

RAPORT FINAL DE ACTIVITATE - REZUMAT

Proiectul REBORNE este un proiect adresat terapiilor avansate în medicina regenerativă și are următoarele obiective generale:

- dezvoltarea de noi biomateriale cu rol în declanșarea formării osoase și înțelegerea mecanismelor biologice de osteogeneza.
- **standardizarea și optimizarea izolării și expandării celulelor stem mezenchimale (MSC), precum și a orientării acestora spre linia osteogenică, atât in vitro și in vivo, împreună cu biomateriale.**
- dovedirea eficienței asocierii de celule stem cu biomateriale pentru regenerarea țesutului osos în trialurile clinice, în scopul înlocuirii de grefe osoase și în beneficiul pacienților.
- demonstrarea faptului că sursele alogene de celule stem sunt sigure pentru regenerarea țesutului osos în boli ortopedice și în afecțiuni din zona maxilo-facială.
- consolidarea proprietății intelectuale și rețelei de colaborare în domeniul ingineriei țesutului osos pentru creșterea competitivității europene.
- furnizarea către societate de noi abordări terapeutice în domeniul de reparație a țesutului osos, însoțite de un punct de vedere economic realist.

În proiectul REBORNE, echipa din România, de la UMF Victor Babes Timisoara a fost implicată cu activități de cercetare-dezvoltare pentru trei trialuri clinice de ortopedie .

Toate activitățile de cercetare descrise au fost derulate în cadrul Centrului de Imunofiziologie și Biotehnologiei al UMF Victor Babes Timisoara.

Materialul de lucru a fost reprezentat de maduva osoasă hematogenă, recoltată astfel:

- de la pacienți cu anemii severe (lot control) – prin aspirație sternală
- de la pacienți cu consolidare deficitară a unor fracturi diafizare a oaselor lungi (lot 1) – prin aspirație din spina iliacă postero-superioară
- de la pacienți cu necroza aseptica de cap femural (lot 2) – prin frezarea canalului femural în timpul intervențiilor chirurgicale pentru protezarea articulației coxo-femorale
- de la pacienți cu necroza necroza avasculară de cap femural survenită în urma tratamentului imunosupresiv de durată al unei hemopatii maligne (lot 3) – prin aspirație sternală

Recoltarea mduvei hematogene a fost efectuată în condiții de siguranță și aseptice și după obținerea consimțământului scris informat din partea pacienților.

Etapa 1. Analiza in vitro a MSC recoltate de la pacienți cu consolidare deficitară a unor fracturi diafizare a oaselor lungi (lot 1): izolare, expandare, crioconservare.

- am studiat tehnici alternative de izolare a MSC în vederea obținerii unei populații cu indice de clonogenitate ridicat și proliferare intensă;
- am urmărit potențialul de diferențiere al MSC izolate și expandate;
- am încercat diverse condiții de cultură care să permită selectarea MSC cu înalt potențial osteogenic.

Rezultatele obținute indică:

- MSC izolate de la pacienții din lotul 1 au fost menținute în cultură până la pasajul 6.
- Celulele izolate s-au diferențiat pe cele trei linii mezodermice: A, O, C
- Celulele au prezentat markerii de suprafață caracteristici celulelor stem mezenchimale (CD73, CD90, CD105), și nu au prezentat markerii necaracteristici acestora (CD11b, CD34, CD45), conform criteriilor minimele pentru celulele stem mezenchimale.

Etapa 2. Analiza in vitro a MSC recoltate de la pacienți cu necroza aseptica de cap femural (lot 2): izolare, expandare, crioconservare, teste comparative cu MSC normale

- am urmarit caracterizarea morfologica si functionala a MSC prin tehnici de imunocitochimie și imunofluorescență si evaluarea profilului secretor prin metoda ELISA
- am evaluat comportamentul MSC in interactie cu substraturi de tip inflamator, in ideea de a decela un posibil rol imunoregulator al acestora
- a fost apreciata expresia chemokinelor si a receptorilor de chemokine ai MSC

Rezultatele obtinute indica:

- MSC izolate de la pacientii din lotul 2, prezintă un corp celular mai alungit, cu mai multe procese celulare mai lungi
- Populația de MSC CD90+ se divide în două subpopulații, ceea ce sugerează faptul că, in aceeasi proba de lucru, unele MSC sunt mai mature decât celelalte.
- MSC izolate de la pacientii din lotul 2 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 .
- Expresia intracitoplasmatică a chemokinelor si a receptorilor de chemokine, este heterogenă și dependentă de donor. Constant a fost evidențiată expresia CCR3, CCR4, și CXCR3, CCL2 și CXCL12.
- MSCs izolate de la lotul cu necroza aseptica de cap femural prezintă cea mai mare aderență pentru VEGF, IL-4, ICAM și TNF α .

Etapa 3. Analiza in vitro a MSC recoltate de la pacienti cu necroza necroza avasculara de cap femural survenita in urma tratamentului unei hemopatii maligne (lot 3): izolare, expandare, crioconservare, teste de transport

- am realizat caracterizarea morfofunctionala a MSC: aspect microscopic, prezenta vimentinei, analiza viabilitatii celulare, potential de diferentiere, profil secretor
- in colaborare cu partenerii externi u fost validate protocoalele de transport si de crioconservare.

Rezultatele obtinute indica:

- MSC izolate de la pacientii din lotul 3 prezintă morfologie mixta, o parte dintre celule au aspect fibroblast-like iar altele prezinta o morfologie poligonala. Celulele sunt pozitive pentru vimentina si prezinta toti markerii membranari caracteristici MSC
- Analiza viabilitatii celulare indica un evident declin al acestui parametru odata cu numarul de pasaje, declin din ce in ce mai accelerat incepand cu pasajul al treilea, ceea ce sugerează „imbatrinirea” celulelor din mediul de cultura.
- Potentialul de diferentiere al MSC izolate de la pacientii din lotul 3 este redus. Diferentierea condrocitara este cvasiabsenta, iar diferentierea osteogenica indica o mult mai slaba expresie a markerilor caracteristici in comparatie cu MSC de la lotul martor. Linia de diferentiere preferata este cea adipocitara, aceasta survenind chiar in lipsa adaosului mediului specific de diferentiere.
- MSC provenite de la lotul 3 secretă în mediu o cantitate mare de TNF- α si INF γ dar cantități foarte mici de VEGF, sugerand lipsa de suport al procesului de angiogeneza.
- Optimizarea protocoalelor de transport recomanda folosirea unui mediu de cultura tip alpha-MEM suplimentat cu 4% albumina bovina serica.

Etapa 4. Studiu comparativ al functionalitatii in vitro a MSC normale si MSC izolate de la pacientii din cele 3 loturi de studiu

Pentru fiecare dintre aceste loturi de pacienti, MSC au fost izolate in etapele anterioare ale proiectului si crioconservate in laborator. Pentru dezghetare s-a folosit protocolul validat in colaborare cu partenerii externi din proiectul FP7 REBORNE.

- am comparat potentialul de diferentiere spre cele trei linii caracteristice A, O, C, profilul fenotipic si profilul secretor

- am evaluat potentialul de interaciune a MSC cu biomateriale prin testarea aderenței MSC în sistemul flowchamber și a capacității de migrare a MSC către diferite substraturi chemoattractante cu ajutorul xCELLigence și CIM-plate.

Rezultatele obținute indică:

- Diferențierea osteogenică este prezentă la toate loturile de studiu, în timp ce diferențierea condrogenică este cvasiabsentă.
- Cu toate că MSC sunt definite în principal prin lipsa expresiei HLA-DR, acest marker este prezent la lotul martor și lotul 3, aspect sugestiv pentru un status activat al acestor celule.
- MSC izolate de la loturile 1 și 2 au secreție crescută de TGF- β și VEGF sugerând că ar putea favoriza procesul de neoangiogeneză.
- MSC izolate de la lotul 1 prezintă o capacitate de proliferare crescută, își pierd capacitatea de la VCAM, păstrându-și capacitatea migratorie la semnalele chemoattractante ale diverșilor factori specifici (VCAM, ICAM, TGF- β 1).

CONCLUZII GENERALE

- În laboratorul nostru am realizat izolarea și expandarea MSC izolate de la bonavii incluși în cele 3 loturi de studiu. Protocoalele de lucru au fost cele utilizate în cadrul proiectului FP7 REBORNE
- A fost optimizat protocolul de îngheț-dezghet a materialului biologic; analiza viabilității celulare după dezghet arată un procent mare de celule viabile ceea ce confirmă eficiența metodelor de lucru utilizate
- Pentru MSC izolate de la fiecare dintre loturile de studiu s-a realizat o caracterizare exhaustivă și o verificare a funcționalității acestora, atât imediat după izolare și expandare cât și după crioconservare; în general, nu am observat alterarea funcțiilor celulare în urma crioconservării.
- Studiile efectuate au contribuit, împreună cu alți parteneri din proiectul FP7 la realizarea unui „ID card” REBORNE care să cuprindă markerii fenotipici caracteristici MSC
- Evaluarea aderenței MSC la diferite substraturi în flowchamber precum și studiile de migrare a MSC au permis completarea caracterizării funcționale a acestora
- În colaborare cu partenerii externi au fost efectuate teste de transport a materialului biologic având în vedere cerințele trialurilor clinice, de prelucrare a materialului biologic în condiții GMP (Good Manufacturing Practice, „camera albă”, „camera curată”) și ținând cont de faptul că facilitățile de acest tip din Timișoara, în curs de construcție, nu este finalizată.
- Parteneriatul a permis instruirea echipei din România inclusiv în proceduri de tip GMP. În colaborare cu partenerii din Spania au fost revizuite procedurile standard de izolare și expandare a MSC în vederea utilizării lor în trialul clinic, a fost discutat panelul minim de controale necesare