

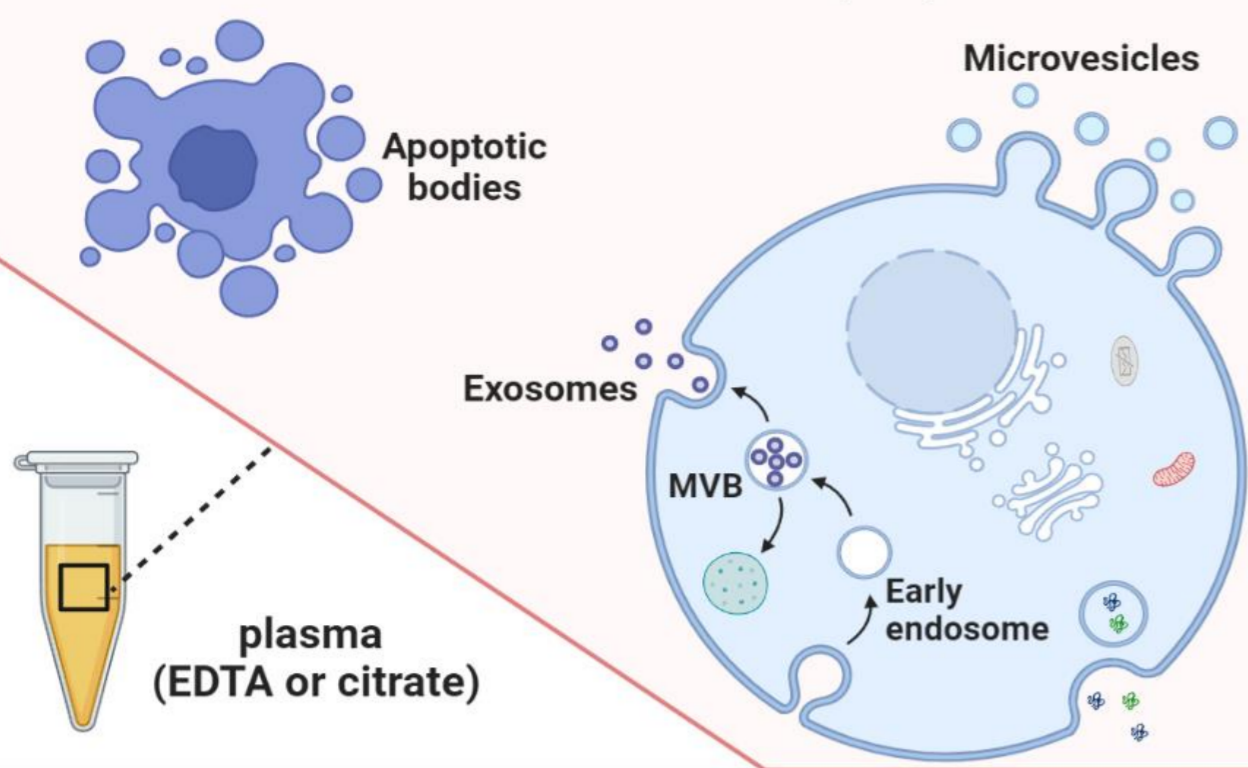
# VESICOLE EXTRACELLULARI DA PLASMA: IMPATTO DEL TIPO DI ANTICOAGULANTE E DELLA TECNICA DI ISOLAMENTO

Mazzucco, E.<sup>a,b</sup> (eleonora.mazzucco@uniupo.it); Bettio, V.<sup>a,b</sup>; Cracas, S.<sup>a</sup>; Bruno, S.<sup>c</sup>; Venegoni, C.<sup>d</sup>; Vasile, A.<sup>a</sup>; Chiocchetti, A.<sup>d</sup>; Antona, A.<sup>a</sup>; Quaglia, M.<sup>a,f</sup>; Camussi, G.<sup>c</sup>; Cantaluppi, V.<sup>a,f</sup>; Panella, M.<sup>a</sup>; Rolla, R.<sup>a,e</sup>; Manfredi, M.<sup>a</sup>; Capello, D.<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Medicina Trasfusionale, Università del Piemonte Orientale, Via Solaroli 17, 28100, Novara; <sup>b</sup>UPO Biobank, Università del Piemonte Orientale, Corso Trieste 15/A, 28100, Novara; <sup>c</sup>Molecular Biotechnology Center, Università di Torino, Corso Dogliotti 14, 10126, Torino; <sup>d</sup>Dipartimento di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale, Via Solaroli 17, 28100, Novara; <sup>e</sup>Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliera-Universitaria "Maggiore della Carità", Università del Piemonte Orientale, Largo Bellini 18, 28100, Novara; <sup>f</sup>Nefrologia - Centro Trapianti Rene, Azienda Ospedaliera-Universitaria "Maggiore della Carità", Università del Piemonte Orientale, Largo Bellini 18, 28100, Novara.

## Introduzione

### Extracellular Vesicles (EV)



Le vescicole extracellulari (EVs) sono importanti mediatori della comunicazione intercellulare, grazie alla loro capacità di veicolare e trasferire molecole biologiche tra cellule diverse, nonché di influenzare il microambiente extracellulare.

Dagli studi più recenti le EVs stanno emergendo come promettenti biomarcatori con valore predittivo, diagnostico e terapeutico ma, al contempo, è evidente la necessità di ottimizzare e standardizzare delle procedure che permettano l'isolamento delle EVs, la cui purezza e qualità è influenzata da numerose variabili pre-analitiche.

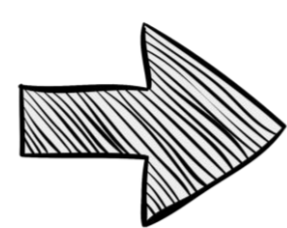
In questo studio ci si è focalizzati sull'influenza dell'anticoagulante e del metodo di purificazione sul profilo delle EVs purificate.

I dati presentati fanno parte di un ampio progetto di UPO Biobank volto a impiegare le EVs come markers di invecchiamento in studi di popolazione e di malattia.

## Procedura sperimentale



Studio all'interno del progetto BioMAGE (approvato dal Comitato Etico, CE 290/20).  
Campioni analizzati:  
✓ Plasma EDTA (PLE) e plasma citrato (PLC) derivanti dagli stessi soggetti maschi sani.  
✓ Età al prelievo tra 25-46 anni.

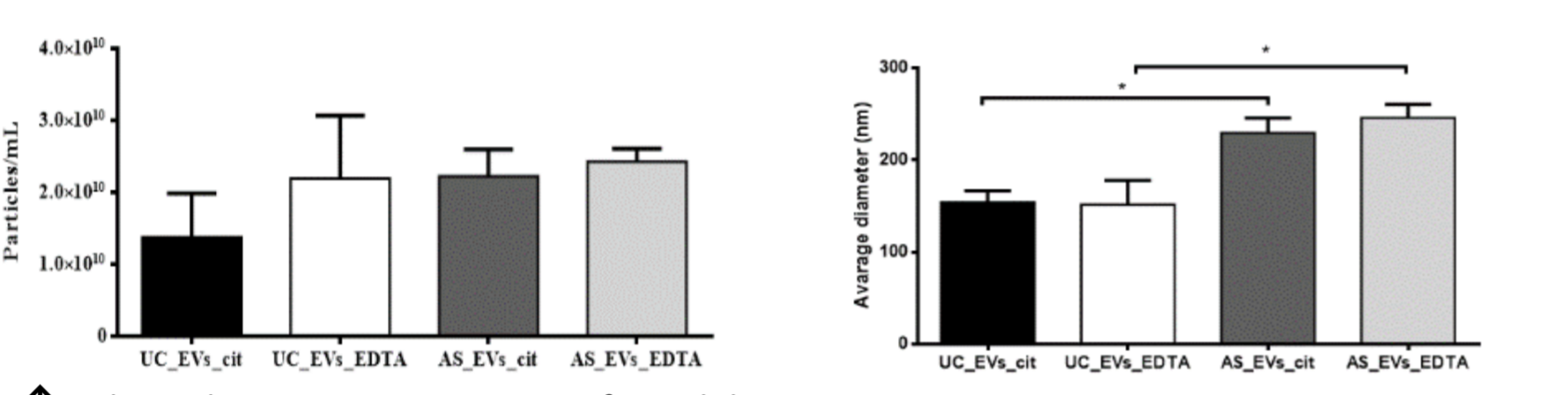


- ✓ Creazione di n.5 pool (pool A, B, C, D ed E) ciascuno con n.6 aliquote di PLE e PLC.
- ✓ Isolamento da ogni pool di EVs con ultracentrifuga UC (Optima™ LE-80K Ultracentrifuge, Beckman Coulter) e con kit di affinità AS (kit ExoEasy kit, Qiagen).
- ✓ Caratterizzazione delle EVs ottenute da PLE con UC (UC-EVs\_EDTA), da PLE con kit (AS-EVs\_EDTA), da PLC con UC (UC-EVs\_cit) e da PLC con kit (AS-EVs\_cit).

## Risultati sperimentali

### Concentrazione e dimensione EVs

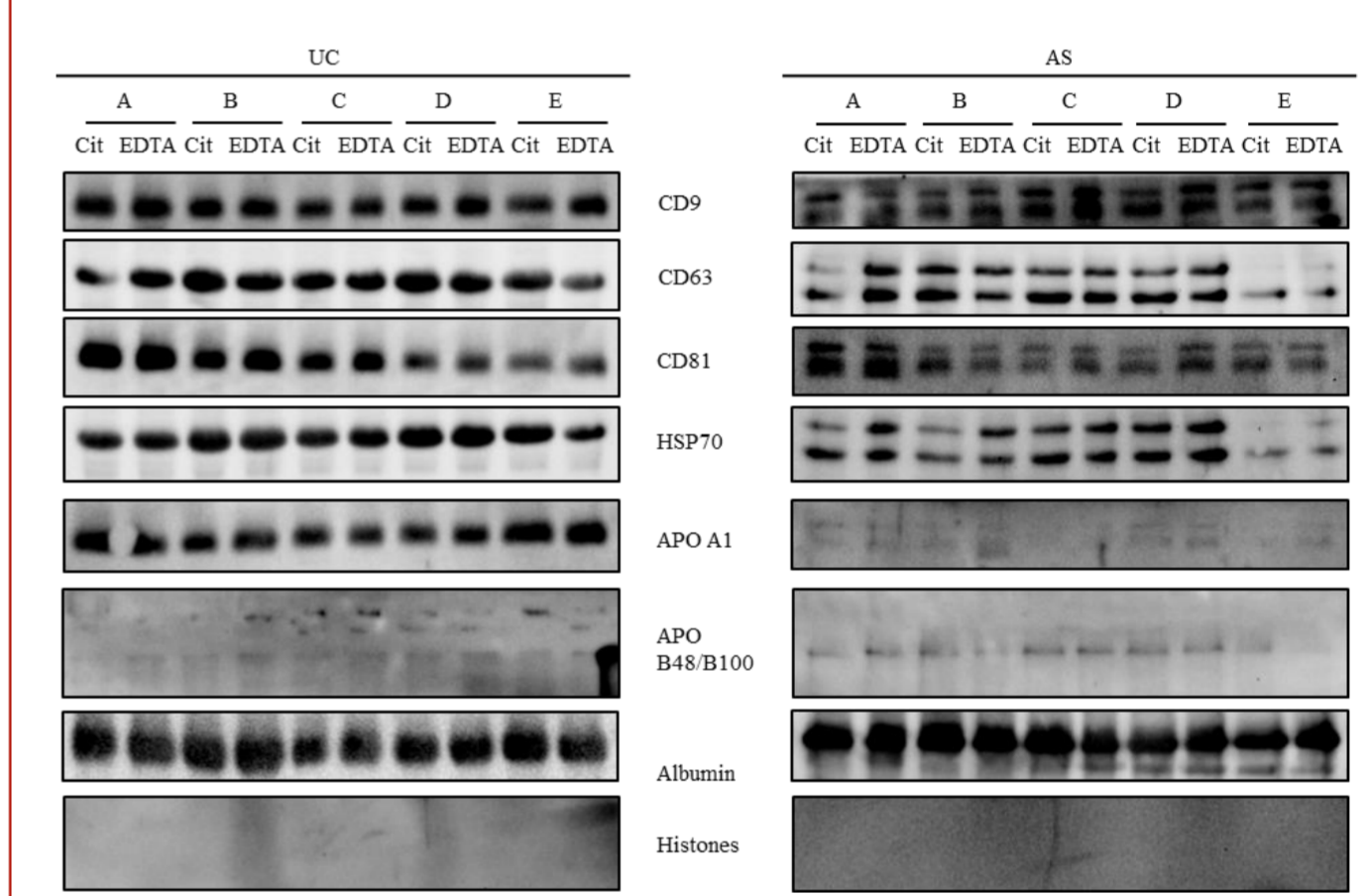
Ogni pool viene analizzato tramite NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) per verificare la concentrazione e le dimensioni delle EVs isolate. Dai risultati, concentrazione e dimensione ottenuti sono confrontabili con la letteratura.



↑ Valori di **concentrazione** confrontabili, nessuna differenza statistica in funzione del tipo di anticoagulante o del metodo di isolamento.

↑ Considerando le **dimensioni**, a parità di anticoagulante, AS-EVs statisticamente più grandi rispetto a UC-EVs (\*t-student <0.05).

### Verifica della presenza di markers e di contaminanti di EVs secondo le linee guida MISEV2018 mediante analisi western blot

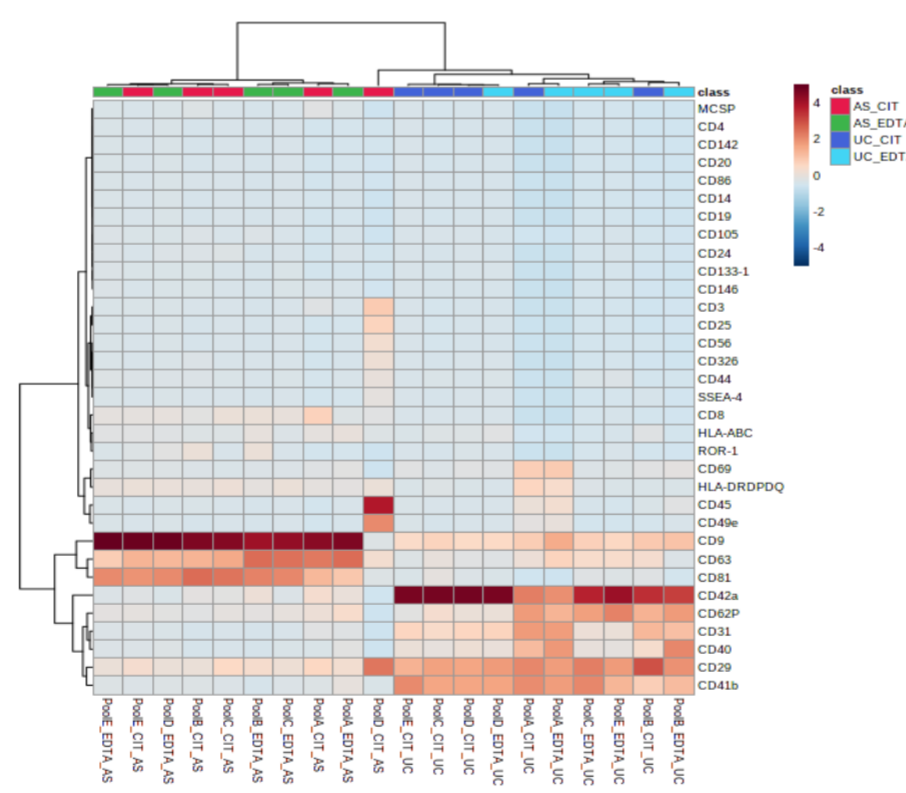


↑ Sia per le EVs isolate da UC che da AS si osservano markers di EVs (CD9, CD63, CD81 e HSP70) e di contaminanti (APOA1, APOB48/B100, albumina e istoni).  
Non si osservano differenze significative tra i due tipi di anticoagulanti.

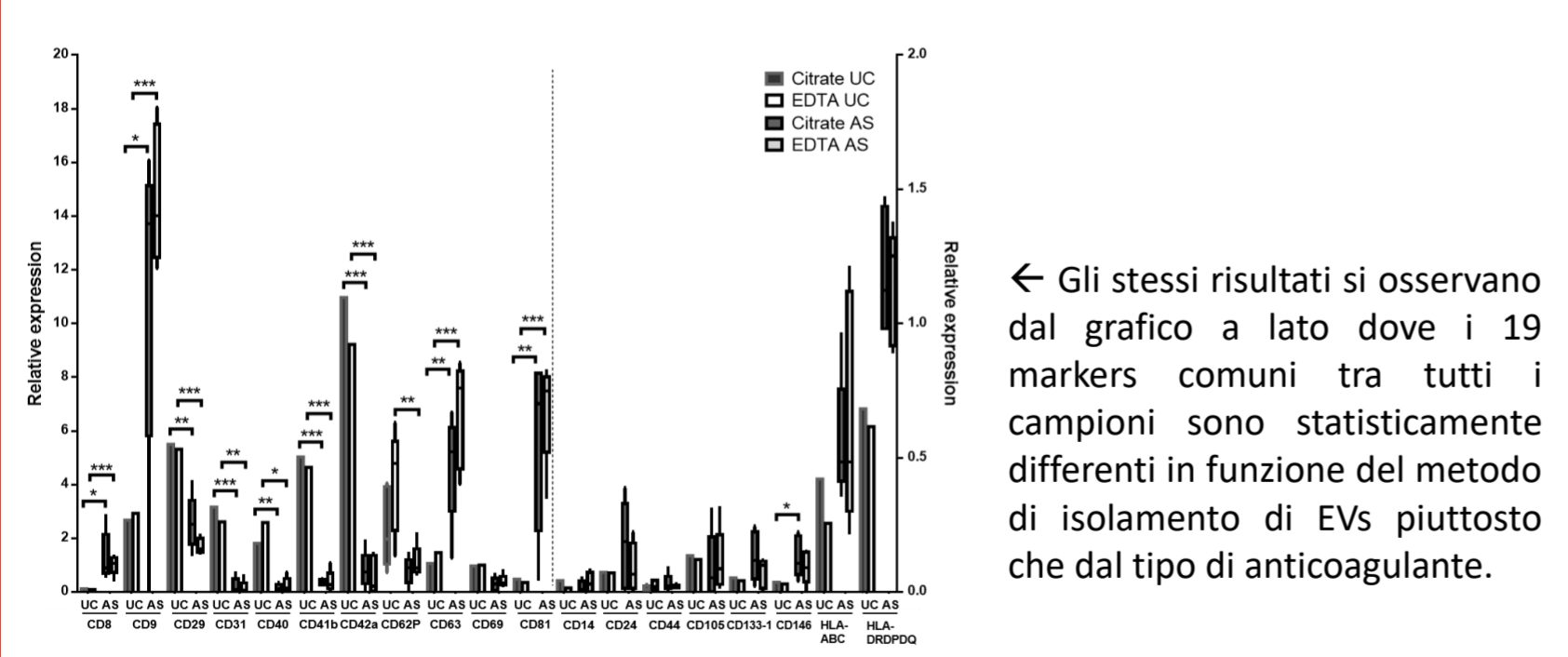
### Analisi di markers tramite analisi citofluorimetrica

Tutti i pool vengono studiati tramite analisi citofluorimetrica valutando contemporaneamente 37 markers di EVs (MACSplex kit).

L'heat map mostra che l'anticoagulante (cit ed EDTA) non sembra influenzare il tipo di EVs, a differenza del metodo di estrazione (AS in rosso e verde, UC in blu e azzurro).



- I markers principalmente espressi sono:
- CD9, CD63, CD81 (markers di EVs),
  - CD41b, CD42a, CD62P (markers piastrinici),
  - CD29 e CD40 (markers linfocitarii).

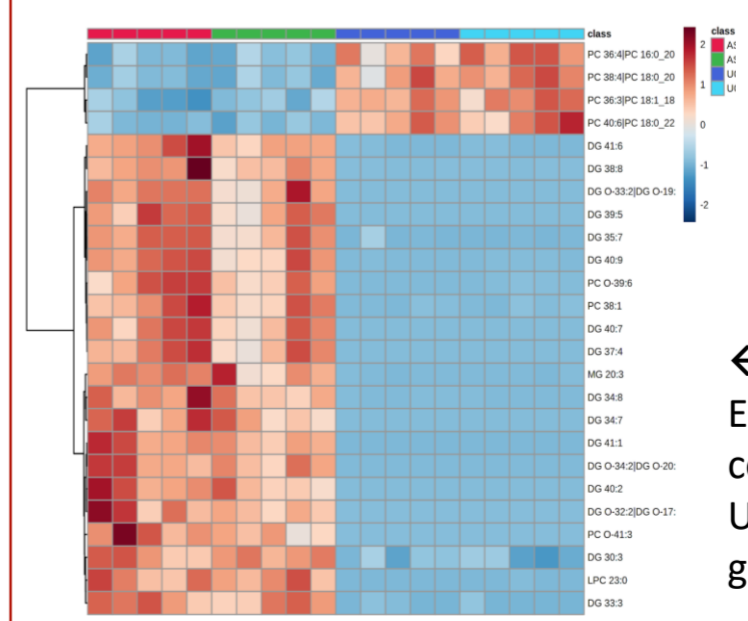
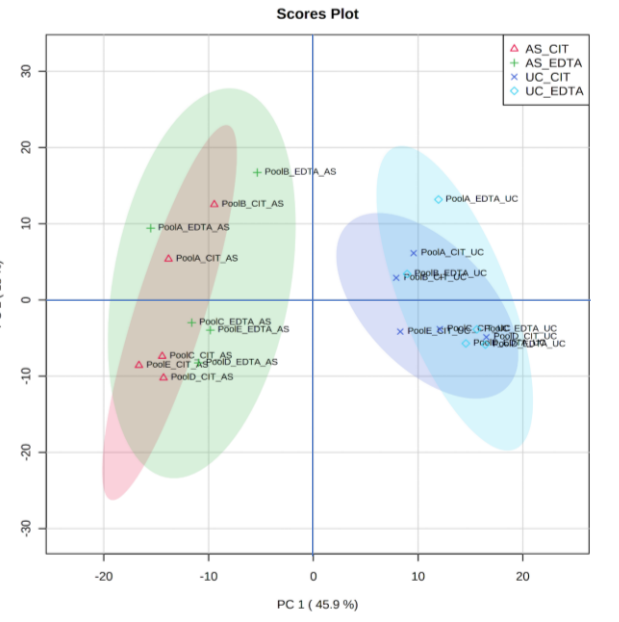


← Gli stessi risultati si osservano dal grafico a lato dove i 19 markers comuni tra tutti i campioni sono statisticamente differenti in funzione del metodo di isolamento di EVs piuttosto che dal tipo di anticoagulante.

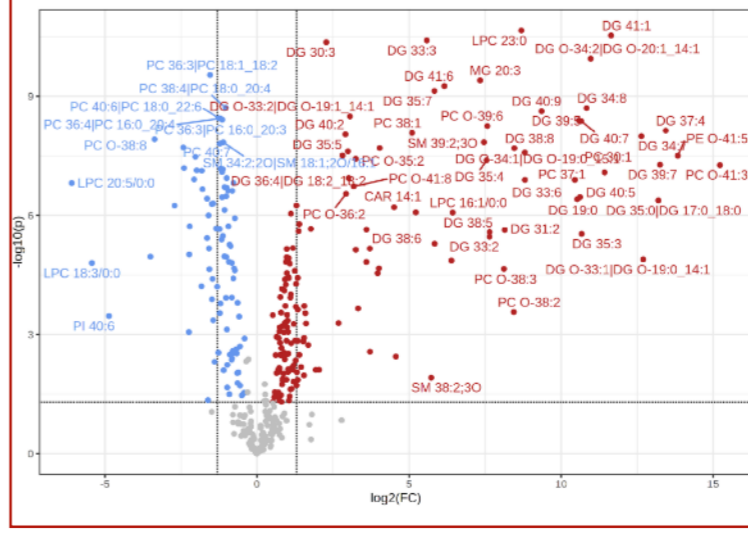
### Studio del profilo lipidico

Sulle EVs isolate da PLE e PLC con UC e AS vengono estratti i lipidi e analizzati tramite HPLC-MS ad alta risoluzione in modalità untargeted. Vengono identificate più di 350 specie lipidiche appartenenti alle principali famiglie: glicerolipidi (MG, DG, TG); acidi grassi (FA, CAR); glicerofosfolipidi (PC, LPC, PE, LPE, PS) e sfingolipidi (Cer, HexCer, SM).

Dall'analisi delle componenti principali (PCA) si osserva la separazione tra i campioni in funzione del metodo di isolamento (AS e UC) ma non in base al tipo di anticoagulante (EDTA e cit). →



← Dalla heat map si osserva che AS-EVs sono caratterizzati da un più alto contenuto di glicerolipidi, mentre UC-EVs presentano soprattutto glicerofosfolipidi (fosfatidilcoline).



← Gli stessi risultati vengono confermati da Volcano plot (FC>1.3 e p<0.05) che confronta AS-EVs rispetto a UC-EVs. In rosso: lipidi più abbondanti in AS-EVs (glicerolipidi). In blu: lipidi più abbondanti in UC-EVs (glicerofosfolipidi).

## Conclusioni

- I nostri dati mostrano che il tipo di anticoagulante utilizzato per il prelievo non influenza in modo significativo il profilo delle EVs purificate da plasma. Questo risultato è rilevante in quanto consente ad una biobanca di avere una maggiore disponibilità di campioni e di materiale di partenza per effettuare analisi su EVs.
- Il metodo utilizzato per la purificazione delle EVs è, invece, un elemento critico che deve essere accuratamente valutato sia al momento della pianificazione dello studio, sia al momento della interpretazione dei risultati.
- Con entrambi i metodi di purificazione si ottengono preparazioni di EVs fortemente contaminate da proteine e lipidi plasmatici. Tali contaminanti possono influire significativamente nella interpretazione dei risultati ottenuti a valle di indagini volte ad indagare il profilo molecolare delle EVs.