

UNIVERSITATEA “OVIDIUS” DIN CONSTANȚA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT MEDICINĂ

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Studiul unor procese celulare implicate în fiziopatologia Sindromului Down

Conducător de doctorat

Prof. Univ. Dr. ION ILEANA

Doctorand

DUMITRU (HONCEA) ADINA

CONSTANȚA, 2016

CUPRINS (TEZA IN EXTENSO)

Cuprins.....	3
Abrevieri.....	8
Definiții.....	11
Motivații.....	12
Obiective specifice.....	13
Partea I. Stadiul actual al cunoștințelor despre Sindromul Down, celulele stem din lichidul amniotic și imunofenotipare, proliferarea și diferențierea acestora.....	14
1. Date din literatură.....	15
1.1. Reproducerea umană.....	15
Bibliografie selectivă.....	16
1.2. Sindromul Down ca modificare genetică identificabilă prin testele de screening prenatal.....	17
1.2.1. Generalități.....	17
1.2.2. Incidența.....	17
1.2.3. Caracteristici somatice.....	17
1.2.4. Malformații asociate.....	18
1.2.5. Diagnostic.....	19
1.2.6. Evoluție și prognostic.....	20
Bibliografie selectivă.....	21
1.3. Teste de screening pentru monitorizarea sarcinii prin care se poate identifica sindromul Down.....	22

1.3.1. Generalități.....	22
1.3.2. Aspecte proteomice.....	23
1.3.3. Biomarkerii serici.....	24
1.3.3.1. Dublul test de sarcină (screening prenatal trimestrul I).....	25
1.3.3.2. Triplul test de sarcină (screening prenatal trimestrul II).....	25
1.3.3.3. Cvadruplul test de sarcină(screening prenatal trimestrul I).....	26
1.3.3.4. Cvadruplul test (screening trimestrul II).....	27
1.3.4. Calcularea probabilității existenței unei sarcini cu aneuploidie fetală.....	27
1.3.5. Teste genetice de screening.....	28
1.3.6. Teste ecografice de screening.....	29
Bibliografie selectivă.....	31
1.4. Lichidul amniotic - sursa de celule stem amniotice pentru aplicații regenerative în ameliorarea patologiei sindromului Down.....	34
1.4.1. Lichidul amniotic - descriere (rol, compoziție proteică și celulară).....	34
1.4.1.1. Formarea și circulația lichidului amniotic.....	34
1.4.1.2. Funcția nutritivă a lichidului amniotic.....	36
1.4.1.3. Factori de creștere regăsiți în lichidul amniotic.....	37
1.4.1.4. Rolul protectiv al lichidului amniotic.....	38
1.4.1.5. Lichidul amniotic ca instrument de diagnostic.....	40
1.4.1.6. Substanțele cu potențial dăunător din lichidul amniotic.....	41
1.4.1.7. Alte aspecte legate de lichidul amniotic.....	43

Bibliografie selectivă.....	44
-----------------------------	----

1.4.2. Celulele stem - definire, plasticitate, tipuri de celule stem cu sublinierea celulelor stem mezenchimale din diverse țesuturi, apoi a celor din măduvă și lichid amniotic luate în studiu	49
--	----

1.4.2.1. Definiția celulei stem.....	49
--------------------------------------	----

1.4.2.2. Clasificarea celulelor stem.....	50
---	----

1.4.2.3. Originea celulelor stem.....	51
---------------------------------------	----

1.4.2.4. Nișa celulelor stem.....	54
-----------------------------------	----

1.4.2.5. Plasticitatea celulelor stem.....	56
--	----

Bibliografie selectivă.....	58
-----------------------------	----

1.4.3. Celulele stem din lichidul amniotic (caracterizare, potențial în medicina regenerativă).....	60
---	----

1.4.3.1. Definiția.....	60
-------------------------	----

1.4.3.2. Istoric.....	60
-----------------------	----

1.4.3.3. Proprietăți.....	60
---------------------------	----

1.4.3.4. Celulele stem mezenchimale.....	62
--	----

1.4.3.5. Heterogenitatea subgrupurilor celulare din lichidul amniotic.....	63
--	----

1.4.3.6. Celule mezenchimale stromale din lichidul amniotic.....	69
--	----

1.4.3.7. Profilul expresiei genice a AFMSC.....	70
---	----

1.4.3.8. Analiza flowcitometrică a AFMSC.....	70
---	----

1.4.3.9. Celulele neurogene din lichidul amniotic.....	71
--	----

1.4.3.10. Posibile opțiuni de tratament cu celule AFS.....	71
--	----

1.4.3.11. Avantajele utilizării celulelor amniotice.....	72
1.4.3.12. Limitele folosirii celulelor AFS.....	73
Bibliografie selectivă.....	74
1.4.4. Diviziunea celulară.....	80
1.4.4.1. Ciclul celular.....	80
1.4.4.2. Proliferarea celulară și factorii de creștere.....	84
Bibliografie selectivă.....	85
Partea II. Contribuții proprii.....	86
2. Materiale și metode.....	87
2.1. Materiale.....	87
2.1.1. Reactivi chimici.....	87
2.1.2. Echipamentele de laborator.....	88
2.1.3. Liniile celulare și lotul de studiu.....	89
2.1.4. Materialele specifice folosite pentru culturile de celule.....	89
2.1.5. Materialele specifice folosite pentru imunofluorescență.....	90
2.1.6. Materialele specifice folosite pentru citometria în flux.....	90
2.1.7. Materialele specifice folosite pentru studiul diferențierii.....	90
2.1.8. Soluțiile, mediile și aditivii utilizați.....	90
2.1.9. Compoziția mediilor folosite.....	91
2.1.10. Mediile de înghețare folosite.....	91
2.2. Metode.....	93

2.2.1. Diagnosticul de genetică moleculară.....	93
2.2.2. Cultivarea celulelor din lichidul amniotic.....	93
2.2.3. Înghețarea celulelor.....	93
2.2.4. Imunofenotiparea celulelor din lichidul amniotic.....	94
2.2.5. Analiza diferențierii celulare.....	94
2.2.5.1. Colorarea cu roșu S de alizarină.....	94
2.2.5.2. Colorarea cu Oil Red O.....	95
2.2.5.3. Colorarea cu Alcian Blue.....	95
2.2.6. Analiza ciclului celular.....	95
2.2.7. Analiza citometrică de imagine.....	96
2.2.7. Marcarea cu CFSE pentru analiza proliferării celulare.....	96
Bibliografie selectivă.....	98
3. Rezultate și discuții.....	99
Bibliografie.....	132
4. Concluzii și perspective.....	133
5. Originalitatea tezei.....	134
Bibliografie alfabetică.....	135
Mulțumiri.....	151
Lista de lucrări din tema tezei.....	152

SCOPUL ACESTOR STUDII

Acest studiu își propune abordarea diagnosticului de Sindrom Down (*Down Sindrom-DS*) dintr-o nouă perspectivă, prin actualizarea și aprofundarea aplicațiilor în clinică, prin identificarea de noi elemente cu aplicabilitate în diagnostic, prognostic, optimizarea și personalizarea terapiilor.

Lichidul amniotic (*amniotic fluid- AF*) obținut prin amniocenteză ar putea servi drept sursă de celule stem pentru a regenera țesuturile la subiecții cu DS afectați de îmbătrânire accelerată și boli degenerative. Originea celulelor din AF este încă foarte mult discutată.

AF uman obținut în cursul procesului de amniocenteză s-a dovedit a conține o varietate de celule care provin din țesuturi embrionare și extraembrionare. Capacitatea proliferativă a majorității celulelor prezente este limitată deoarece sunt diferențiate, câteva studii au demonstrat prezența unui subset de celule cu proprietăți stem (*amniotic fluid stem cells - AFS*). Cu toate acestea, AFS diferă atât de celule pluripotente stem embrionare (*embryonic stem cells - ESC*), cât și de celulele stem adulte multipotente, și poate reprezenta o nouă clasă de celule stem ale căror proprietăți de plasticitate sunt între celulele stem embrionare și adulte. Spre deosebire de ESC obținute din masa celulară internă a blastocistului, celulele AFS nu formează tumori după transplant la șoareci. În ultimii ani, dovezile acumulate au demonstrat potențialul celulelor AFS de a se diferenția în mai multe linii. Ca o consecință, AF ar putea reprezenta o sursă sigură și ușor disponibilă de celule AFS care pot fi utilizate în scopuri terapeutice și care eludează orice obiecție etică, dat fiind că amniocenteza este o formă acceptată pe scara largă pentru testele de diagnostic prenatal. De remarcat că, o bancă de 100 000 de specimene de AF ar putea eventual deservi 99 la sută din populația Statelor Unite cu o potrivire perfectă pentru transplant.

Tipurile și proprietățile celulelor din AF pot varia cu vârsta gestațională. Pentru a putea utiliza această sursă de celule stem pentru a fi folosite în regenerarea țesuturilor este fundamental necesară evidențierea capacității lor proliferative și a abilității de diferențiere. Iar pentru a evalua posibilitatea de transfer autolog de celule AFS recoltate înainte de naștere, pentru tratamentul adulților cu DS cu boli degenerative, este necesară validarea capacității lor de regenerare.

Obiectivele mele specifice în timpul lucrărilor de cercetare au fost:

- 1) să determin cantitativ, imunofenotipic și morfologic modificările la care sunt supuse celulele AF derivate din DS în timpul creșterii intrauterine și de a măsura potențialul proliferativ al acestor celule, comparativ cu al celor de la sarcinile normale.
- 2) caracterizarea fenotipului celulelor AF în DS, pentru utilizarea potențială a acestor analize pentru a anticipa efectele asupra pacientului și pentru proiectarea viitoarelor abordări în ingineria tisulară pentru regenerarea organelor afectate ale pacienților bolnavi.

În scopul de a atinge aceste obiective, am folosit cultivarea *in vitro* și metode de biologie celulară orientate către caracterizarea celulelor AF.

INTRODUCERE

Sindromul Down ca modificare genetică identificabilă prin testele de screening prenatal

DS reprezintă afecțiunea genetică cea mai frecventă la specia umană și cea mai comună cauză de dizabilitate intelectuală și retard neuropsihic (Cuckle HS, 1987).

DS sau trisomia 21 este de asemenea cea mai frecventă și cea mai bine cunoscută boală cromozomială.

DS este cea mai frecventă afecțiune genetică având o frecvență de aproximativ 1/700 nou născuți. În lume trăiesc aproximativ 7 milioane de persoane diagnosticate cu acest sindrom dintre care aproximativ 4.000.000 de persoane sunt în SUA. Această rată, oricum subestimează adevărata incidență deoarece nu include și avorturile spontane și induse (Reddy UM, 2006).

Nou-născutul cu trisomie 21 are lungime și greutate mai mică decât parametrii vârstei gestaționale, prezintă hipotonie musculară, hiperextensibilitate și reflexe comportamentale (de exemplu, reflexul Moro) reduse.

Capul este brahicefalic, cu fontanele largi și occiput turtit. Fața este rotundă, plată și prezintă o dismorfie sugestivă: epicantus (un repliu în unghiul intern al ochiului), fantele palpebrale oblice în sus și în afară; nasul mic cu rădăcina turtită și narine mici și antevergate; gura deschisă și protruzie linguală (datorită cavității orale mici); urechile mai jos situate, mici și displazice. Gâtul, cu exces de piele pe ceafă este scurt; mâinile sunt scurte și late, cu brahidactilie, clinodactilie (încurbarea) a degetului V și frecvent, un singur pliu de flexie palmară (pliu simian); inconstant sunt prezente unele malformații viscerale (atrezie duodenală, defecte cardiace, imperforație anală) (Covic M, 2003).

Analiza citogenetică este esențială pentru diagnostic și obligatorie în fiecare caz, chiar dacă examenul clinic este evident, de asemenea în funcție de rezultatul analizei cromozomiale se acordă sfatul genetic și se calculează riscul de recurență.

Analiza cromozomială poate releva:

1. Trisomie 21 liberă și omogenă, în 92-95% din cazurile de DS;
2. Trisomie 21 liberă și în mozaic cromozomial (de tip 47/46), în 2-3% din cazuri;
3. Trisomie 21 prin translocatie Robertsoniană neechilibrată – între cromozomul 21 și un alt

cromozom acrocentric;

4. Trisomie 21 parțială, în 1% din cazuri (Covic M, 2003).

În primii ani de viață mulți dintre copiii cu DS au diverse probleme medicale. Cele mai importante fiind determinate de malformațiile viscerale, în special cele cardiace și digestive. Infecțiile respiratorii sunt frecvente (prin imunodeficiență nespecifică) iar riscul de leucemie este de 15-20 ori mai mare decât în populația generală. Morbiditatea este crescută: un procent de 10-15% din pacienții cu DS pot avea una din următoarele probleme medicale: hipotiroidie, tulburări vizuale (strabism, cataractă, glaucom,), instabilitate atlanto-axială, epilepsie, surditate. După 40 de ani se instalează frecvent demența senilă și mortalitatea crește semnificativ prin accidente vasculare. În țările dezvoltate, rata de supraviețuire la 50 de ani este de 85% iar la 60 de ani este de numai 44%, adică jumătate din aceea a populației generale (Covic M, 2003).

Lichidul amniotic – sursă de celule stem amniotice pentru aplicații regenerative în ameliorarea patologiei Sindromului Down

AF este o soluție dinamică și complexă, care îndeplinește la diferite vârste gestaționale, multiple funcții pentru fătul în curs de dezvoltare. În primul trimestru de sarcină, AF este format în principal din plasma maternă care trece prin membranele fetale. Există o difuzie liberă care apare bidirecțional între AF și pielea fetală, placenta și cordul ombilical. Odată cu maturizarea pielii fetale și a altor organe, se modifică compoziția AF. În al doilea trimestru, AF încă mai are niveluri similare de electroliți cu sângele fetal și matern, doar nivelurile de substanțe organice sunt semnificativ modificate (Tong XL, 2009). AF asigură protecție fizică fătului pentru insulte mecanice și termice, și are de asemenea și funcții imunitare, conține factori de creștere și citokine și acționează ca o sursă nutritivă (Underwood MA, 2005).

După momentul implantării, o cavitate extracelomică plină cu lichid, va deveni în cele din urmă spațiul amniotic, care va fi identificat, chiar înainte ca embrionul să fie recunoscut. În timpul embriogenezei, volumul lichidului amniotic crește mai rapid decât dimensiunile embrionare. Apa din AF provine din plasma maternă și trece prin membranele fetale pe baza forțelor osmotice și hidrostatice. Pentru ca placenta și vasele fetale să se dezvolte, apa și substanțele dizolvate din plasma maternă trec prin placenta la făt și apoi în AF.

AF conține carbohidrați, proteine și peptide, lipide, lactat, piruvat, electroliți, enzime și hormoni. Anterior producerii de keratină în pielea fetală, aminoacizii difuzează din placenta prin membranele placentare în AF și din circulația fetală prin pielea fetală în AF. Mai apoi, în timpul sarcinii difuzia prin membranele placentare persistă și este sporită prin excreția urinară fetală de aminoacizi (Jauniaux E, 1999).

Amniocenteza a fost un instrument valoros în evaluarea stării fetale încă din 1970. Cea mai comună utilizare a AF este pentru evaluarea cromozomilor fetali. Amniocenteza este de obicei indicată femeilor de peste 35 de ani sau la care există factori de risc pentru o anomalie cromozomială. Pentru diagnosticul aneuploidiilor în primul trimestru, evaluarea cu ultrasunete a translučenței nucale, markerii serici materni împreună cu utilizarea amniocentezei a scăzut corespunzător prelevarea de vilozități corionice.

AF uman a fost evaluat ca o sursă de celule stem cu rezultate încurajatoare inițial (Luton D, 2003). Posibilitatea unei surse necontrovertate de celule stem, poate stimula cercetarea în acest domeniu.

Celulele stem din lichidul amniotic (caracterizare, potențial în medicina regenerativă)

Celulele stem amniotice reprezintă amestecul de celule stem care pot fi obținute din AF (Fauza, D., 2004., Cananzi, Mara, 2009), precum și din membrana amniotică (Kim, M.K, 2014). Acestea se pot diferenția în diferite tipuri de țesut, inclusiv piele, cartilaj, țesut cardiac, nervi, fibre musculare, țesut osos (Antonucci, Ivana, 2009). Aceste celule pot avea aplicații medicale, în special în regenerarea organelor (Abdi, Reza, 2008).

A fost determinată prezența celulelor embrionare și fetale din toate straturile germinale în AF cât și a celulelor progenitoare hematopoietice au fost evidențiate în AF, începând cu a 12-a săptămână de sarcină. S-a sugerat că acestea proveneau din sacul vitelin (Fauza, D., 2004).

De asemenea un studiu a indicat faptul că celulele progenitoare non-hematopoietice au fost de asemenea, prezente în AF. Acest lucru a fost confirmat ulterior, celulele evidențiate fiind celule stem mezenchimale. În plus aceasta este o dovadă care arată că celulele stem embrionare sunt parte a fluidului, deși în cantități foarte mici (Fauza, D., 2004).

În același timp, s-a stabilit că celulele stem din membrana amniotică au de asemenea, un potențial multipotent. S-a observat diferențierea acestora în celule neuronale și gliale, precum și în precursori de hepatocite (Fauza, D., 2004).

Majoritatea celulelor stem prezente au caracteristici asemănătoare, ceea ce sugerează că ele pot avea o origine comună (Fauza, D., 2004).

De asemenea a fost confirmat faptul că AF conține un amestec eterogen de celule multipotente după ce a fost demonstrat că acestea au fost în măsură să se diferențieze în celule din toate cele trei straturi germinale și fără a forma teratoame. Această caracteristică le diferențiază de celulele stem embrionare, dar indică similitudini cu celule stem adulte (Jacot, J.G., 2013). Astfel, celulele stem fetale din AF sunt mai stabile și mai plastice decât omologele lor adulte ceea ce le face mai ușor de reprogramat în vederea obținerii statusului de pluripotență (De Coppi, P, 2014 și Moschidou, D, 2012).

O varietate de tehnici a fost dezvoltate pentru izolarea și cultivarea celulelor stem amniotice. Una dintre cele mai comune metode de izolare implică obținerea de AF prin amniocenteză. Celulele sunt apoi extrase din fluid pe baza prezenței c-Kit. Există o dezbatere dacă c-Kit este un marker adecvat pentru a distinge celulele stem amniotice de alte tipuri de celule, deoarece celulele lipsite de c-Kit prezintă, de asemenea, potențial de diferențiere. Condițiile de cultură pot fi, de asemenea, ajustate pentru a promova creșterea unui anumit tip de celule (Jacot, J.G., 2013).

Celulele stem mezenchimale (*mesenchymal stem cells* - MSC) sunt foarte abundente în AF și sunt descrise mai multe tehnici pentru izolarea lor. Acestea implică de obicei obținerea AF prin amniocenteză și diferențierea lor față de alte celule pe baza morfologiei sau prezența anumitor caracteristici (Fauza, D., 2004).

Testul cu antigen leucocitar uman a fost utilizat pentru a confirma că MSC provin de la făt și nu de la mamă. Inițial s-a presupus că MSC au fost eliminate din embrion la sfârșitul ciclului lor de viață, dar, deoarece celulele au ramas viabile în AF și au fost capabile de a prolifera în cultura această ipoteză a fost infirmată. Cu toate acestea, este încă neclar dacă celulele provin de la făt, placentă sau eventual masa de celule interioare ale blastocistului (Fauza, D. 2004).

Compararea MSC derivate din AF cu cele derivate din măduva osoasă au arătat că primele au un potențial de creștere mai mare în cultură. Fenotiparea MSC derivate din AF a evidențiat un fenotip similar cu MSC derivate din măduva osoasă și MSC provenite din țesut fetal din al doilea trimestru de dezvoltare fetală (Fauza, D., 2004). La animale, MSC par să aibă un profil imunologic unic, care a fost observat după izolarea lor atât în cultură cât și in vitro (Fauza, D., 2004).

Celulele stem asemănătoare celulelor embrionare, spre deosebire de celulele stem mezenchimale, nu sunt abundente în AF, ele constituie mai puțin de 1% din probele de amniocenteză. Celulele stem like-embriionare au fost inițial identificate utilizând markeri comuni cu celulele stem embrionare, cum ar fi Oct4, CD34, vimentin, fosfataza alcalină, factorul celulelor stem și c-Kit. Cu toate acestea, acești markeri nu au fost exprimați în mod necesar concomitent. În plus, toți acești markeri pot apărea singuri sau în alte combinații la alte tipuri de celule (Fauza, D., 2004).

Pluripotența acestor celule stem embrionare rămâne a fi stabilită pe deplin. Deși aceste celule care au exprimat markerii au fost capabile să se diferențieze în celule musculare, adipoase, osoase, nefrotice, neuronale și celulele endoteliale, acest lucru nu a avut loc în mod necesar dintr-o populație omogenă de celule nediferențiate. Dovezi în favoarea naturii lor de celule stem embrionare este capacitatea acestora de a produce clone (Fauza, D., 2004).

Celulele stem provenite din AF sau membrana amniotică reprezintă o sursă de celule stem multipotente care ar putea depăși limitele de creștere, de histocompatibilitate, tumorigeneză și problemele de etică asociate cu utilizarea de celule embrionare umane recoltate de la nivelul cordonul ombilical, sângele din cordonul ombilical, măduva osoasă și celulele pluripotente induse (De Sacco, S, 2010).

Studiile au dovedit ca celulele AFS pot fi folosite pentru a trata diverse afecțiuni. Un astfel de studiu a arătat utilitatea celulelor AFS în regenerare glandei mamare (Young BK, 2015). Alte studii au arătat că pot fi de ajutor în boli musculare și cardiace (Mauro, A., 2010 și Delo, D. M., 2011). În plus, celulele AFS s-au dovedit, de asemenea, că ar putea avea mai multe aplicații în terapia celulară și ingineria tisulară (Cananzi, Mara, 2009, De Sacco, 2010, Young BK, 2015 și Yang, X. X, 2009). Aceste opțiuni interesante de tratament pe bază de celule ar putea duce la căile de atac suplimentare împotriva bolilor umane (Vieira, N. M., 2010).

Studiile cu terapia transplant de celule stem embrionare umane sunt, de asemenea, împiedicate de posibile rejeturi imunologice și oncogenitate. După cum am menționat mai sus, celulele AFS nu sunt tumorigene după transplant la șoareci, spre deosebire de celulele stem embrionare obținute din masa celulară a blastocitului, (De Coppi, 2007).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Imunofenotiparea celulelor amniotice din Sindromul Down și a celulelor normale.

Pentru a obține informații cu privire la expresia imunofenotipică, am optimizat o metodă de cultivare și evaluarea din punct de vedere imunofenotipic, prin citometria în flux.

During flow cytometry analysis, two cell populations were constantly present in AF cells cultures, as identified on FSC/SSC dot (Figure 1A) and contour (Figure 1B) plots. The predominant population exhibited an increased FSC, indicative of large cell size (Figure 1A,B - P2 gate). Second population had variable propensity between samples and decreased FSC (Figure 1A,B – P1 gate), hence small cell volume. We have analyzed the immunophenotype of each of these two cell populations using markers for hematopoietic (CD14, CD34, CD45) and mesenchymal (CD13, CD29, CD90) lineages. Results showed that all samples were negative for hematopoietic markers and positive for CD13 and CD90 mesenchymal markers, regardless of their DS phenotype. CD29 is almost absent on all tested cell lines. CD90 had a variable expression between subjects; cells with high and low CD90 expression levels constituted two peaks with variable ratio (CD90 histograms in Figure 1 and 2). Noteworthy, both cell subpopulations displayed similar expression patterns irrespective of their FSC value (Figure 1 and 2 – C versus D).

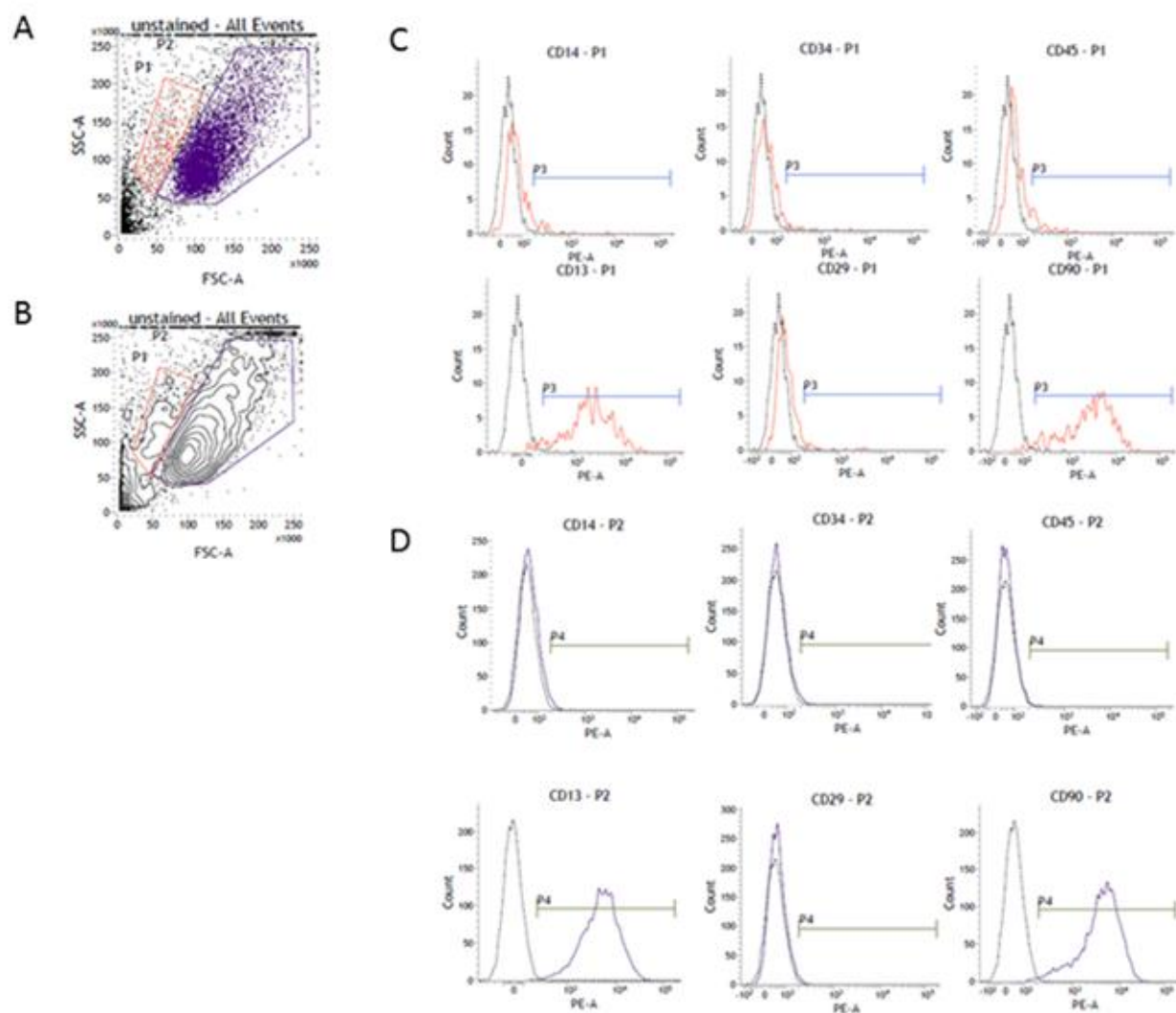


Figura 1: Imunofenotipul celulelor lichidului amniotic normal - linia 210.

A. FSC/SSC dot plot celular a arătat un FSC scăzut (P1, roșu) și un FSC crescut (P2, albastru). B. FSC/SSC contour plot celular a relevat limite între cele două populații celulare. C. Histograma a arătat expresia markerilor celulari hematopoietici și mesenchimali pentru celulele cu FSC scăzut. D. Histograma a arătat expresia markerilor hematopoietici și mezenchimali pentru celulele cu FSC crescut

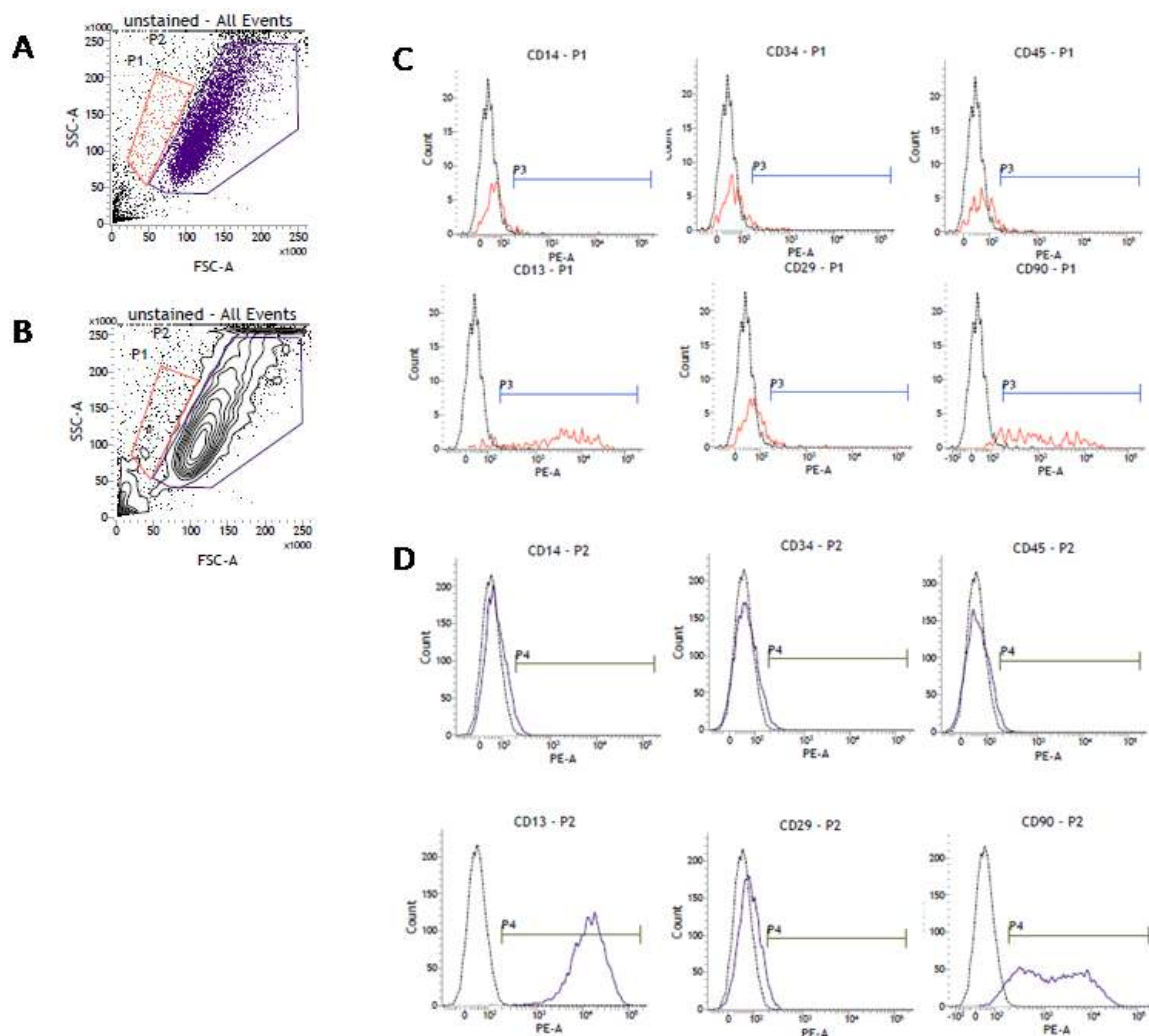


Figura 2: Imunofenotiparea celulelor lichidului amniotic din DS - linie DS.

A. FSC / SSC dot plot de celule a arătat un FSC scăzut (P1, roșu) și FSC mare (P2, albastru). B. FSC / SSC contur plot de celule prezintă limitele dintre cele două populații de celule. C. Histogramele arată expresia markerilor hematopoietici și mezenchimali ai celulelor cu FSC scăzut. D. Histogramele arată expresia markerilor hematopoietice și mezenchimale asupra celulelor cu FSC crescut.

Analiza citometrică de imagine a celulelor amniotice din Sindromul Down și a celulelor normale.

Pentru a obține informații cu privire la parametrii de imagine, am optimizat o metodă de cultivare, marcare și evaluare din punct de vedere citometric.

Am efectuat analiza imaginilor pe probe normale și linii de celule derivate de la sarcini cu sindrom Down. The entire sample area was reconstituted (Figure 3 A) and the cytoskeleton visualized together with the expression of Ki67, a nuclear marker expressed only by cycling cells, in both normal (Figure 3B).and DS cells (Figure 3C).

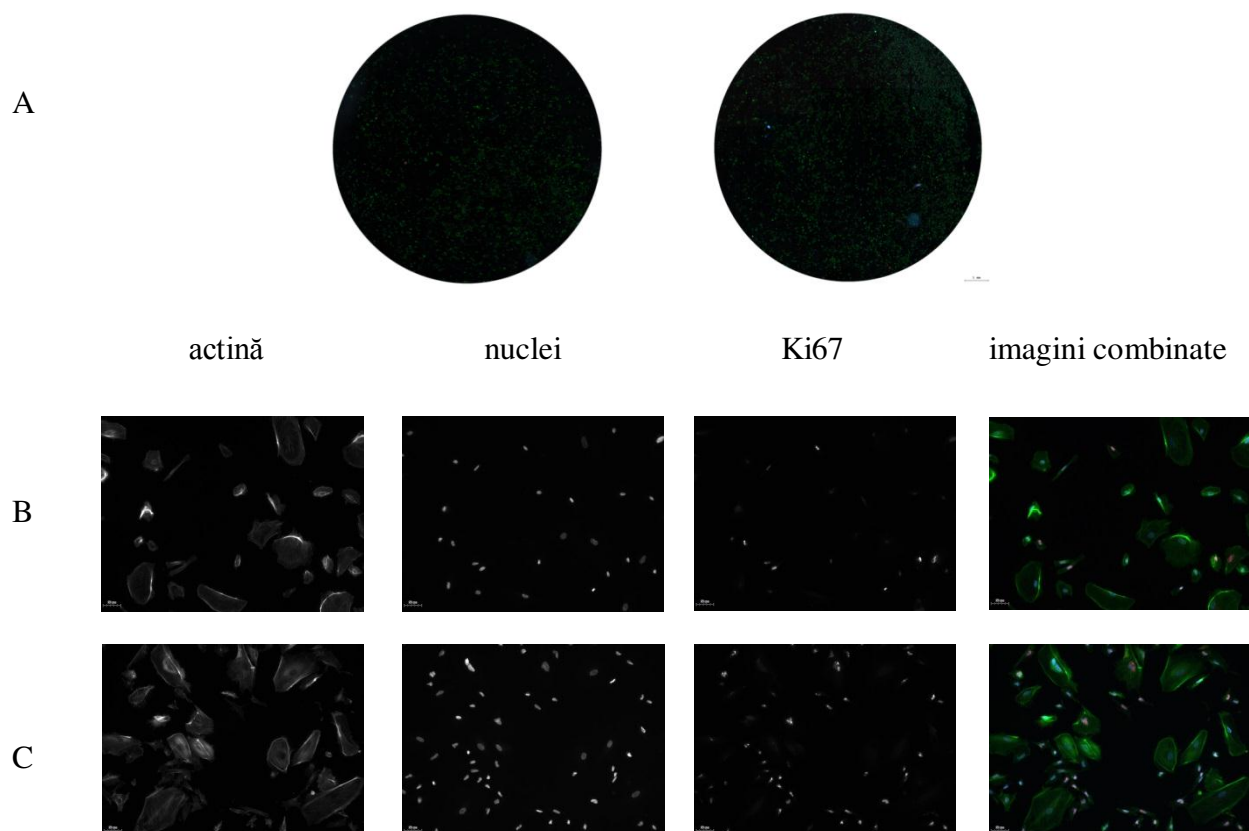


Figura 3: Analiza imaginilor de citometrie a celulelor lichidului amniotic normal și din SD. A. Imagini reprezentative de cover slips cu normal (PRA15-0210, stânga) și SD (dreapta). Vizualizarea în întregime a probei a fost obținută prin asamblarea tuturor câmpurilor generate de scanarea automată TissueFAXS iPlus. B. Câmp de vizualizare de la scanarea celulelor amniotice normale. C. Câmp de vizualizare de la scanare celulelor amniotice din DS. Filamente de actină au fost marcate cu Alexa Fluor faloidină 488 conjugat (verde), nuclei au fost colorați cu Hoechst

(albastru) și antigenul nuclear Ki67 a fost marcat cu anticorpi specifici urmate de anticorpi secundari conjugați cu Alexa Fluor 594 (roșu). Sunt descrise imaginile din fiecare canal și suprapunerile fuzionate.

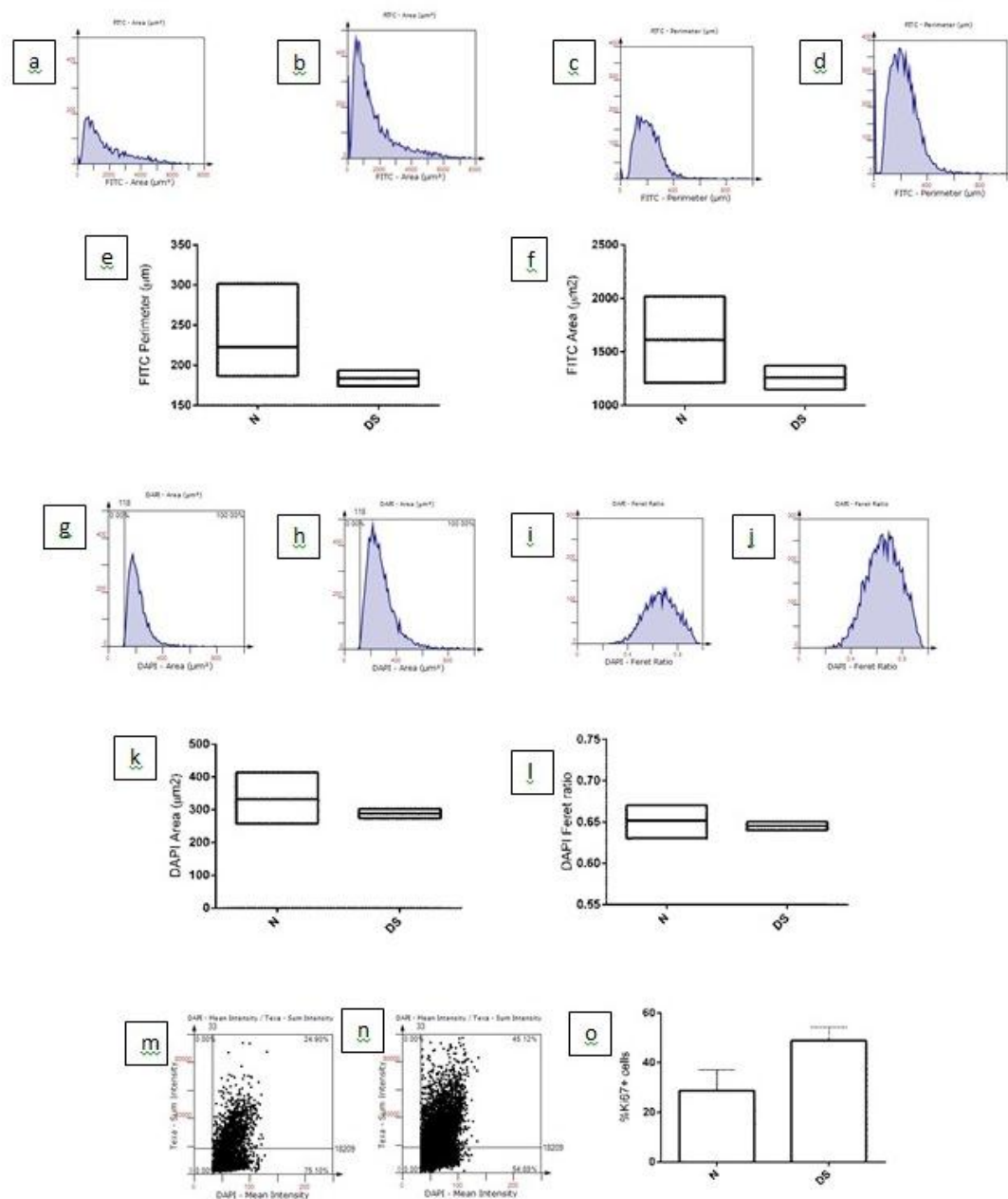


Figura 4 : Analiza cantitativă a parametrilor celulari și ai proliferării. Distribuția valorilor ariilor celulare în cazul reprezentanților normale (a) și pentru DS (b) sunt afișate în histograme. Valorile minime, maxime și medii ale ariilor celulare sunt ilustrate în graficul subiacent (e) pentru normal (n = 7) și DS (n = 5). Valorilor de distribuție a perimetrelor celulare a lichidului

amniotic normale (c) și din DS (d) sunt afișate în histograme. Valorile maxime, medii și minime ale perimetrelor celulare sunt ilustrate în graficul subiacent (f) pentru normal (n = 7) și DS (n = 5) linii. Distribuția valorilor de suprafață a nucleilor reprezentantelor normale (g) și DS (h) sunt prezentate în histograme. Valorile minime, maxime și medii ale nucleilor sunt ilustrate în graficul subiacent (k) pentru normal (n = 7) și pentru DS (n = 5). Distribuția raportul ferret al nucleilor în condiții normale (i) și în cazul DS (j) este afișat în histograme. Valorile minime, maxime și medii ale raportului ferret a nucleilor sunt ilustrate în graficul subiacent (l) pentru liniile normale(n = 7) și DS (n = 5). Scattergrama reprezintă afișarea procentului din celulele AF pozitive Ki67 în condiții normale (m) versus DS (n) Acestea sunt afișate împreună cu procentele medii și abaterile standard (o).

We observed the two characteristic epitheloid and fibroblastoid cell subpopulations and the apparent increase in the propensity of small sized cells in DS samples. To obtain quantitative data, we performed image analyses aimed at measuring cell and nuclei morphometric parameters. Hence, we measured cell areas and perimeters based on actin filaments fluorescent staining, and nuclei areas and ferret ratios (circularity) based on Hoechst staining. Results showed a decrease in cell and nuclei size with no significant modification of nuclear shape (Figura 4 - AI).

Analiza ciclului celular al celulelor amniotice din Sindromul Down și a celulelor normale

In order to assess the fraction of proliferating cells cytometric measurements were performed based on Ki67 nuclear staining. Quantitative analyses scattergrams (Figure 4 – m, n) shown a significant increase of %Ki67+ cells in DS subjects derived AF cells (48.92%, SD = 5.37, n=2) as compared to normal samples (28.68%, SD = 8.44, n=7). With a view to examine in more detail the potential cause of this increase in cell proliferation, we also performed a cell cycle analysis by flow cytometry following propidium iodide staining. Our data showed that in DS derived AF cells the proportion of cells in G0/G1 phases increased (from 61.34% to 84.89%), while the fraction of cells in S and G2/M decreased (from 20.89%+12.02% to 2.69%+1.80%), when compared with normal cells (Figure 5).

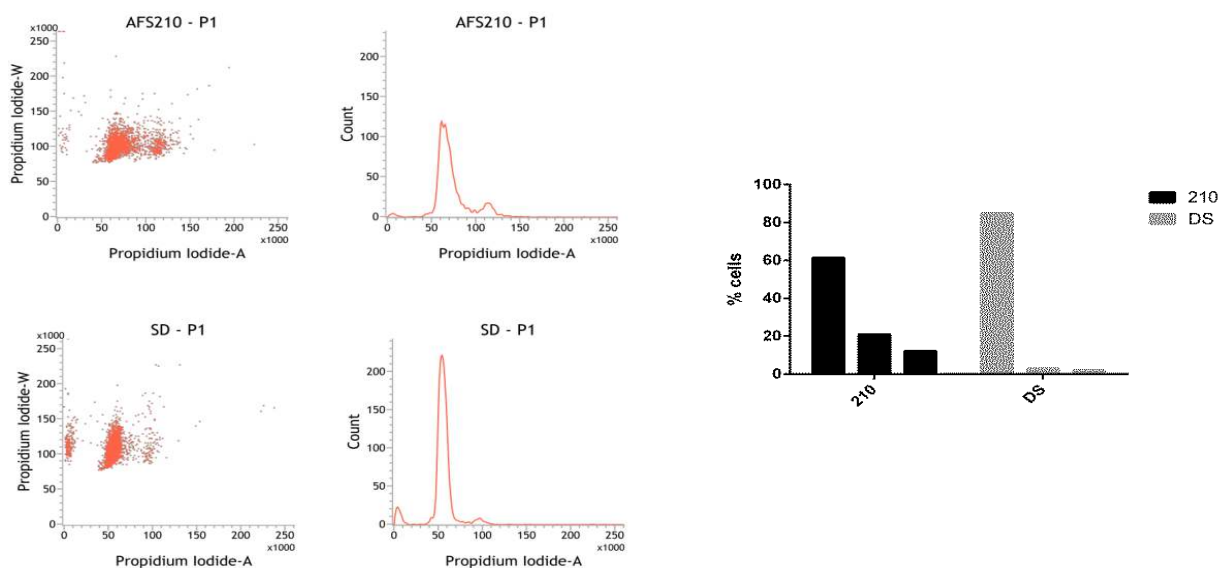


Figura 5: A. Reprezintă analiza citometrică a distribuției de celule ale lichidului amniotic în funcție de ciclul celular în cazul normal (diagrame superioare) și în cazul DS (diagrame inferioare). B. Grafic care ilustrează proporția celulelor în fiecare fază a ciclului celular.

În a doua parte a studiilor experimentale am inițiat culturi celulare din probe de lichid amniotic de la fetești cu parametrii fenotipici normali și am efectuat experimente de caracterizare a lor (AFS – amniotic fluid stem cells), în paralel cu celule stem mezenchimale izolate în Institutul de

Biochimie din măduva osoasă umană (BM-MSC – bone marrow-derived mesenchymal stem cells) (Figura 6).

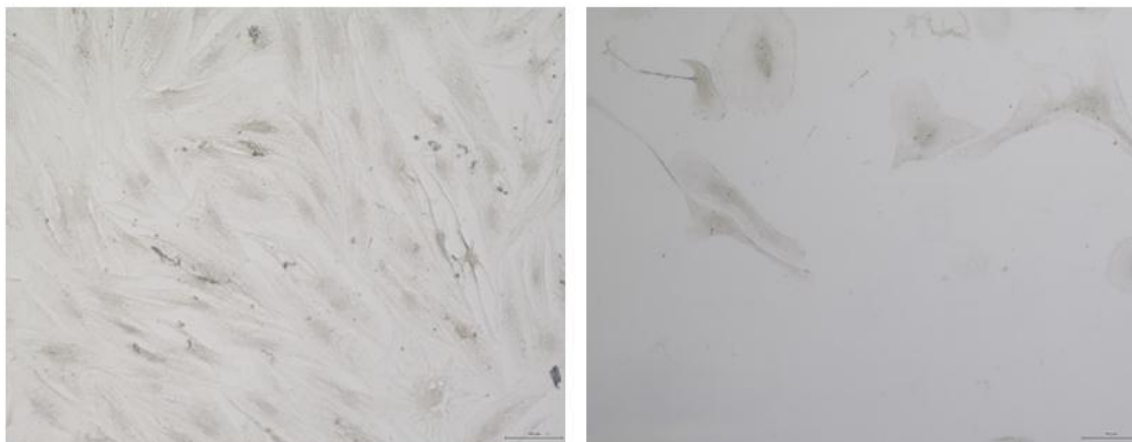


Figura 6: Morfologia celulelor din lichidul amniotic de la paciente cu fetoși normali – exemplu linia celulară O.D. (dreapta) comparativ cu celulele stem mezenchimale din măduva osoasă (stânga).

Analiza diferențierii celulelor amniotice din Sindromul Down și a celulelor normale

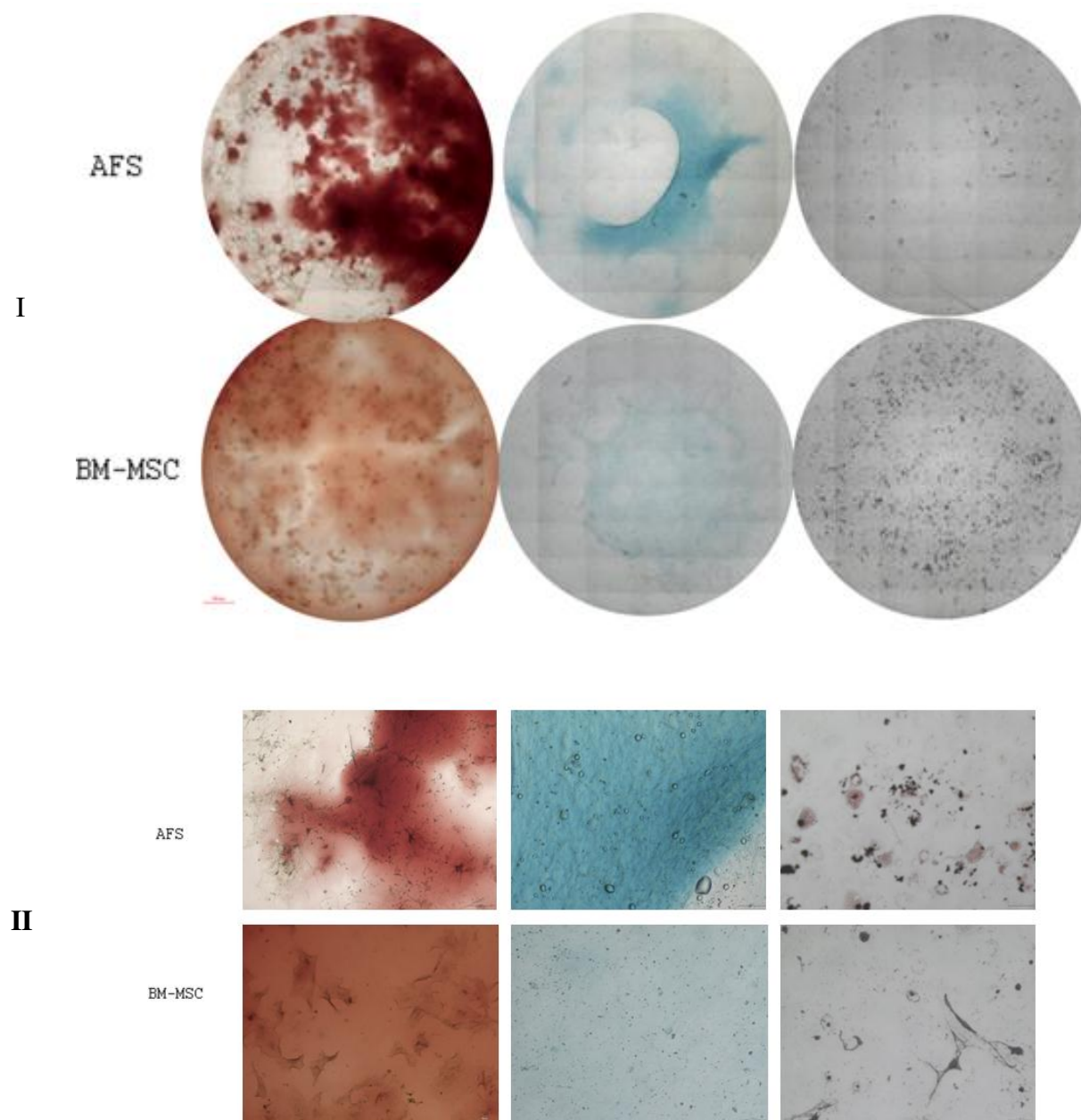


Figura 7: Diferențierea celulelor stem mezenchimale din lichid amniotic (AFS) și măduva osoasă (BM-MS) pe căile de osteogeneză (stanga), condrogeneză (mijloc) și adipogeneză (dreapta). În grupul de imagini I este redată imaginea reconstituită a întregului godeu iar în grupul II sunt prezentate imagini detaliate ale celulelor supuse diferențierii pe cele trei căi.

În urma analizei diferențierii celulare a celulelor mezenchimale din cele două surse biologice se observă că celulele amniotice se diferențiază la osteoblaste și condrocite, dar nu și la adipocite în condiții experimentale în care celulele din maduvă osoasă supuse inducției ating eficient cele trei fenotipuri differentiate (2).

În prezent avem în studiu linii celulare diferite de amniocite normale și din DS, care vor fi analizate în paralel cu celule stem mezenchimale de la diverși donatori pentru a caracteriza la nivel molecular procesul de diferențiere și potențiale diferențe, în cazul celulelor fetale modificate genetic.

Marcarea cu CFSE pentru analiza proliferării celulare

Pentru a studia potențialul de a modula proliferarea celulelor DS, am efectuat în ultima parte a studiului, experimente de marcarea cu CFSE și evaluare a diluției acestuia, în prezența unor celule normale aflate în co-cultură. Am ales celule amniotice normale și celule stem mezenchimale pentru a testa efectul acestora asupra proliferării celulelor DS.

Primul experiment a constat în optimizarea concentrației de CFSE astfel încât celulele marcate să poată fi urmărite atât prin microscopie, cât și prin citometrie în flux pe o perioadă de 24 de ore. Am testat două concentrații - 0,5 și 5 μM și am efectuat un experiment de microscopie pentru a evalua vizibilitatea celulelor imediat în ziua marcării (d0) sau la 24 de ore după marcarea (d1) (Figura 8). Rezultatele au arătat că, atât pe celule amniotice cât și pe celule mezenchimale concentrația optimă de marcarea este de 5 μM .

Folosind această concentrație am efectuat co-culturi de celule marcate cu CFSE și apoi diluate 1:1, 1:10 și 1:100 cu celule nemarcate din alte linii (AFS, MSC) sau din aceeași linie, drept control (Figurile 8). Ca măsură a capacității proliferative a celulelor s-a cuantificat valoarea mediană a CFSE pentru celulele care au suferit diviziuni pe parcursul celor 24 de ore (markerul P3 din histogramele prezentate în figura 9). Cu cât valoarea acesteia este mai mare, activitatea proliferativă este mai slabă iar valorile mici sunt indicatoare ale unei proliferări accelerate.

Analiza datelor a arătat că celulele DS 283 au o valoare mediană a fluorescenței CFSE de 836-1007, în timp ce AFS 213 au avut valori de 2348-3202. După cultivarea celulelor DS în prezența de celule normale AFS213, valorile mediane ale CFSE rămân relativ constante (982-1031). În schimb, la 24 de ore după cultivarea DS în prezența de MSC T, acestea își accelerează diviziunile, fapt indicat de mediana CFSE de 666-831 (Figura 9).

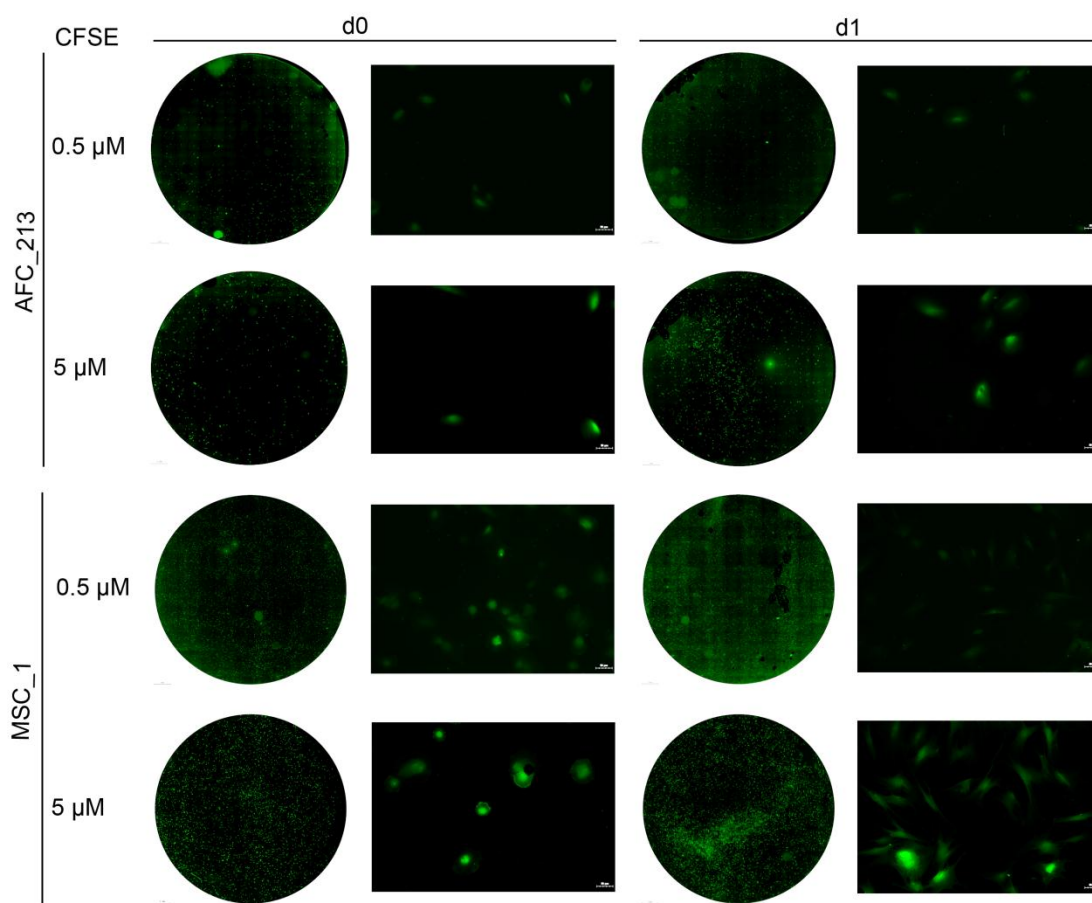
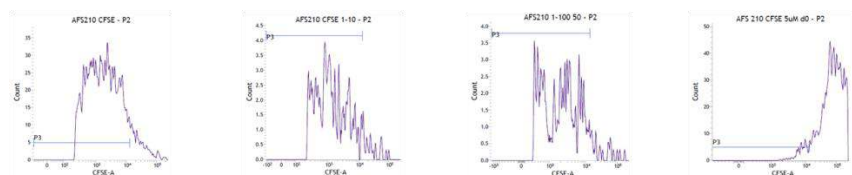
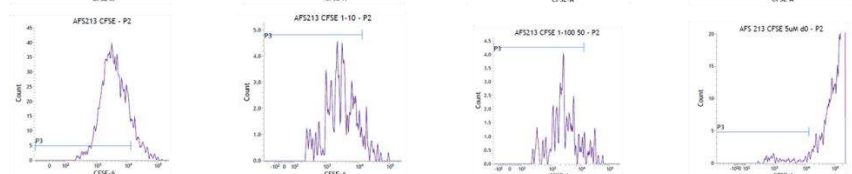


Figura 8: Analiza de imagine a probelor marcate cu CFSE în concentrație de 0.5 μ M și respectiv 5 μ M.

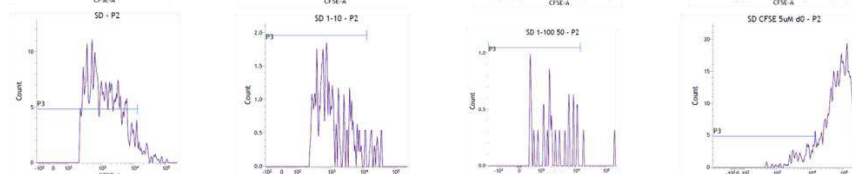
AFS210



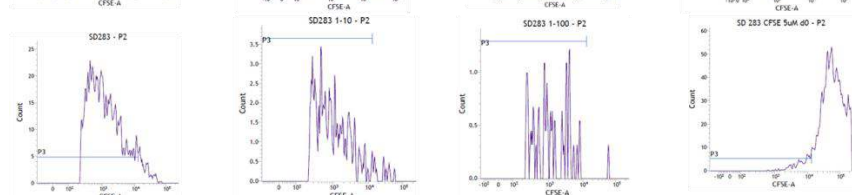
AFS213



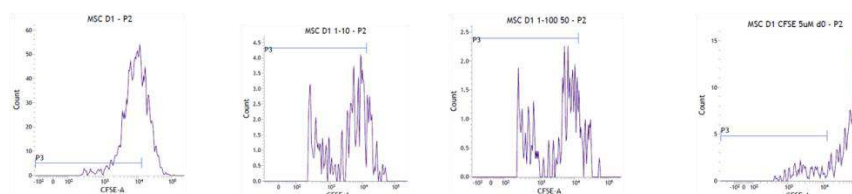
SD



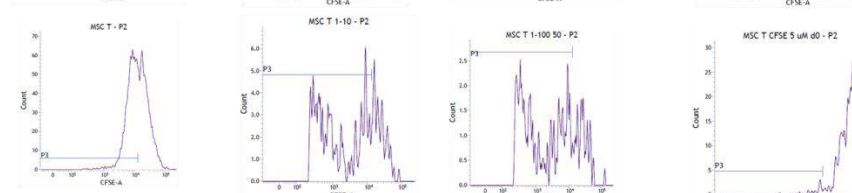
SD283



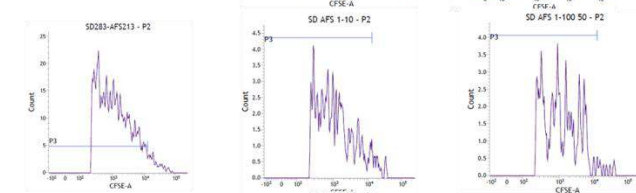
MSC-D1



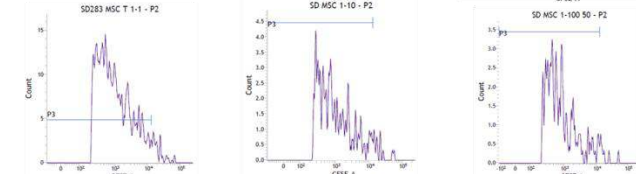
MSC-T



SD283-AFS213



SD283-MSCT



1:1

1:10

1:100

Figura 9 (continuare): Analiza de citometrie în flux a probelor de celule amniotice DS, în diluție 1:1, 1:10 și 1: 100 cu celule amniotice normale sau cu celule stem mezenchimale normale. Celulele au fost marcate cu CFSE 5 μ M înainte de a fi diluate cu celulele din co-culturi.

Aceste studii necesită însă continuare, pentru aprofundarea unor posibile mecanisme moleculare prin care se poate controla sau modula activitatea proliferativă a celulelor cu patologie DS pentru a reversa fenotipul lor și pentru ameliorarea consecințelor fiziologice ale modificărilor celulare specifice acestei patologii.

CONCLUZII (TEZA IN EXTENSO)

În timpul analizei citometrice în flux, două populații de celule au fost în mod constant prezente în culturile celulare din LA, identificate pe dot-plot-urile și contur-plot-urile, forward scatter (FSC)/ side scatter (SSC). Populația predominantă a prezentat FSC crescut, care este indicativ pentru dimensiuni celulare mari. A doua populație a avut tendința de variabilitate între probe și are FSC scăzut, prin urmare, volumul celulelor a fost mic.

Celulele SD intră în proporție mai mare în ciclul celular (indicat de procentul mare al celulelor Ki67+), însă rămân majoritatea în faza G1, fiind încetinită ieșirea din ciclul celular

Co-cultivarea celulelor SD cu MSC dar nu și cu AFS crește rata de diviziune a acestora. Sunt necesare cercetări ulterioare care să identifice factorii specifici MSC care semnalizează favorabil ieșirea din ciclul celular și consecințele asupra fenotipului celulelor SD.

Rezultatele au arătat că toate probele au fost negative pentru markeri hematopoietici și pozitive pentru markeri mezenchimali CD 13 și CD 90, indiferent de fenotip. CD 29 este aproape absent de pe toate liniile celulare testate. CD 90 a avut o expresie variabilă între subiecți.

Analiza citometrică a proliferării celulare arată că celulele amniotice suferă mai multe diviziuni celulare, fiind mai eficiente decât celulele stem mezenchimale din măduva osoasă în a prolifera.

În urma analizei diferențierii celulare a celulelor mezenchimale din cele două surse biologice (lichid amniotic și măduva osoasă) se observă că celulele amniotice se diferențiază la osteoblaste și condrocite, dar nu și la adipocite în condiții experimentale în care celulele din măduvă osoasă supuse inducției ating eficient cele trei fenotipuri diferențiate.

BIBLIOGRAFIE

Abdi, Reza; Fiorina, Paolo; Adra, Chaker N; Atkinson, Mark; Sayegh&Mohamed H (July 2008). "Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes". *Diabetes* 57 (7): 1759–1767.

Antonucci, Ivana; Iezzi, Irene; Morizio, Elisena; Mastrangelo, Filiberto; Pantalone, Andrea; Mattioli-Belmonte, Monica; Gigante, Antonio; Salini, Vincenzo; Calabrese, Giuseppe; Tete, Stefano; Palka, Giandomenico; Stuppia, Liborio; Morizio, E; Mastrangelo, F; Pantalone, A; Mattioli-Belmonte, M; Gigante, A; Salini, V; Calabrese, G; Tetè, S; Palka, G & Stuppia, L (16 February 2009). "Isolation of osteogenic progenitors from human amniotic fluid using a single step culture protocol". *BMC Biotechnology* 9: 9.

Cananzi, Mara; Atala, Anthony& De Coppi, Paolo (2009). "Stem cells derived from amniotic fluid: new potentials in regenerative medicine". *Reproductive biomedicine online* 18 (Suppl 1): 17–27.

Chiavegato, A.; Bollini, S.; Pozzobon, M.; Callegari, A.; Gasparotto, L.; Taiani, J.; Piccoli, M.; Lenzini, E.; Gerosa, G.; Vendramin, I.; Cozzi, E.; Angelini, A.; Iop, L.; Zanon, G.F.; Atala, A.; De Coppi, P.& Sartore, S. Human amni-otic fluid-derived stem cells are rejected after transplanta-tion in the myocardium of normal, ischemic, immuno-sup-pressed or immuno-deficient rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 42(4):746–759; 2007.

Covic M., Ștefănescu D.& Sandovici I. *Genetica umană*, 2011, cap.10.1. Roizen NJ, Patterson D. Down's syndrome. *Lancet* 2003;361:1281–912. Crick, F. Central dogma of molecular biology. *Nature* 227, 561-563 (1970).

Cuckle HS, Wald NJ & Thompson SG. Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level. *BJOG* 1987;94:387–402

De Coppi, P.& Morigi, M. (2014). "Cell Therapy for Kidney Injury: Different Options and Mechanisms – Mesenchymal and Amniotic Fluid Stem Cells". *Nephron Exp Nephrol* 126: 59–63.

De Coppi, P.; Bartsch, Jr., G.; Siddiqui, M. M.; Xu, T.; Santos, C. C.; Perin, L.; Mostoslavsky, G.; Serre, A. C.; Snyder, E. Y.; Yoo, J. J.; Furth, M. E.; Soker, S. & Atala, A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat. Biotechnol.* 25(1):100–106; 2007.

De Sacco, S.; Sedrakyan, S.; Boldrin, F.; Giuliani, S.; Parnigotto, P.; Habibian, R.; Warburton, D. & De Filippo, R. E. Human amniotic fluid as a potential new source of organ specific precursor cells for future regenerative medicine applications. *J. Urol.* 183(3):1193–2000; 2010.

Delo, D. M.; Guan, X.; Wang, Z.; Groban, L.; Callahan, M.; Smith, T.; Sane, D. C.; Payne, R. M.; Atala, A. & Soker, S. Calcification after myocardial infarction is independent of amniotic fluid stem cell injection. *Cardiovasc. Pathol.* 20(2):e69–e78; 2011.

Fauza, D. (2004). "Amniotic fluid and placenta stem cells". *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 18: 877–891. doi:10.1016/j.bpobgyn.2004.07.001

In't Anker, P. S.; Scherjon, S. A.; Kleijburg-van der Keur, C.; Noort, W. A.; Claas, F. H.; Willemze, R.; Fibbe W. E. & Kanhai, H. H. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102(4):1548–1549; 2003.

Jacot, J. G., Petsche Connell, J.; Camci-Unal, G. & Khademhosseini, A. (2013). "Amniotic Fluid-Derived Stem Cells for Cardiovascular Tissue Engineering Applications". *Tissue Engineering* 19: 368–379.

Jauniaux E, Gulbis B & Gerloo E. Free amino acids in human fetal liver and fluids at 12–17 weeks of gestation. *Hum Reprod* 1999; 14: 1638–1641.

Kim, M. K., Kim, E. Y. & Lee, K. B. (2014). "The potential of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane and amniotic fluid for neuronal regenerative therapy". *BMB Rep* 47: 135–140.

Luton D, Guibourdenche J, Vuillard E, Bruner J & de Lagausie P. Prenatal management of gastroschisis: the place of the amnioexchange procedure. *Clin Perinatol* 2003; 30: 551–557.

Mauro, A.; Turriani, M.; Ioannoni, A.; Russo, V.; Martelli, A.; Di Giacinto, O.; Nardinocchi, D. & Beradinelli, P. Isolation, characterization, and in vitro differentiation of ovine amniotic stem cells. *Vet. Res. Commun.* 34(Suppl. 1): S25–28; 2010.

Moschidou, D. & al. (2012). "Valproic acid confers functional pluripotency to human amniotic fluid stem cells in a transgene-free approach.". *Mol Ther* 20: 1953–1967.

O'Donoghue, K. & Fisk, N. M. Fetal stem cells. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* (6):853–875; 2004.

Reddy UM & Mennuti MT: Incorporating first-trimester Down syndrome studies into prenatal screening: executive summary of the National Institute of Child Health and Human Development workshop. *Obstet Gynecol* 2006, 107:167-173.

Tong XL, Wang L, Gao TB, Qin YG, Qi YQ & Xu YP. Potential function of amniotic fluid in fetal development—novel insights by comparing the composition of human amniotic fluid with umbilical cord and maternal serum at mid and late gestation. *J Chin Med Assoc* 2009;72:368–373.

Underwood MA, Gilbert WM & Sherman MP. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J Perinatol* 2005;5:341–348.

Vieira, N. M.; Brandalise, V.; Zucconi, E.; Secco, M.; Strauss, B. E. & Zatz, M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant.* 19(3):279–289; 2010.

Weiss, M. L. & Troyer, D. L. Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev.* 2(2):155–162; 2006.

Yang, X. X.; Xue, S. R.; Dong, W. L. & Kong, Y. Therapeutic effect of human amniotic epithelial cell transplantation into the lateral ventricle of hemiparkinson rats. *Chin. Med. J.* 122(20):2449–2454; 2009.

Young BK, Chan MK, Liu L & Basch RS.; *J Perinat Med.* 2015 Jun 26.

MULȚUMIRI

Realizarea acestei lucrări a fost posibilă numai datorită mai multor persoane, față de care doresc să îmi exprim recunoștința.

Am avut tot sprijinul, înțelegerea și îndrumarea științifică a coordonatorului meu, doamnei Prof.Dr Ion Ileana, care a avut încredere în mine și care m-a susținut în munca mea de cercetare în timpul pregătirii mele de doctorat. Adresez mulțumiri domnului Prof. Dr. Tica Vlad Iustin pentru colaborarea productivă pentru discuții fructuoase și sfaturi. Mulțumiri deasemenea pentru doamna Dr. Martinescu Alina pentru discuții și consiliere cu privire la sindromul Down. Datorz mulțumiri speciale doamnei Dr. Livia Sima, cercetător în Institutul de Biochimie al Academiei Române, pentru supraveghere, îndrumare și susținere, și pentru colaborarea în obținerea rezultatelor în laborator legate de izolarea și caracterizarea celulelor izolate din lichid amniotic prin citometrie în flux și microscopie de fluorescență și în interpretarea datelor obținute. Adresez mulțumiri pentru discuții, sfaturi tehnice utile și furnizarea materialului biologic, doamnei Pavel Anca Gabriela - Citogenomics și domnilor Savu Lorand și Rujan Iulian – Genetic Lab. De asemenea, recunosc sprijinul colaboratorilor din cercetare și din companii, care au contribuit la obținerea rezultatelor prezentate în teza de doctorat.

Nu în ultimul rând aș dori să mulțumesc familiei mele pentru suportul moral, încurajări și înțelegerea de-a lungul acestei perioade și a studiilor anterioare.

Această activitate a beneficiat de sprijinul financiar al Programului Operațional Sectorial- Dezvoltarea Resurselor Umane, în cadrul proiectului CERO - Profil de cariera: Cercetător român, Cod contract: POSDRU/159/1,5/S/135760 în perioada 19.08.2014-19.08.2015.

Lista de lucrări din tema tezei:

1. Amniotic Fluid Cells Proliferation in Normal and Down Syndrome Subjects. **Honcea Adina**, Iulian R., Pavel Anca Gabriela, Ion Ileana, Sima Livia Elena. ARS Medica Tomitana - 2016; 1(22): 10.1515/arasm-2016-0001
2. Stem cells from amniotic fluid, an essential tool for regenerative medicine – review. **Honcea Adina**. Fiziologia - Physiology • 2016.26.1(89).
3. Analiza citometrică a proliferării și diferențierii celulelor din lichidul amniotic - poster științific în cadrul Conferinței PedDEX, Iași 2015, **Honcea Adina**, Sima Livia Elena.