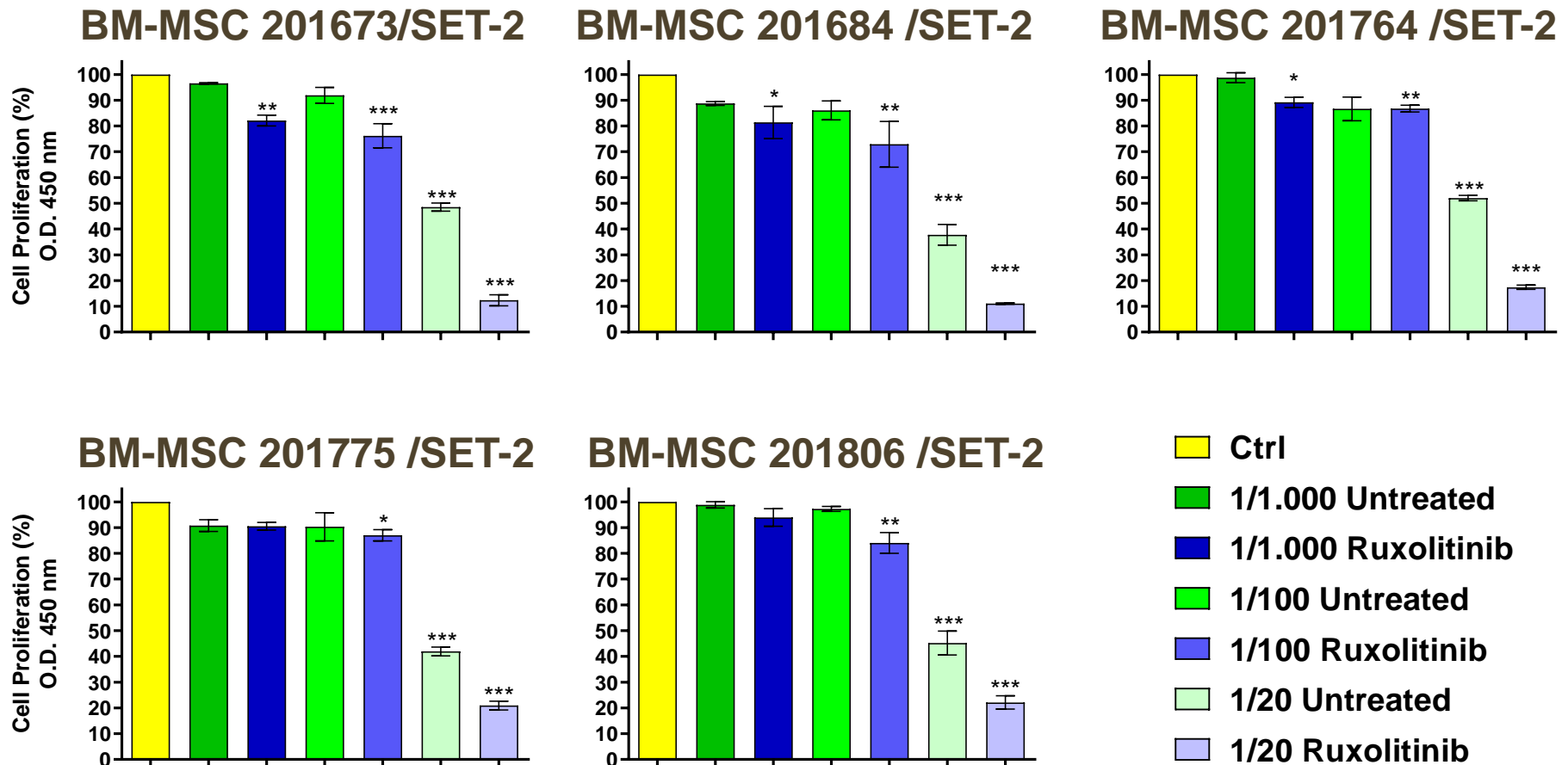
## FASI SPERIMENTALI (IV)

- *Espansione di linee cellulari di MSC primarie da pazienti con MFI o PV-MFI con presenza della mutazione JAK2 V617F*
- *Valutazione dei livelli colturali di Ruxolitinib in BM-MSC trattate col farmaco tramite metodica HPLC*
- *Valutazione in vitro dell'effetto anti-proliferativo di Ruxolitinib e del mezzo condizionato ottenuto da BM-MSC trattate con il farmaco*
- *Valutazione in vitro del potenziale inibitorio delle BM-MSC trattate o non con Ruxolitinib sulla proliferazione di cellule immortalizzate SET-2*



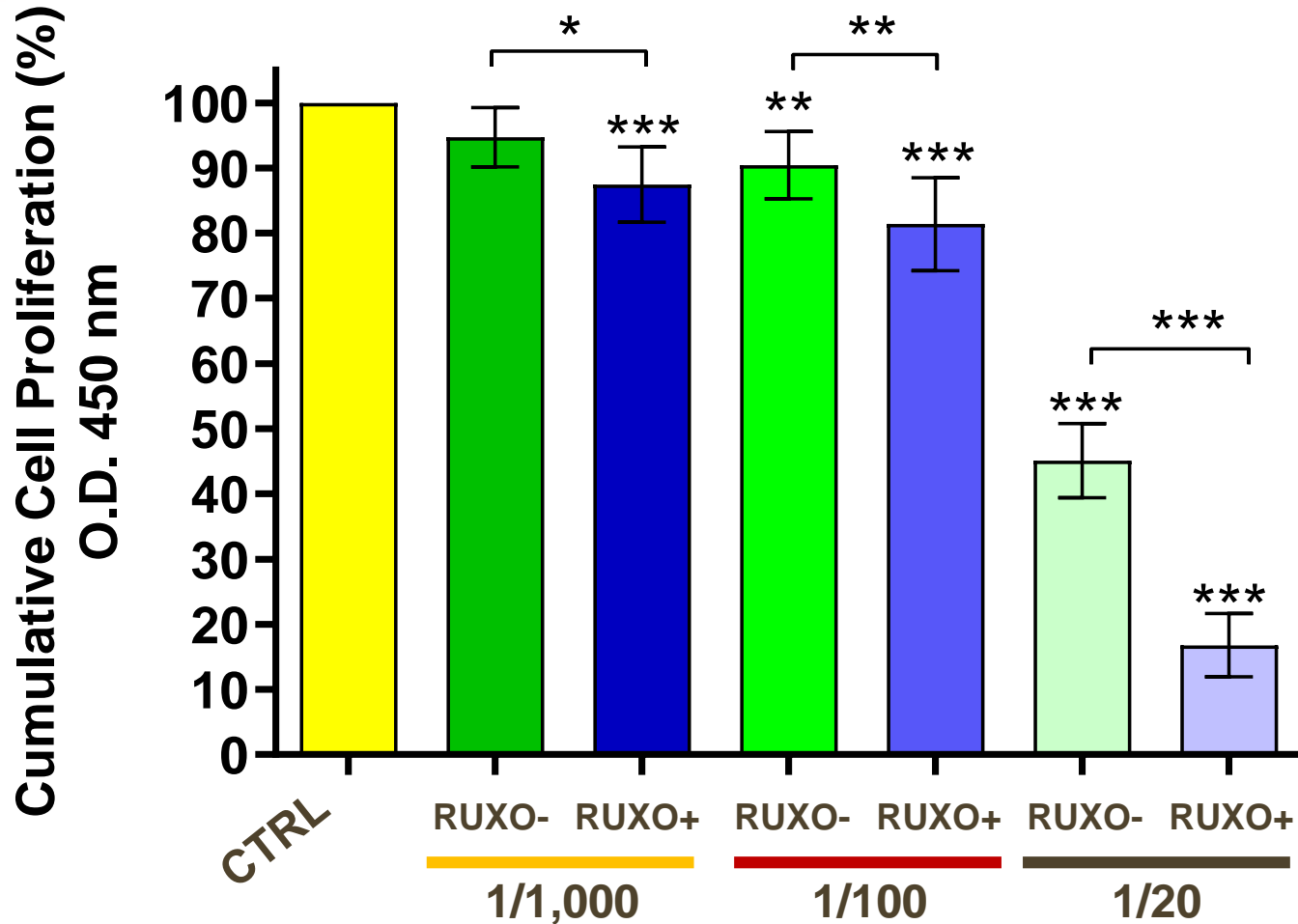


# POTENZIALE INIBITORIO DI BMMSC TRATTATE E NON TRATTATE CON RUXOLITINIB SULLA ATTIVITÀ PROLIFERATIVA DI CELLULE SET-2





# POTENZIALE INIBITORIO DI BMMSC TRATTATE E NON TRATTATE CON RUXOLITINIB SULLA ATTIVITÀ PROLIFERATIVA DI CELLULE SET-2





# CONCLUSIONI

- ✓ **INTERNALIZZAZIONE E RILASCIO GRADUALE DI RUXOLITINIB DA PARTE DELLE BM-MSC**
- ✓ **RIDUZIONE DELLA PROLIFERAZIONE DELLE CELLULE SET-2 MAGGIORE CON CM-RUXOLITINIB vs RUXOLITINIB**
- ✓ **POTENZIALE INIBITORIO MAGGIORE DELLE BMMSC TRATTATE CON RUXOLITINIB RISPETTO ALLE NON TRATTATE, SULLA PROLIFERAZIONE DI CELLULE IMMORTALIZZATE SET-2, CHE AUMENTA ALL'AUMENTARE DEI RAPPORTI DI SEMINA BM-MSC/SET-2**



# RINGRAZIAMENTI



**UOC Ematologia e Trapianti di  
Cellule Staminali Emopoietiche**



**Prof. Carmine Selleri**



**UOC di Farmacologia Clinica**

***Prof. Amelia Filippelli  
Prof. Viviana Izzo  
Dr. Bruno Charlier  
Dr. Marine Pingeon  
Dr. Albino Coglianesi  
Dr. Valentina Giudice***