

ACADEMIA ROMANA
Institutul de Biologie si Patologie Celulara
“Nicolae Simionescu”, Bucuresti

TEZA DE DOCTORAT

**Studii privind diferentierea celulelor
progenitoare in cardiomiocite in scopul
eficientizarii transplantului celular cardiac**

Conducator Stiintific
Acad. Maya Simionescu

Doctorand
Ana-Maria Rosca

2012

CUPRINS

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOSTINTELOR

I.1. Efectul ischemiei asupra celulelor musculare cardiace

- I.1.1. Organizarea structurala a cardiomiocitului
- I.1.2. Metabolismul celulei musculare cardiace
- I.1.3. Ischemia miocardului
- I.1.4. Procesul patologic al cardiomiopatiei ischemice
- I.1.5. Apoptoza celulelor musculare cardiace
 - I.1.5.1. Calea extrinseca de initiere a apoptozei in cardiomiocite
 - I.1.5.2. Calea intrinseca de initiere a apoptozai in cardiomiocite
 - I.1.5.3. Rolul proteinelor din familia Bcl-2 in reglarea apoptozei cardiomiocitelor

I.2. Celule stem mezenchimale din maduva osoasa hematogena

- I.2.1. Structura maduvei osoase
- I.2.2. Celulele stem mezenchimale
 - I.2.2.1. Potentialul osteogenic
 - I.2.2.2. Potentialul adipogenic
 - I.2.2.3. Potentialul condrogenic
 - I.2.2.4. Nisa celulelor stem mezenchimale
 - I.2.2.4.1. Componentele celulare
 - I.2.2.4.2. Componentele solubile
 - I.2.2.4.3. Componentele matricei extracelulare
 - I.2.2.5. Rolul celulelor stem mezenchimale in sustinerea celulelor stem hematopoietice
 - I.2.2.6. Migrarea celulelor stem mezenchimale si repararea tisulara

I.3. Mecanisme prin care celulele stem mezenchimale contribuie la repararea cardiaca

- I.3.1. Diferentierea celulelor stem mezenchimale dupa transplantare in miocardul infarctizat
- I.3.2. Actiunea paracrina a factorilor eliberati de celulele stem mezenchimale in miocardul infarctizat

I.4. Terapia cu celule stem pentru repararea cardiaca

- I.4.1. Celulele stem mezenchimale
- I.4.2. Mioblastii scheletici
- I.4.3. Celulele progenitoare din maduva osoasa
- I.4.4. Celulele stem embrionare
- I.4.5. Celulele pluripotente induse (iPS)
- I.4.6. Celulele stem cardiace
- I.4.7. Studii clinice

II CONTRIBUTII ORIGINALE

II.1. Alterari moleculare care induc apoptoza cardiomiocitelor in ischemie-reperfuzie

- II.1.1. Introducere si obiective
- II.1.2. Materiale si metode
- II.1.3. Rezultate
 - II.1.3.1. Caracterizarea cardiomiocitelor neonatale
 - II.1.3.2. Apoptoza cardiomiocitelor in ischemie

II.1.3.3. Modificarile moleculare ale proteinelor Bcl-2 induse de ischemie-reperfuzie

II.1.3.4. Efectul oxidantilor exogeni asupra apoptozei cardiomiocitelor

II.1.3.5. Modificarile proteinelor Bcl-2 induse de oxidantii exogeni in CMC

II.1.4. Discutii si concluzii

II.2. Metode alternative de izolare a celulelor stem mezenchimale

II.2.1. Purificarea celulelor stem (in gradient de Percoll)

II.2.1.1. Introducere si obiective

II.2.1.1. Materiale si metode

II.2.1.3. Rezultate

II.2.1.3.1. Localizarea si cuantificarea celulelor c-kit si Sca-1 pozitive in maduva osoasa de soarece

II.2.1.3.2. Separarea celulelor din maduva osoasa pe gradient de Percoll

II.2.1.3.3. Cuantificarea celulelor progenitoare in fractiile obtinute in urma centrifugarii aspiratului medular pe gradient discontinuu de Percoll

II.2.1.3.4. Evaluarea potentialului clonogen al celulelor progenitoare hematopoietice

II.2.1.3.5. Expresia markerilor de celule diferiteiate in fractii

II.2.1.4. Discutii/concluzii

II.2.2. Izolarea celulelor stem mezenchimale din maduva osoasa hematogena

II.2.2.1. Introducere si obiective

II.2.2.2. Materiale si metode

II.2.2.3. Rezultate si discutii

II.2.2.3.1. Caracterizarea fenotipica a celulelor

II.2.2.3.2. Caracterizarea functionala a celulelor stem mezenchimale

II.2.2.4. Concluzii

II.3. Diferentierea celulelor stem mezenchimale in cardiomiocite

II.3.1. Diferentierea in vitro a celulelor stem mezenchimale in cardiomiocite

II.3.1.1. Introducere si obiective

II.3.1.2. Materiale si Metode

II.3.1.3. Rezultate

II.3.1.3.1. Caracterizarea celulelor stem

II.3.1.3.2. Multipotenta celulelor stem mezenchimale dupa tratamentul cu 5-azacitidina

II.3.1.3.3. Capacitatea 5-azacitidinei de a induce diferentierea miogena in celulele stem mezenchimale

II.3.1.4. Concluzii

II.3.2. Influenta factorilor secretati de miocard asupra diferentierii celulelor stem mezenchimale in cardiomiocite

II.3.2.1. Introducere si obiective

II.3.2.2. Materiale si metode

II.3.2.3. Rezultate

II.3.2.3.1. Testarea capacitatii de diferentiere a celulelor stromale medulare

II.3.2.3.2. Tehnici de marcare celulara

II.3.2.3.3. Diferentierea celulelor stromale medulare indusa de cocultura cu celule musculare cardiace

II.3.2.3.4. Diferentierea celulelor stromale medulare indusa de cocultura cu miocard fetal

II.3.2.4. Concluzii

II.4. Evidentierea factorilor cu efect paracrin secretati de celulele stem mezenchimale in conditii normale si hipoxice

II.4.1. Introducere si obiective

II.4.2. Materiale si metode

II.4.2. Rezultate si discutii

II.4.2.1. Conditii de inducere a apoptozei in celulele musculare cardiace

II.4.2.2. Rezistenta MSC la apoptoza indusa de ischemie

II.4.2.3. Efectul anti-apoptotic al factorilor eliberati de celulele stem mezenchimale asupra crdiomiocitelor

II.4.2.4. Identificarea factorilor cu efect cardioprotector eliberati de MSC normale si hipoxice

II.4.4. Concluzii

III. Rezumatul tezei si concluzii generale

IV. Bibliografie

Lucrari publicate in cadrul tezei de doctorat

Finantarea cercetarilor

CUVINTE CHEIE

Cardiomiocite

Apoptoza

Ischemie/Reperfuzie

Oxidanti exogeni

Celule stem mezenchimale

Diferentiere adipogena

Diferentiere osteogena

Diferentiere condrogena

Diferentiere miogena

Hipoxie

Gradient de Percoll

Efect cardioprotector

Mediu conditionat

microRNA

REZUMAT

Introducere – stadiul actual al cunoștințelor

Miopatiile ischemice și non-ischemice duc la disfuncția ventriculului stâng și în final la insuficiență cardiacă. Aceasta din urmă scade calitatea vieții, speranța de viață și crește costurile medicale, constituind astfel una din problemele majore de sănătate (McMurray și Pfeffer, 2005). Terapiile actuale asigură într-o oarecare măsură supraviețuirea și îmbunătățirea simptomelor, dar nu poate reversa condiția țesutului cardiac de la o stare bolnavă la una sănătoasă (Kuraitis *et al.*, 2011). Dezvoltarea recentă a domeniului celulelor stem ar putea oferi o cale de tratare a insuficienței cardiace prin înlocuirea țesutului lezat cu țesut sănătos, fapt ce ar duce la sporirea calității vieții și supraviețuirea pacienților cu diverse cardiomiopatii.

Celulele stem mezenchimale (MSC) din măduva osoasă au fost intens studiate pentru proprietățile lor regenerative și imunomodulatoare. Studiile pe modele animale au arătat că tratamentul cu MSC îmbunătățește funcția cardiacă în urma infarctului miocardic prin scăderea apoptozei și producerea de factori angiogeni (Tang *et al.*, 2005). Deoarece capacitatea de diferențiere a MSC în CMC este foarte scăzută și nu poate explica efectul benefic tranzitoriu al transplantului acestora la locul infarctului observat în studiile preclinice sau clinice (Rose *et al.*, 2008), acest efect a fost pus pe seama efectului paracrin al acestor celule (Gnecchi *et al.*, 2008). Acestea sunt capabile să elibereze factori solubili (citokine, chemokine, factori de creștere) care să acționeze într-o manieră paracrină asupra celulelor miocardului lezat. Mai mult decât atât, recent a fost demonstrat că MSC sunt capabile să comunice cu celulele învecinate prin intermediul unor fragmente membranare circulare, numite microvezicule. Astfel, MSC pot secreta diverse componente solubile, precum receptori, factori de creștere, lipide biologice active, dar și acizi nucleici (ARN mesager și microARN) protejate de acțiunea agresivă a mediului extracelular (Morel *et al.*, 2004; Gatti *et al.*, 2011).

MSC prezintă o serie de avantaje pentru utilizarea lor în medicină regenerativă, precum: (i) aceste celule pot fi izolate cu ușurință și propagate în cultură pentru a obține un număr mare de celule, adecvat pentru terapia celulară, (ii) au imunogenicitate scăzută, ceea ce le face potrivite și pentru transplantul alogen (Dai *et al.*, 2005) și datorită acestui fapt sunt evitate problemele de etică adiacente altor tipuri de celule stem utilizate pentru transplant, precum celulele stem embrionare (iii).

În acest context, scopul acestei teze a fost studierea unor aspecte privind atât apoptoza CMC în condiții ischemice, precum și diferențierea MSC obținute din măduva osoasă adultă de șoarece către celule musculare cardiace. Astfel, pe parcursul întregii perioade de doctorat, studiile realizate au fost focalizate pe înțelegerea mecanismelor prin care miocardul este lezat în timpul și consecutiv infarctului miocardic și pe găsirea unei metode eficiente de reparare a acestui țesut. Teza de față este structurată în două părți principale: prima parte prezintă stadiul actual al cunoștințelor legate de subiectul lucrării de doctorat, prezentat pe parcursul a patru capitole, iar cea de-a doua parte prezintă contribuțiile originale ale doctorandului la cunoașterea științifică, organizate de asemenea în patru capitole.

I. Alterări moleculare care duc la apoptoza cardiomiocitelor în ischemie-reperfuzie

Capitolul I a căutat să răspundă la întrebarea dacă ischemia sau reperfuzia este responsabilă de inducerea apoptozei în CMC. Cunoașterea principalului stimul răspunzător de inducerea a procesului apoptotic în CMC este necesar pentru găsirea unei terapii de încetinire a progresiei insuficienței cardiace datorate pierderii miocardului contractil. Scopul acestui prim studiu a fost determinarea contribuției individuale a ischemiei, reperfuziei și oxidanților exogeni la inducerea apoptozei în CMC, stabilind astfel contribuția majoră la progresia insuficienței cardiace în ischemia/reperfuzia miocardului.

Astfel, prima parte contribuțiilor originale s-a focalizat pe identificarea principalului stimul răspunzător de inițierea apoptozei în miocard, informație extrem de importantă pentru dezvoltarea unei terapii pentru progresia insuficienței cardiace datorate pierderii miocardului contractil. Rezultatele obținute în această primă etapă a stagiului de doctorat au arătat că principalul inductor al apoptozei în ischemie/reperfuzie a fost reperfuzia, mai degrabă decât ischemia *per se*. Studiul respectiv a demonstrat că oxidanții exogeni aduși din mediul înconjurător în timpul reperfuziei sunt principalii determinanți ai apoptozei CMC. 25-hidroxicolesterolul, un component al LDL oxidat, promovează apoptoza CMC printr-un mecanism dependent de caspaza-3, care presupune creșterea expresiei proteinei pro-apoptotice Bax (figura 1), reglată la nivel transcripțional, concomitent cu degradarea post-translațională a proteinei-anti-apoptotice Bcl-2 (figura 2). Alterarea raportului proteinelor pro- și anti-apoptotice creează condiții favorabile inițierii procesului apoptotic, care se poate desfășura doar în timpul reperfuziei, când rezervele de ATP și glucoză sunt refăcute. Datele obținute în urma acestui studiu indică faptul că terapia cu antioxidanți, ar putea juca un rol important pentru salvarea

miocardului viabil în urma unui infarct prin prevenirea pierderii CMC prin moarte celulară programată.

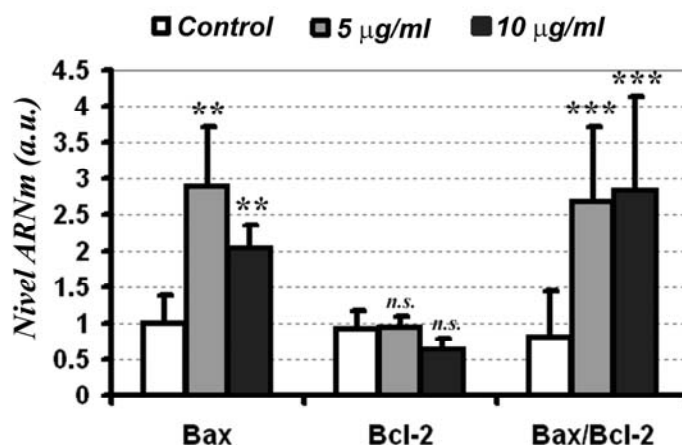


Figura 1: Modificări induse de tratamentul cu 25-HC în expresia genică a proteinelor pro- și anti-apoptotice Bax și Bcl-2 în CMC după 72 de ore de tratament cu 25-HC.

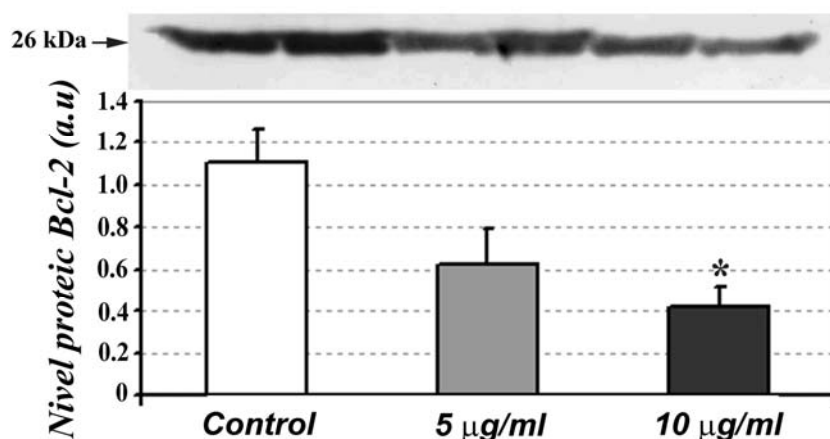


Figura 2: Cuantificarea prin Western Blot a nivelului expresiei proteice a Bcl-2 după tratamentul CMC cu 25-HC.

II. Izolarea celulelor stem mezenchimale

Următoarea etapă a stagiului a presupus punerea la punct a unor metode de obținere a MSC din măduva osoasă de șoarece adult, în vederea utilizării acestora în studii de diferențiere în CMC. Această etapă a studiilor de doctorat a prezentat un interes special deoarece, așa cum este cunoscut în literatură, MSC de șoarece sunt mult mai dificil de izolat și de propagat *in vitro* decât celulele umane sau de șobolan, din cauza contaminării cu celule de origine hematopoietică. Din

această cauză, obținerea unei culturi de MSC de șoarece a reprezentat o provocare care s-a concretizat în izolarea acestui tip de celule concomitent prin două metode. Cultura pură de MSC obținută a fost ulterior caracterizată conform sugestiilor Societății Internaționale de Transplant Celular.

II.1. Izolarea celulelor stem pe gradient de Percoll

Rezultatele obținute au arătat că centrifugarea aspiratului medular de șoarece pe un gradient discontinuu de Percoll determină separarea celulelor în șase fracții, corespunzător densităților 1.050, 1.057, 1.067, 1.070, 1.076 și 1.083 g/ml (figura 3). Celulele progenitoare, caracterizate de expresia markerilor Sca-1 și c-kit, s-au regăsit în fracțiile III-V.

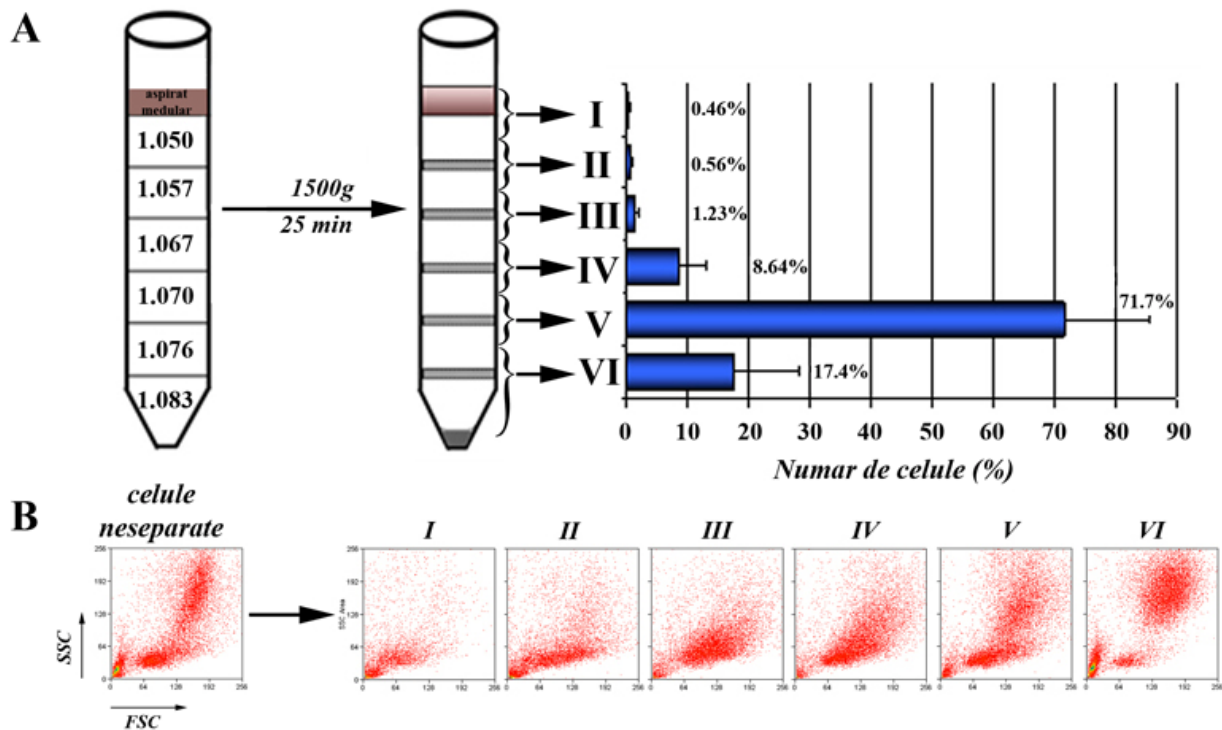


Figura 3: Separarea celulelor din măduva osoasă în șase fracții prin centrifugare pe gradient discontinuu de Percoll. (A) Ilustrare schematică a gradientului de Percoll discontinuu folosit pentru fracționare și procentele corespunzătoare celulelor recuperate din fiecare fracție după centrifugare. (B) Histograme de citometrie de flux ilustrând heterogenitatea celulelor înainte de separare și morfologia celulelor în fiecare fracție.

Fracția IV a fost considerată ca fiind de interes, deoarece la nivelul acesteia au segregat aproximativ 2×10^6 celule progenitoare dintr-un total de 4.3×10^6 celule (figura 4). Deși compoziția

celulară a acestei fracții a fost heterogenă, aceasta a cuprins, pe lângă celule c-kit și Sca-1 pozitive, și celule endoteliale, care ar putea juca un rol important în refacerea miocardului lezat după infarct, prin contribuția la revascularizarea țesutului prin angiogeneză. Prin cultivare, aceasta fracție a generat o cultură CD45⁻/c-kit⁻/Sca-1⁺/PECAM⁻/VEGFR2⁻/osteocalcină⁻/colagen II⁻, care, prin incubare în condiții specifice de diferențiere, a generat adipocite și osteoblaste, demonstrând caracterul multipotent al acestor celule (figurile 5 și 6).

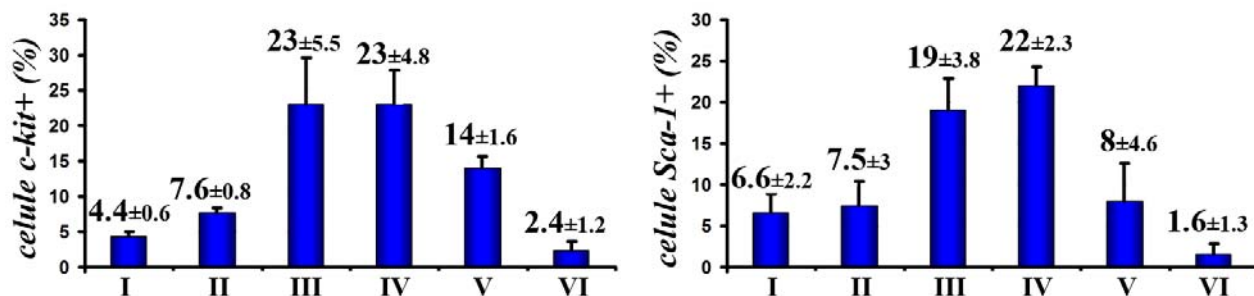


Figura 4: Reprezentarea grafică a mediei procentelor de celule c-kit⁺, respectiv Sca-1⁺ din fiecare fracție din trei experimente diferite.

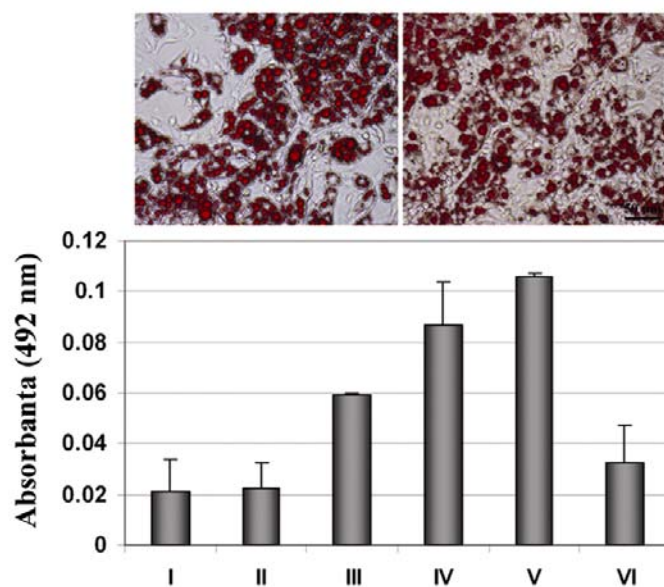


Figura 5: Cuantificarea spectrofotometrică a acumulării de lipide în cele șase fracții după cultivarea celulelor în mediu adipogenic. În partea superioară se găsesc imagini reprezentative ale fracțiilor III și IV colorate cu Oil Red. Fracția V, deși prezintă acumulare masivă de lipide, nu este îmbogățită în celule progenitoare, colorația datorându-se probabil prezenței preadipocitelor la acest nivel.

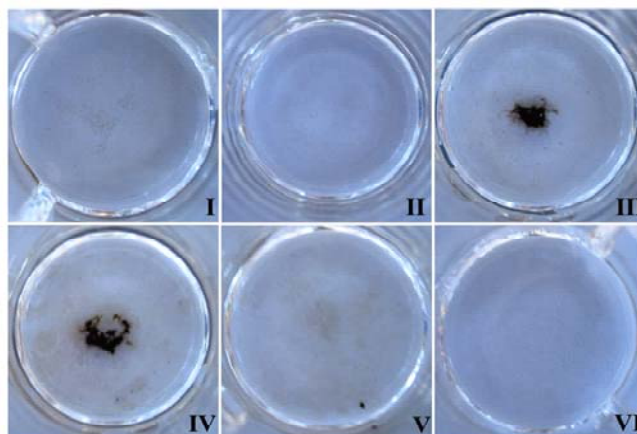


Figura 6: Imagine de microscopie optică reprezentând colorația von Kossa a celulelor aderente obținute din cele șase fracții după două săptămâni de cultivare în mediu osteogenic. Se observă că fracțiile III și IV, dar nu și fracția V (care conține majoritatea celulelor) au fost capabile să genereze osteoblaste în condiții de cultură specifice.

II.2. Izolarea celulelor stem mezenchimale din maduva osoasa hematogena

În paralel cu metoda prezentată anterior, a fost obținută o populație de celule stem mezenchimale prin menținerea în cultura aspiratului medular pentru o perioadă mai lungă, de aproximativ opt săptămâni. Celulele obținute au format o cultură omogenă, cu aspect fibroblast-like și potențial mare de proliferare, fiind ușor de expandat *in vitro*. Caracterizarea acestei culturi prin RT-PCR (figura 7a) a arătat expresia markerilor de celule stem Sca-1 și CD105 (endoglină), dar și lipsa markerului c-kit, ceea ce a indicat sărăcirea în celule progenitoare hematopoietice. O altă caracteristică a acestor celule a constituit-o prezența filamentelor intermediare de vimentină și nestină. Expresia acestor proteine (figura 7b) a sugerat un posibil rol în procesul de regenerare tisulară deoarece prezența filamentelor de nestină este specifică celulelor tinere, cu capacitate de migrare.

Caracterizarea acestor celule a fost completată cu studii de diferențiere către multiple tipuri celulare, precum adipocite, osteoblaste, condrocite și a demonstrat caracterul multipotent al acestora, menținut nealterat pe parcursul mai multor pasaje (figura 8). Această cultură a fost utilizată în studiile ulterioare de diferențiere către un fenotip muscular, ale caror rezultate sunt cuprinse în Capitolul III al tezei.

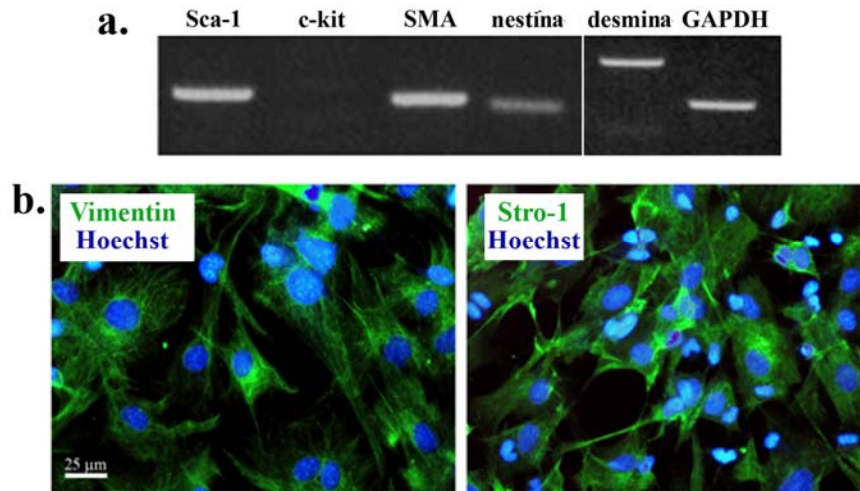


Figura 7: (a) RT-PCR arătând expresia la nivel de ARNm a markerilor de MSC: Sca-1, actina specifică celulelor musculare netede (SMA) și desmina și lipsa expresiei markerului de celule stem hematopoietice c-kit; (b) Imagine de imunocitochimie arătând prezenta filamentelor intermediare de vimentină și a markerului de celule stromale Stro-1 la nivelul tuturor celulelor din cultură.

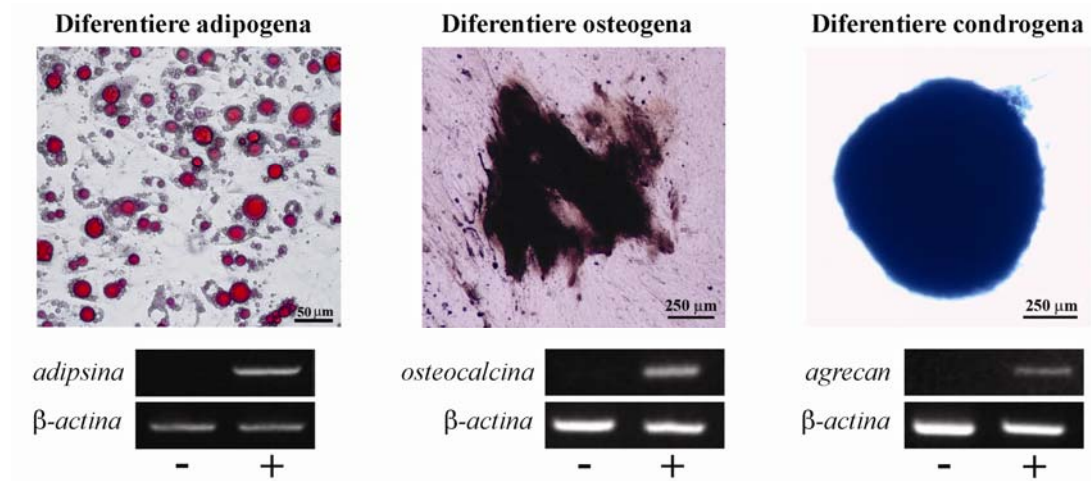


Figura 8: Caracterizarea proprietății de multipotență a MSC. În partea stângă a imaginii este evidențiată diferențierea celulelor către adipocite prin colorarea acumulărilor intracitoplasmatiche de lipide cu Oil Red O și prin determinarea expresiei genice de adiponectină prin RT-PCR. În partea centrală se observă diferențierea celulelor către osteoblaste. Sus este prezentat un nodul de calcefiere colorat prin tehnica von Kossa, iar jos este prezentată inducerea expresiei de osteocalcină (RT-PCR). În partea dreaptă este evidențiată sinteza de mucopolizaharide acide a celulelor diferențiate în condrocite prin colorație cu Alcian Blue, precum și expresia proteoglicanului agrecan în celulele diferențiate.

III. Studii de diferențiere a celulelor stem mezenchimale în cardiomiocite

Pentru inducerea diferențierii MSC către un fenotip cardiac a fost utilizată 5-azacitidina, un compus cu acțiune de demetilare a materialului genetic, cunoscut pentru capacitatea sa de a potența diferențierea celulelor stem embrionare către CMC.

Un punct de interes l-a constituit de asemenea acțiunea 5-azacitidinei asupra multipotenței celulelor stem, respectiv a capacității acestui compus de a afecta capacitatea MSC de a se diferenția către multiple linii celulare. Rezultatele au arătat că celulele tratate cu 5-azacitidina și-au pierdut progresiv capacitatea de a se diferenția către adipocite și osteoblaste când au fost incubate în condiții de diferențiere specifice. Un rezultat neașteptat l-a constituit creșterea potențialului de diferențiere condrogenică consecutiv tratamentului cu 5-azacitidina. Concluzia acestui studiu a fost că MSC își păstrează proprietatea de multipotență după prima expunere la acțiunea 5-azacitidinei, dar aceasta este redusă progresiv cu fiecare expunere, concomitent cu creșterea capacității celulelor tratate de a genera condrocite (figura 9).

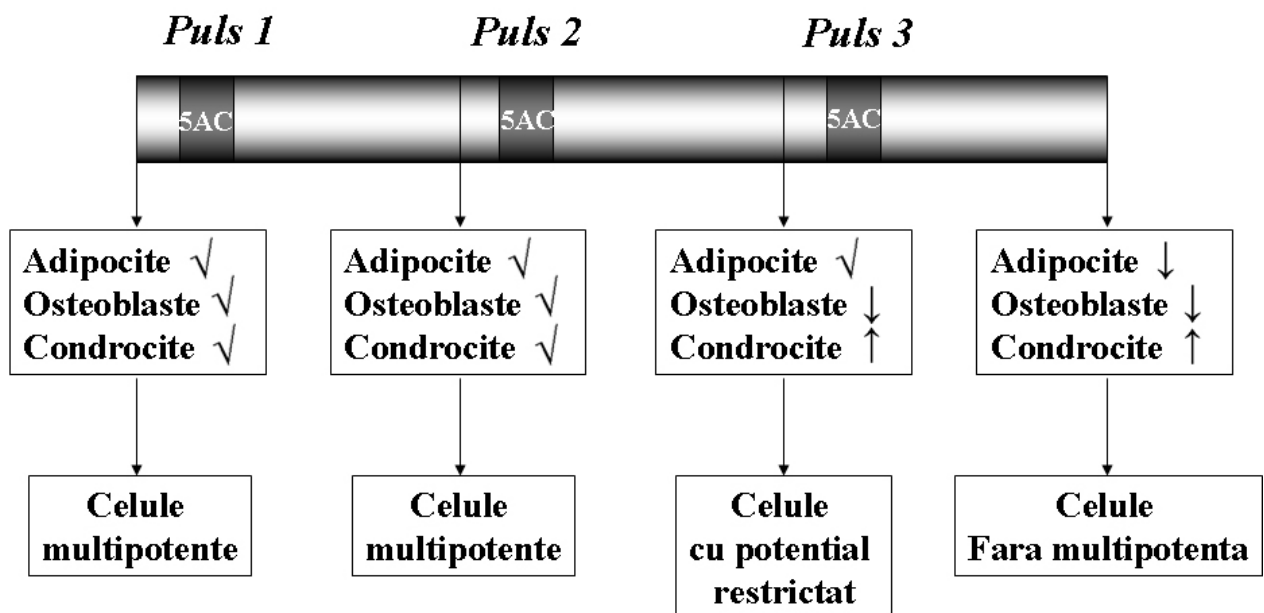


Figura 9: Efectul tratamentului cu 5-azacitidina asupra multipotenței MSC. Aceasta proprietate a devenit restrictată după mai mult de o expunere la 5-azacitidină. După 2 sau 3 pulsuri cu 5-azacitidină, capacitatea MSC de a se diferenția către condrocite a crescut considerabil.

În paralel cu punerea în evidență a modificării caracterului pluripotent al MSC prin tratamentul cu 5-azacitidina, a fost urmărită capacitatea acestui agent demetilant de a induce

diferențierea acestor celule către un fenotip muscular cardiac. După cum se observa în figurile 10 și 11, cu excepția unor gene specific musculare (α -actina cardiacă, canalul de calciu de tip L), nu a fost indusă expresia nici uneia dintre genele implicate în diferențierea musculaturii cardiace în celulele tratate. Cu toate acestea, 5-azacitidina a indus expresia unor gene specifice musculaturii striate, ceea ce permis diferențierea MSC în mioblaști în condiții miogene specifice (figura 12). În concluzie, tratamentul MSC cu 5-azacitidină ar putea favoriza diferențierea acestora în celule cardiace, cu condiția determinării unor factori specifici care ar putea influența finalizarea procesului de diferențiere către CMC mature și funcționale.

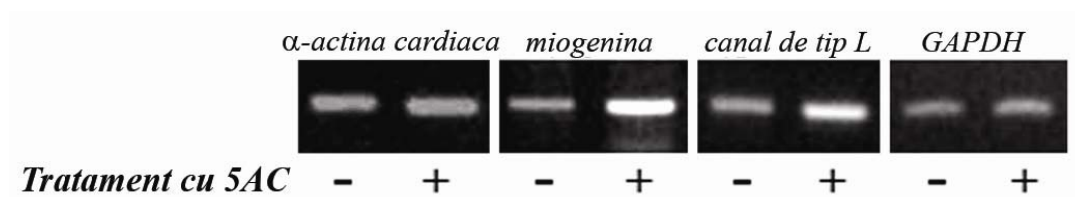


Figura 10: Imagine de RT-PCR arătând expresia crescută a unor gene specific musculare după tratamentul cu 5-azacitidină.

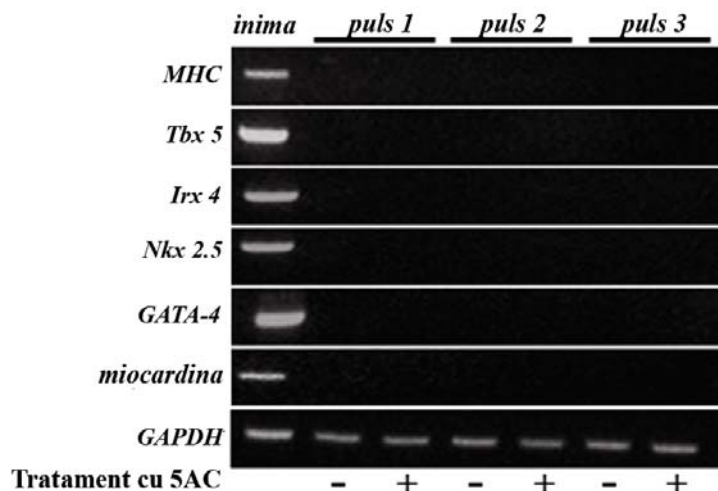


Figura 11: Imagine de RT PCR în care se observă absența inducerii expresiei factorilor de transcripție, precum și a altor gene specific cardiace după tratamentul cu 5-azacitidină.

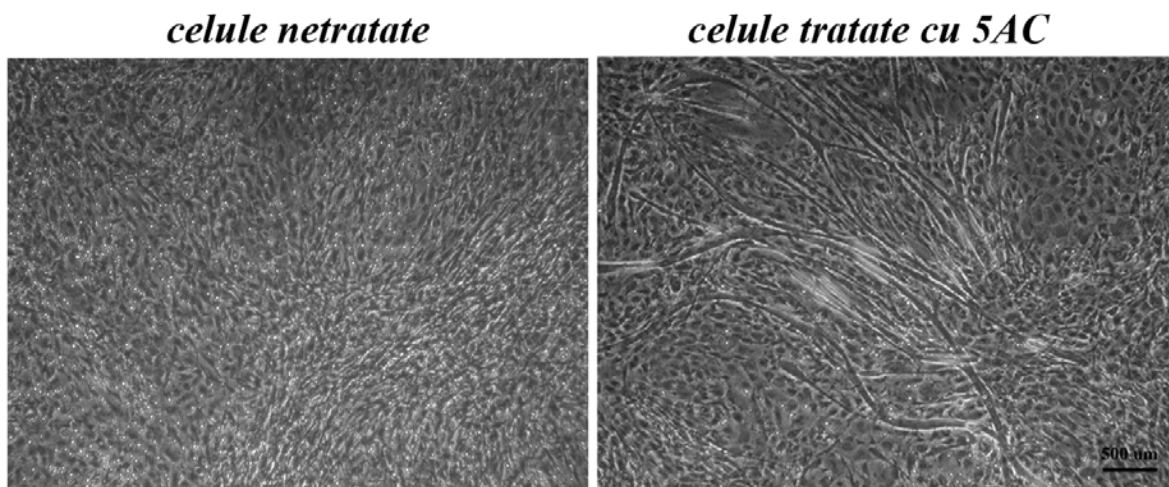


Figura 12: Imagine de microscopie in contrast de faza aratand prezenta miotubilor formati in cultura de celule stem mezenchimale tratate cu 5-azacitidina dupa deprivarea de ser.

Ca urmare a acestor observații, am considerat că tratamentul cu 5-azacitidină asociat cu contactul direct cu celulele musculare cardiace ar putea avea un efect benefic asupra diferențierii celulelor stromale în CMC. Astfel, în continuare am urmărit modificările apărute în celulele stromale medulare prin contact direct cu celule musculare cardiace. Rezultatele au arată că, într-adevăr, cumularea celor doi factori inductori, a dus la inițierea expresiei unor factori de transcripție specific cardiaci în celule stromale medulare de șoarece, precum GATA-4 și Nkx2.5 (figura 13). Mai mult, s-a observat că expresia acestuia din urmă a fost indusă doar în cazul cumulării celor două condiții de diferențiere. În plus, în acest caz, a fost evidențiată și expresia actiniei, un indicator al diferențierii către un fenotip muscular de tip striat.

Mai mult decât atât, rezultatele experimentelor de cocultură în camere duble au arătat ca factorii solubili eliberați de miocardul ischemic împreună cu tratamentul cu 5-azacitidină au avut ca efect creșterea diferențierii celulelor medulare către un fenotip cardiac. Astfel, cumularea expunerii la acțiunea 5-azacitidinei cu semnalele provenite de la țesutul miocardic ischemic au avut ca rezultat inițierea transcrierii unor factori esențiali implicați în procesul de diferențiere cardiomiogenă, cum cum sunt: actina și actinina caracteristice musculaturii de tip striat, desmina, GATA-4 și Nkx2.5 și a canalului de calciu de tip L (figura 14). Astfel, se poate concluziona că inițierea diferențierii indusă de demetilarea anumitor gene este ajutată de efectul unor factori cardiaci solubili, care au capacitatea să finalizeze acest proces.

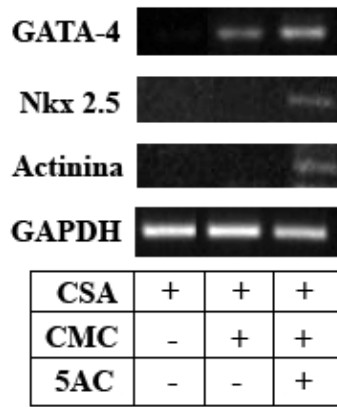


Figura 13: RT-PCR arătând inducerea expresiei genice a unor markeri cardiaci în cazul celulelor tratate cu 5-azacitidină după 1 săptămâna de la inițierea coculturii cu CMC fetale. Se observă că efectul cumulat al celor 2 condiții (tratamentul cu 5-azacitidină și contactul direct dintre celulele stromale și CMC) este superior contactului simplu dintre cele două tipuri celulare.

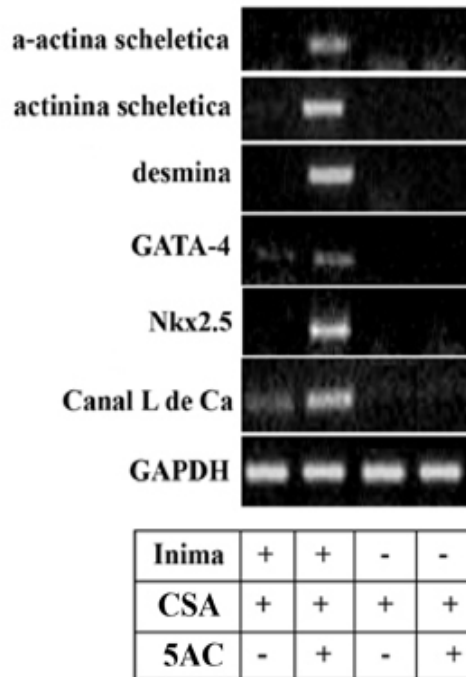


Figura 14: RT-PCR arătând inducerea expresiei genice a markerilor de celule musculare cardiace în prezența cumulării celor doi factori de inducere a diferențierii celulelor stromale medulare adulte în CMC: 5-azacitidina și factorii locali eliberați de miocardul ischemic.

IV. Evidențierea factorilor cu efect paracrin secretați de celulele stem mezenchimale în condiții normale și hipoxice

Ultimul capitol al tezei a fost realizat ca urmare a informațiilor recente apărute în literatura de specialitate privind rezultatele studiilor clinice. Acestea au arătat faptul că efectele benefice ale transplantului de celule stem în infarctul miocardic sunt tranziente, ceea ce sugerează un efect paracrin exercitat de celulele transplantate, prin intermediul secreției de factori cardioprotectori și angiogeni. În aceste condiții, ultima parte a tezei a cuprins studiul efectului anti-apoptotic al factorilor solubili eliberați de MSC asupra celulelor musculare cardiace și identificarea unor factori cu acțiune cardioprotectoare eliberați de MSC în condiții normale și hipoxice. O observație de o importanță deosebită făcută în urma acestor experimente a fost capacitatea MSC de a se adapta și de a rezista la condiții hipoxice, fapt demonstrat de rezistența acestor celule la apoptoza indusă de condițiile hipoxice (figura 15).

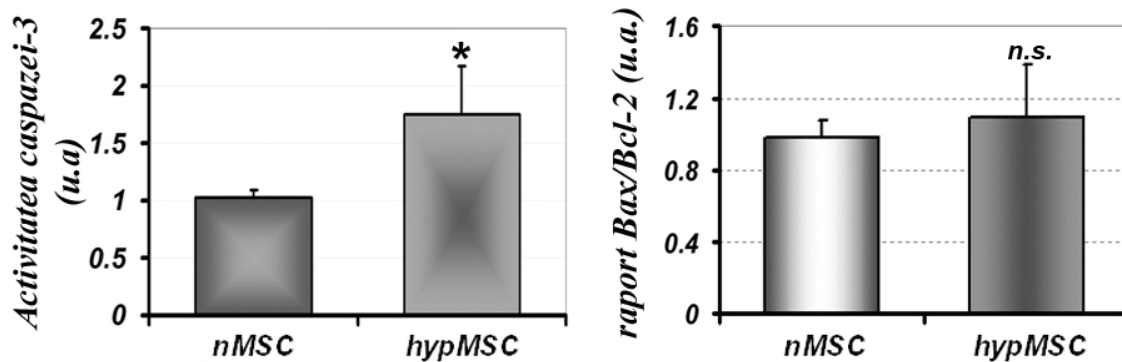


Figura 15: Rezistența MSC în condiții ischemice: graficul din stânga arată o ușoară creștere a activității caspazei-3, în timp ce raportul dintre expresia genică a proteinei pro-apoptotice Bax și proteinei anti-apoptotice Bcl-2, determinat prin PCR cantitativ, rămâne neschimbat (graficul din partea dreaptă).

Rezistența MSC la apoptoza indusă de hipoxie are o importanță deosebită pentru supraviețuirea acestora în miocardul infarctizat, în situația în care acesta este lipsit de o vascularizație corespunzătoare asigurării necesarului de oxigen.

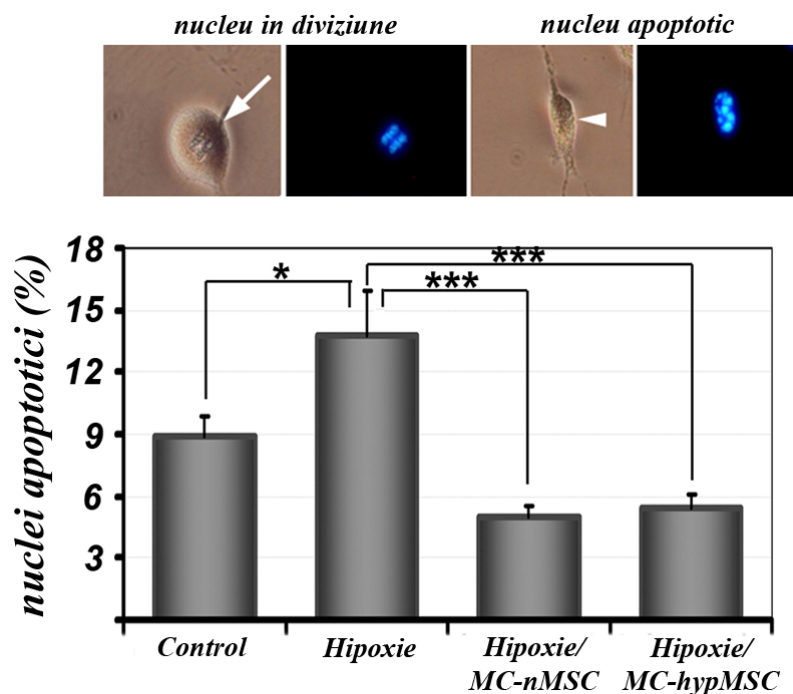


Figura 16: Determinarea cantitativă a apoptozei în miocitele cardiace după expunerea la hipoxie în prezența și absența mediului condiționat recoltat de la MSC. În graficul din partea de jos sunt prezentate procentele de nuclei apoptotici determinați prin colorație cu Hoechst. Pentru fiecare test au fost numărați cel puțin 1000 de nuclei (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$). În partea de sus sunt prezentate imagini cu nuclei în diviziune comparativ cu nuclei apoptotici.

Investigarea efectului mediului condiționat al MSC asupra apoptozei CMC indusă de hipoxie a arătat că MSC secretă factori cu acțiune cardioprotectoare. Incubarea CMC în mediu condiționat a prevenit inducerea apoptozei (figura 16). Rezultatele au demonstrat menținerea integrității membranei mitocondriale, fapt ce a contribuit la prevenirea inițierii procesului apoptotic. Mai mult decât atât, mediul condiționat recoltat de pe MSC hipoxice a avut efecte similare cu cel recoltat de pe celule cultivate în 20% O₂, ceea ce demonstrează faptul că MSC își păstrează proprietățile cardioprotectoare în condiții hipoxice. Acest rezultat sugerează posibilitatea ca MSC transplantate în miocard hipoxic să contribuie la supraviețuirea CMC afectate atât de hipoxie, cât și de stressul oxidativ din timpul reperfuziei.

Studiul compoziției mediului condiționat al MSC a arătat că aceste celule sunt capabile să își păstreze capacitatea de a sintetiza și a elibera în mediul extracelular unii factori cu efect cardioprotector, cum ar fi unele citokine sau microARN. Au fost identificate astfel o serie de citokine secretate de către MSC incubate în condiții normale, dintre care patru au fost regăsite în

mediul MSC incubate în hipoxie în cantități similare cu controlul: TIMP-1, MCP-1, IL1ra și SDF-1 α (figura 17).

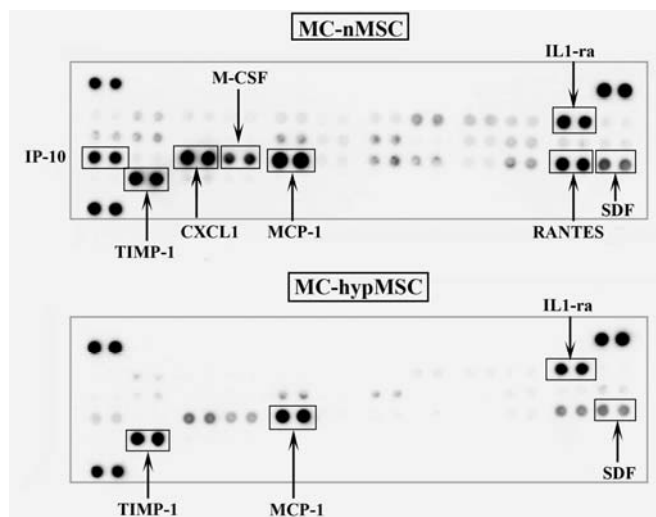


Figura 17: Identificarea citokinelor secretate în mediul condiționat de către MSC normoxice (partea de sus a imaginii) și hipoxice (partea de jos) prin tehnica “cytokine array”.

Conform datelor din literatură, acești factori ar putea fi responsabili, cel puțin în parte, de efectul cardioprotector exercitat de prezența MSC la nivelul miocardului ischemic, fie datorită acțiunii antiapoptotice, fie capacității de a induce procesul de angiogeneză, important pentru restabilirea aprovizionării țesutului cu oxigen și nutrienți. Pe lângă aceste molecule, se pare că transferul de informație genetică între MSC și celulele lezate este un mecanism important responsabil de efectul reparator al MSC. Astfel, în mediul extracelular al MSC hipoxice a fost observată o creștere a cantității de microARN 199a și 1225b, cunoscute pentru efectul anti-apoptotic (figurile 18 și 19).

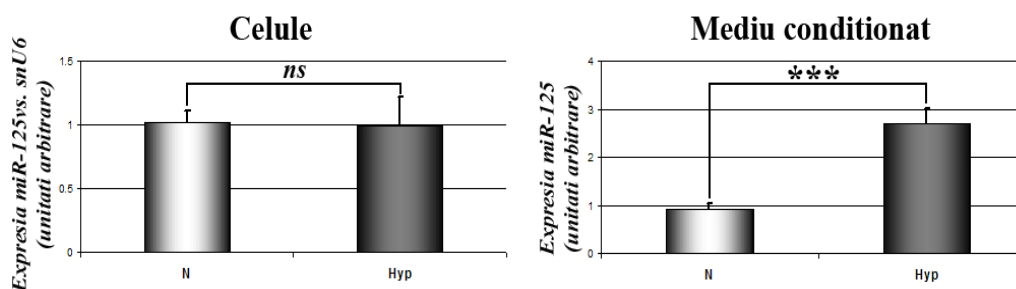


Figura 18: Cuantificarea prin PCR cantitativ a expresiei microRNA-125 în MSC incubate în condiții normoxice și hipoxice (graficul din stânga), precum și în mediul extracelular recoltat de pe celulele menținute în cele două condiții (***) $p < 0.0005$.

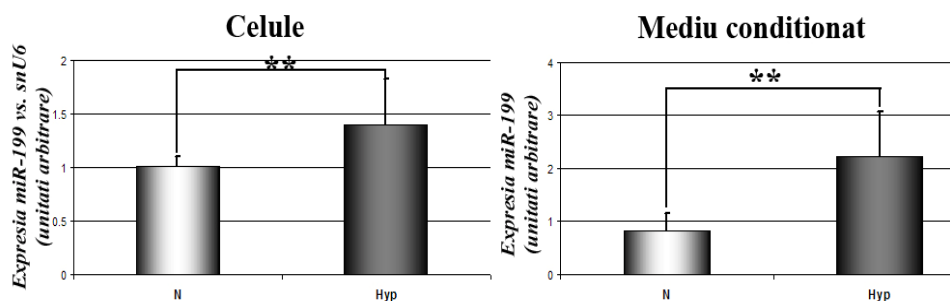


Figura 19: Cuantificarea prin PCR cantitativ a expresiei microRNA-199 în MSC incubate în condiții normoxice și hipoxice (graficul din stânga), precum și în mediul extracelular recoltat de pe celulele menținute în cele două condiții (** $p < 0.005$).

În concluzie, compoziția mediului extracelular al MSC consta într-un amestec de factori cu efect fie anti-apoptotic (TIMP-1, MCP-1, miR-199a, miR-125b), fie de inhibare a proliferării fibroblastilor (IL1ra) sau angiogenic (SDF-1 α). Prezența acestor factori cardioprotectori în secreția MSC ar putea fi responsabilă de efectul anti-apoptotic asupra CMC hipoxice observat în condițiile noastre experimentale.

Concluzii

Informațiile cuprinse în lucrarea de doctorat reprezintă rezultate, concretizate în articole publicate în reviste internaționale cu factor de impact ISI, prezentări orale sau sub formă de poster la manifestări științifice naționale și internaționale. Pe parcursul perioadei de doctorat, în urma experimentelor realizate, au fost obținute următoarele rezultate importante:

- S-a demonstrat că principalul factor inductor al apoptozei CMC în urma ischemiei miocardului este reprezentat de oxidanții exogeni aduși de reperfuzie;
- S-a pus la punct o metodă de obținere a unei populații de celule progenitoare obținute prin fracționarea aspiratului medular prin centrifugare pe gradient discontinuu de Percoll;
- S-au obținut culturi omogene de MSC, care au îndeplinit standardele de caracterizare indicate de Societatea Internațională de Transplant Celular;
- A fost arătat efectul acțiunii demetilante a 5-azacitidinei asupra caracterului pluripotent al MSC;
- A fost demonstrat efectul îmbunătățit al cumulării acțiunii 5-azacitidinei cu factorii eliberați de miocard pentru creșterea diferențierii MSC către un fenotip cardiac;

- A fost demonstrat efectul anti-apoptotic al factorilor eliberați de MSC normale și hipoxice asupra CMC;
- Au fost identificați factori cu acțiune anti-apoptotică, anti-fibrotică și pro-angiogenă în mediul extracelular al MSC normale și hipoxice, posibil responsabili de acțiunea cardioprotectoare a acestor celule.

Bibliografie

1. McMurray JJ. and Pfeffer MA. Heart failure. *Lancet* 2005; 365: 1877-89.
2. Kuraitis D, Ruel M, Suuronen EJ. Mesenchymal stem cells for cardiovascular regeneration. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2011;25(4):349-62.
3. Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Oct 4;46(7):1339-50.
4. Rose RA, Jiang H, Wang X, Helke S, Tsoporis JN, Gong N, Keating SC, Parker TG, Backx PH, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro. *Stem Cells.* 2008;26:2884–92.
5. Gnecci M, Zhang Z, Ni A and Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ. Res.* 2008; 103: 1204-19.
6. Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2011 May;26(5):1474-83.
7. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr. Opin. Hematol.* 2004;11(3):156-64.
8. Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation* 2005; 112: 214-23.