

REZUMATUL FAZEI 2014

Toate activitatile de cercetare din cadrul acestei faze au fost derulate in cadrul Centrului de Imunofiziologie si Biotehnologii al UMF Victor Babes Timisoara.

Materialul de lucru a fost reprezentat de maduva osoasa hematogena:

- de la pacienti cu anemii severe (lot control) – s-a recoltat maduva hematogena prin aspiratie sternala
- de la pacienti cu consolidare deficitara a unor fracturi diafizare a oaselor lungi (lot 1) – s-a recoltat maduva hematogena prin aspiratie din spina iliacă postero-superioară
- de la pacienti cu necroza aseptica de cap femural (lot 2) – s-a recoltat maduva hematogena prin frezarea canalului femural in timpul interventiilor chirurgicale pentru protezarea articulatiei coxo-femorale
- de la pacienti cu necroza avasculara de cap femural survenita in urma tratamentului imunosupresiv de durata al unei hemopatii maligne (lot 3) – s-a recoltat maduva hematogena prin aspiratie sternala

Recoltarea maduvei hematogene a fost efectuata de catre colegii de la Disciplinele de Hematologie respectiv Ortopedie a UMF Victor Babes Timisoara, in conditii de siguranta si asepsie si dupa obtinerea consimtamantului scris informat din partea pacientilor.

Pentru fiecare dintre aceste loturi de pacienti MSC au fost izolate in etapele anterioare ale proiectului si crioconservate in laborator in vederea experimentelor ulterioare.

Analizele comparative au urmarit:

- potentialul de diferentiere al MSC izolate de la pacientii din cele 3 loturi de studiu
- profilul fenotipic al MSC izolate de la pacientii din cele 3 loturi de studiu
- profilul secretor al MSC izolate de la pacientii din cele 3 loturi de studiu
- evaluarea in vitro a interactiunii MSC-biomateriale la loturile de studiu

Rezultatele obtinute indica:

- Desi diferentierea osteogenica este prezenta la toate loturile de studiu, aceasta nu atinge nivelul detectat in cazul lotului martor. Evidentierea mineralizarii matricei, imunolocalizarea collagen I si detectia biochimica a fosfatazei alcaline indica rezultate similare si anume o diminuare a potentialului osteogenic astfel: lot martor > lot 1 > lot 2 > lot 3
- Diferentierea condrogenica a putut fi evidentiata doar la MSC din lotul martor, in timp ce in cazul celulelor provenite de la loturile de studiu aceasta este cvasiabsenta.

- Rezultatele obtinute indica un potential crescut de diferentiere spre liniajul adipogenic, in cazul probelor provenite de la toate cele 4 loturi. In cazul probelor provenite de la lotul 3 se pare ca potentialul de diferentiere spre adipocite a celulelor este usor superior celui exprimat de celulele provenite de la lotul martor.
- Analiza flowcitometrică a relevat numeroase asemănări între MSC din lotul de control si MSC provenite de la pacientii din cele 3 loturi. Lotul de control exprimă toți markerii utilizați în general pentru caracterizarea celulelor stem mezenchimale, cum ar fi CD44, CD90, CD73, CD29, etc., fiind în principal negative pentru expresia CD34 și CD45. Cu toate că MSC sunt definite în principal prin lipsa expresiei HLA-DR, în acest studiu am constatat ca acest marker este prezent, cu un nivel scăzut de expresie, atât la lotul martor cat si mai ales la lotul 3. Acest aspect este sugestiv pentru un status activat al acestor celule.
- S-a observat că MSCs secretă în mediu o cantitate mare de TGF- β , VEGF și TNF- α , precum și cantități mici de IL-13, IL-4, IL-2, IL-10, IL-12, INF- γ .
- Am constatat la loturile 1 si 2 ca apare o secretie crescuta de TGF- β respectiv de VEGF, chiar mai mare comparativ cu lotul martor. În acest fel, MSC izolate de la loturile 1 si 2 ar putea furniza nu doar un suport structural pentru procesul de reparare tisulara, dar și nutrienți și oxigen, prin procesul de neoangieneză.
- MSC prezinta cea mai mare aderență pentru TNF- α , TGF- β , IL-4. In ceea ce priveste aderarea la ICAM si VCAM, cele mai aderente sunt MSC izolate de la pacientii din lotul 1, in timp ce MSC izolate de la pacientii din lotul 3 au o aderența redusa mai ales fata de ICAM. Rezultatele obtinute in urma experimentelor in flow-chamber indica unele diferente in afinitatea fata de substraturi in cadrul loturilor de studiu
- Capacitatea de migrare a MSCs din lotul 1, evaluată cu ajutorul xCELLigence și CIM-plate, pentru factori chemoattractanți în concentrații fiziologice - VCAM, ICAM și TGF- β 1, prezintă modificări semnificative comparativ cu celulele provenite de la loturile 2 si 3. Putem concluziona că MSCs lot 1 prezintă o capacitate de proliferare crescută comparativ cu celulele izolate de la celelalte loturi, având o rată de dublare a populațiilor celulare crescută, dar își pierde capacitatea de aderare în condiții de flux la substratul specific – VCAM, păstrându-și capacitatea migratorie la semnalele chemoattractante ale diversilor factori specifici (VCAM, ICAM, TGF- β 1).