



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“IULIU HAIIEGANU”
CLUJ-NAPOCA

**CERCETĂRI EXPERIMENTALE PRIVIND
COMPORTAMENTUL *IN VITRO* ȘI *IN VIVO* AL
CELULELOR STEM ÎN REPRODUCEREA UMANĂ**

***REZUMATUL
TEZEI DE DOCTORAT***

PENTRU OBTINEREA TITLULUI ȘTIINȚIFIC DE DOCTOR
ÎN ȘTIINȚE MEDICALE, DOMENIUL MEDICINĂ

Drd. Groza Daria Maria

Coord. științific: Prof.Dr. Nicolae Costin

2009

Cuvinte cheie: celule stem, sânge placentar, bănci de celule stem, diferențiere celulară, chimerism, transplant in utero

Cercetarea în domeniul celulelor stem a stârnit interesul cercetătorilor din întreaga lume datorită caracteristicilor unice ale celulelor șușă și, mai ales, datorită potențialului pe care acestea îl au de a revoluționa abordarea terapeutică a pacientului. Progresele recente obținute la nivel mondial au deschis noi perspective prin utilizarea celulelor stem în terapia transplantățională și terapia celulară.

Anexele fetale și sângele placentar reprezintă surse bogate de celule stem hematopoietice și mezenchimale, surse cu acces minim invaziv și ferite de obiecțiile etice care se aplică celulelor stem embrionare și fetale provenite din avorturi.

Scopul prezentei teze de doctorat este reprezentat de aplicarea în practică a cunoștințelor actuale privind celulele stem din anexele fetale și sângele cordonului ombilical precum și de cercetarea experimentală a izolării, diferențierii și transplantării in utero a celulelor stem umane obținute pe model animal, utilizând biotehnologii de ultimă oră. Evaluarea grefării populației de celule stem umane în organismele chimerice obținute a constituit elementul determinant în valorificarea cercetărilor prezentei lucrări de doctorat.

Data fiind importanța și complexitatea acestui domeniu, cercetările efectuate s-au orientat spre câteva direcții prioritare:

1. evaluarea și compararea metodelor actuale de recoltare a sângelui placentar din cordonul ombilical;
2. identificarea factorilor obstetricali ce influențează calitatea probelor de sânge recoltate. Pentru identificarea acestora, s-a urmărit analiza statistică retrospectivă a recoltărilor de sânge placentar efectuate în cadrul Clinicii de Obstetrică și Ginecologie „Dominic Stanca” din Cluj Napoca, pe o perioadă de 6 luni.
3. izolarea și cultivarea celulelor stem din anexele fetale și sângele placentar cu evaluarea unor medii și soluții pentru cultivarea *in vitro*, evaluare dublată de creșterea ratei de viabilitate prin utilizarea unor formule și medii de cultivare îmbunătățite, originale;
4. identificarea capacității de multiliniaritate a celulelor stem mezenchimale umane izolate cu obținerea în premieră la noi în țară de țesut neuronal derivat din celule stem mezenchimale izolate din placentă;
5. studiul comportamentului *in vivo* al celulelor stem din anexele fetale și sângele placentar prin transplantare *in utero* pe modele experimentale animale, cu obținerea pentru prima dată în România a organismelor chimerice murin-uman și ovin-uman.
6. punerea în evidență a grefării celulelor stem umane transplantate și determinarea ratei de grefare în organismele chimerice obținute.

MATERIAL ȘI METODĂ

Cercetările au fost efectuate în perioada 2008 – 2009, în patru locații diferite:

- Clinica de Obstetrică și Ginecologie II “DOMINIC STANCA” din cadrul Spitalului de Urgență “Prof.Dr.O.Fodor” Cluj-Napoca;
- Departamentul de Reproducție Obstetrică și Ginecologie Veterinară din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Cluj-Napoca;
- Institutul Oncologic “I.Chiricuță” Cluj-Napoca și
- laboratoarele Cord Blood Center RO SRL Cluj-Napoca, Part of Cord Blood Center Group.

O parte din cercetările pe această temă au fost efectuate în Statele Unite ale Americii, ca urmare a obținerii de către doctorand a unei burse de studii universitare și postuniversitare, în conformitate cu prevederile Hotărârii Guvernului nr.697/16.08.1996, modificată prin H.G.nr. 533/1998. Stagiul de cercetare s-a desfășurat la Universitatea din Reno, Nevada, în perioada 2006 – 2007, în cadrul Departamentului de Biotehnologii Animale condus de către Prof. Dr. Esmail D. Zanjani, precum și la ferma didactică experimentală aparținând aceleiași instituții.

În cadrul acestui studiu s-au efectuat 90 de recoltări de sânge placentar de la parturiente internate la Clinica de Obstetrică și Ginecologie “DOMINIC STANCA” Cluj Napoca. S-a obținut consimțământul informat al pacientelor donatoare înainte de declanșarea travaliului și s-a completat fișe individuale.

Criteriile de excludere din studiu a parturientelor internate au fost:

- screening-ul matern pozitiv pentru boli infecțioase (hepatită B, C, serologie pozitivă HIV, sifilis);
- sarcinile gemelare și nașterile premature;
- urgențele obstetricale;
- febra în travaliu;
- lipsa integrității placentare după delivrență.

Pentru izolarea și cultivarea celulelor stem din anexele fetale și sângele placentar cu evaluarea unor medii și soluții pentru cultivarea *in vitro*, sursa de recoltare a materialului necesar a fost reprezentată de sângele cordonului ombilical prelevat în condiții de maximă sterilitate de la nașteri la termen pe cale naturală sau prin cezariană. Atât materialele cât și reactivii necesari pentru colectarea și manipularea corespunzătoare a probelor biologice, cât și procedurile folosite pentru cultivarea optimă a celulelor s-au ales în așa fel încât să păstreze integritatea și funcția celulelor izolate. De asemenea s-au efectuat controale microbiologice pentru a exclude probele contaminate.

Materialul biologic utilizat pentru identificarea capacității de multiliniaritate a celulelor stem mezenchimale umane izolate a fost reprezentat de linia celulară stem mezenchimală provenită din placenta umană la termen, caracterizată imunofenotipic.

Mediile de diferențiere utilizate au fost: mediul PromoCell Osteoblast Growth Medium (**PromoCell GmbH**) suplimentat cu ser fetal bovin (Gibco) 0,1ml/ml, pentru inducție osteogenică și mediul de diferențiere 2 compus din DMEM/F12 (Gibco), suplimentat cu ser fetal bovin, acid ascorbic, β glicerolfosfat, dexametazonă, insulină tot pentru diferențiere pe linie osteogenică.

Pentru diferențiere pe linie neuronală s-au utilizat două tipuri de substraturi, iar mediul de diferențiere utilizat a fost mediul Neurobasal (Gibco) suplimentat cu glutamină și acid retinoic.

În vederea studierii comportamentului *in vivo* al celulelor stem din anexele fetale și sângele placentar prin transplantare *in utero* pe modele experimentale animale, s-au utilizat 10 șoricioaice din linia CD1 și 10 exemplare ovine din rasa merinos de Transilvania, tipul M.

Șoricioaicele din linia CD1 (linie înbred) luate în studiu au provenit din biobaza Facultății de Medicină Veterinară. Femelele selectate pentru transplant (n=10) cu vârste cuprinse între 8-10 săptămâni, au fost supuse montei naturale, iar după 24 de ore au fost examinate au fost în vederea constatării prezenței dopului vaginal care certifică monta. Transplantul *in utero* s-a realizat după 13,5 zile de la apariția dopului vaginal.

Oile luate în studiu au fost cazate în biobaza Facultății de Medicină Veterinară din Cluj-Napoca, în boxe separate, cu microclimat corespunzător speciei. La luarea în studiu, pentru fiecare exemplar s-a întocmit o fișă ginecologică, s-au recoltat probe biologice pentru analize de rutină și realizarea profilului metabolic. De asemenea, s-a determinat ecografic vârsta gestațională a fiecărei oi gestante. În scopul realizării cercetărilor propuse s-au format 3 loturi, după cum urmează: lotul I cuprinzând 4 oi pentru transplant *in utero* prin metoda laparotomiei mediane cu expunerea uterului gestant, lotul II cuprinzând 3 oi pentru transplant *in utero* prin metoda puncției transcutane sub ghidaj ecografic și lotul III martor cuprinzând 3 oi. Distribuția animalelor de studiu în cele 3 loturi a depins exclusiv de vârsta gestațională, dorindu-se o grupare pe vârste gestaționale cât mai apropiate (chiar identice).

Transplantul *in utero* cu celule stem xenogene pe model animal ovin s-a efectuat la o vârstă de gestație cuprinsă între 60-65 de zile, utilizând două modalități diferite :

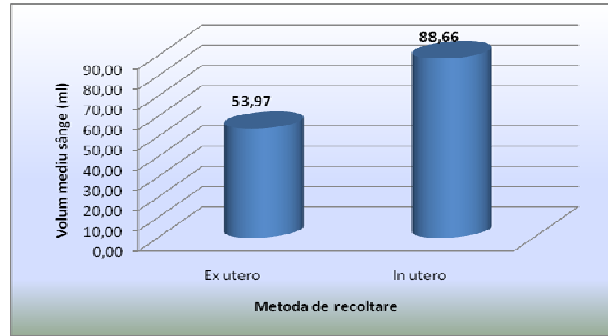
- metoda puncției transcutane sub ghidaj ecografic;
- metoda laparotomiei mediane cu exteriorizarea uterului gestant.

Punerea în evidență a grefării celulelor stem umane transplantate și determinarea ratei de grefare în organismele chimerice obținute s-a făcut prin analiza celulelor marcate prin fluorocitometrie în flux utilizând BD FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, Ca) din dotarea Departamentului de Reproducție Obstetrică și Ginecologie Veterinară din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Cluj-Napoca.

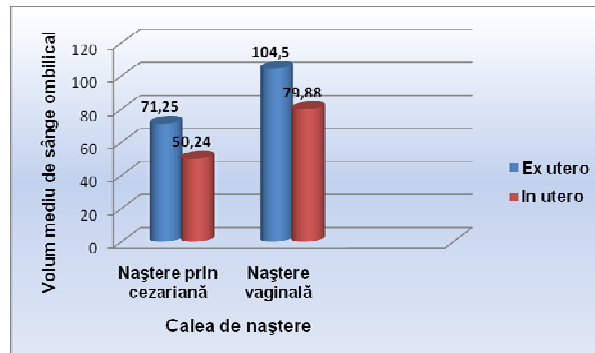
REZULTATE ȘI DISCUȚII

Recoltarea sângelui placentar s-a efectuat prin două metode: *in utero* și recoltare ex utero. S-au prelucrat statistic în total 42 de probe provenite de la recoltări *in utero*: 22 de probe au provenit de la N-N de sex feminin și 20 de probe de la N-N de sex masculin. S-au prelucrat datele cu privire la greutatea N-N, greutatea placentei, volumul sângelui ombilical și WBC. Pentru recoltări ex utero s-au prelucrat în total 30 de recoltări *in utero*; 15 date provenite de la nouă născuți de sex feminin și 15 de sex masculin.

Volumele medii de sânge placentar obținute au variat în funcție de metoda de recoltare și în funcție de calea nașterii (grafic 1,2).

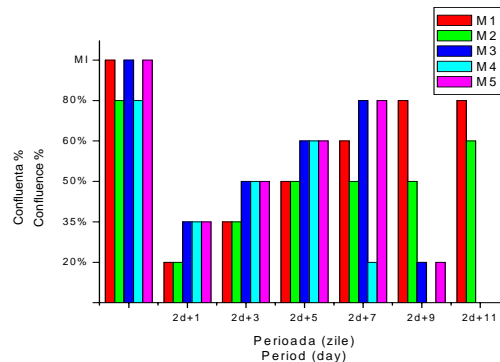


Grafic 1 – Reprezentarea grafică a mediei volumelor recoltate prin cele două metode



Grafic 2 – Reprezentarea grafică a mediei volumelor recoltate în funcție de calea de naștere și metoda de recoltare

Analiza globală a celor 5 medii de cultură utilizate (dintre care 2 medii au fost suplimentate original) indică faptul ca toate mediile au permis atașarea celulelor pe substratul de cultivare, însă s-a constatat diferențe cu privire la confluența culturii (grafic 3).



Grafic 3 – Analiza globală a comportamentului celulelor stem cultivate în cele 5 medii de cultură

Culturile celulare diferențiate pe linie osteogenică au fost testate pentru identificarea celulelor osteopontin și osteocalcin pozitive, iar cele induse pe linie neuronală au fost testate pentru identificarea GFAP, S100, NSE și sinaptofizină (fig.1).

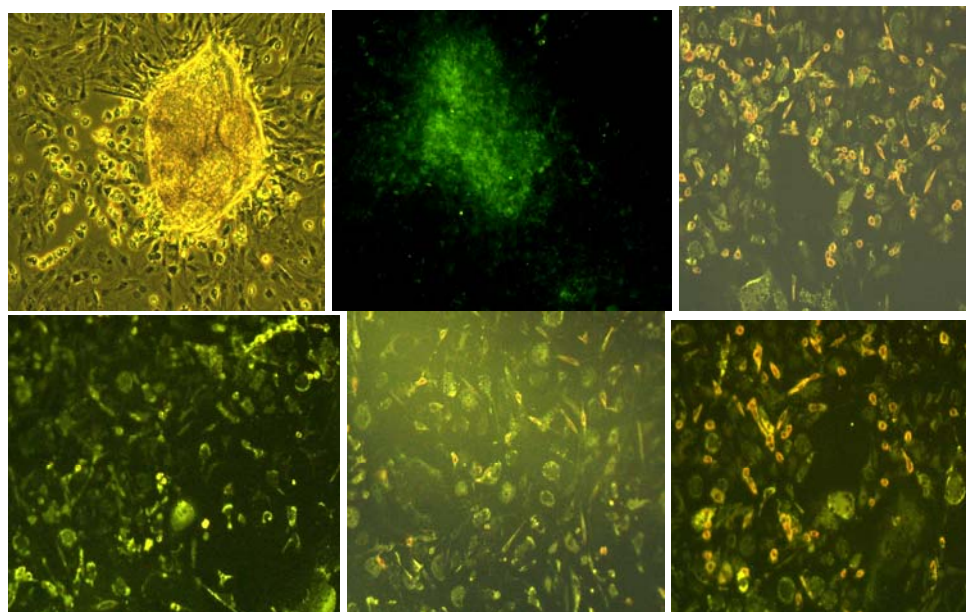


Fig 1. Celule IHC pozitive pentru markerii folosiți

Procedurile invazive de transplantare *in utero* la oile gestante de rasă Merinos Transilvănean tipul M luate în studiu au reușit în proporție de 100% atât prin tehnica laparotomiei mediane cu exteriorizarea uterului gestant cât și prin tehnica puncției transcutanate sub ghidaj ecografic.

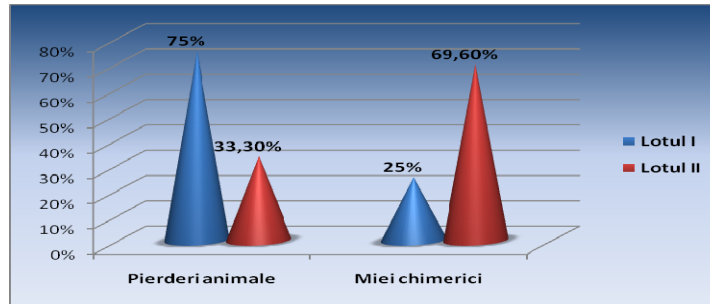
Tabel 1. Rezultatele procedurilor de transplantare *in utero*

Nr. crt	Nr. matricol oi	Lotul experimental	Rezultatul transplantării
1	RO 107 1 216 030	I	Moarte la 48 de ore
2	RO 104 6 698 981	I	Miel chimeric fătat la 148 zile
3	RO 104 6 698 937	I	Avort la 7 zile post-transplant
4	RO 104 4 598 949	I	Avort la 7 zile post-transplant
5	RO 108 0 324 188	II	Miel chimeric fătat la 152 zile
6	RO 107 1 216 050	II	Avort la 7 zile post-transplant
7	RO 107 1 216 115	II	Miel chimeric fătat la 145 zile

În concluzie, pierderile animale rezultate în urma transplantului *in utero* s-au situat în jurul valorii de 75% la lotul experimental I (tehnica transplantului *in utero* prin laparotomie mediană cu exteriorizarea uterului gestant). Din totalul de pierderi animale, 33% au murit în urma complicațiilor de natură infecțioasă iar 66% din oi au avortat .

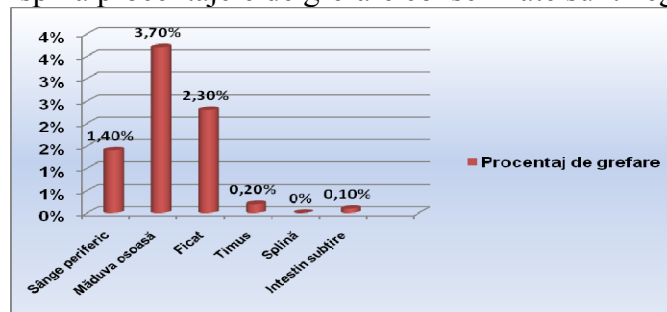
La lotul II experimental (tehnica transplantului *in utero* prin puncție transcutană sub ghidaj ecografic) 33,3% din oile transplantate au avortat (grafic 4).

Prin analizarea globală a rezultatelor obținute rezultă că procentajul pierderilor animale post transplantare este mai mare în cazul Lotului I experimental față de Lotul II (75% vs. 25%). Ca urmare procentajul de miei chimERICI ajunși la termen este mai mare în Lotul II experimental la care s-a folosit metoda puncției transcutane sub ghidaj ecografic continuu.

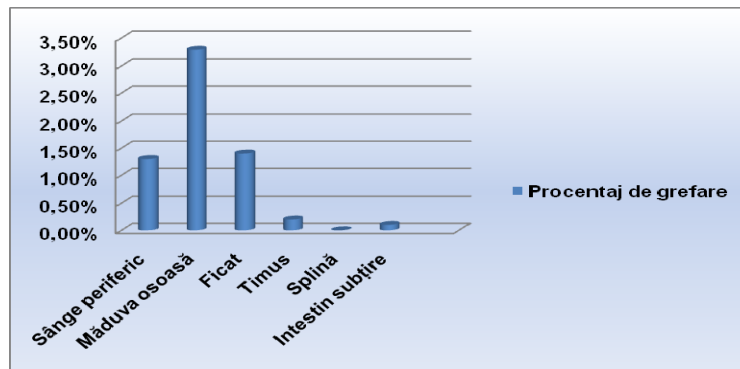


Grafic 4 – Analiza comparativă a loturilor experimentale

Prin analiza globală a datelor obținute după fluorocitometrie în flux se pot constata următoarele: cel mai mare procent de grefare s-a obținut în măduva osoasă hematogenă (3,7%), urmat de ficat un procentaj de grefare de 2,3%, sânge periferic 1,4%. În timus, intestin subțire și splină procentajele de grefare consemnate sunt neglijabile.



Grafic 5 - Reprezentarea grafică a celulelor umane CD 45⁺



Grafic 6 - Reprezentarea grafică a celulelor umane CD 34⁺

După transplantul in utero pe model murin analizarea grefării s-a făcut cu ajutorul programului FACS Diva, rezultatele fiind prezentate sub formă de histograme. Din totalul de 16 feteși analizați s-a evidențiat grefarea celulelor stem umane în cazul a 7 feteși. De asemenea s-a efectuat și analize imunohistochimice în vederea evidențierii celulelor grefate.

În figurile 2-4 se observă inducate la nivelul săgeților celule de o colorație diferită ce sunt celulele umane imunomarcate cu anticorpul anti-human CD34.

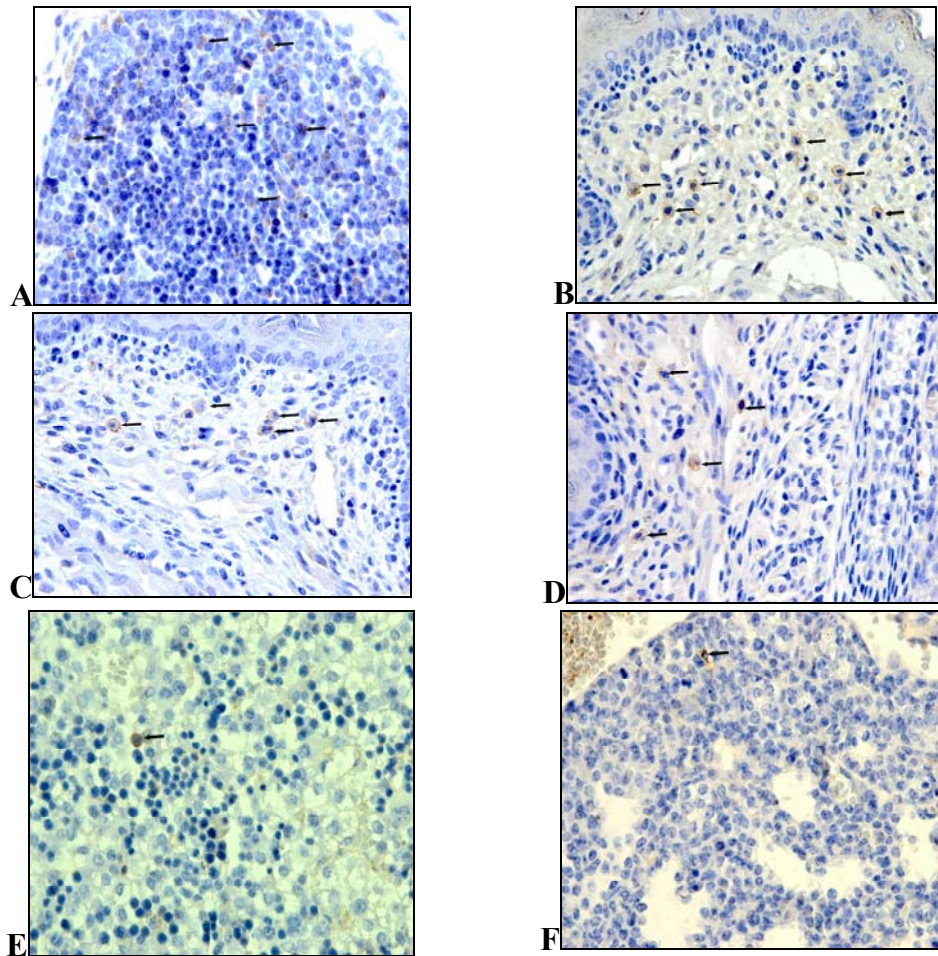


Figura 2 – Celule imunomarcate CD34+ în organe fetale murine : A.Secțiune prin ganglion limfatic (40x); B,C,D. Secțiune la nivelul țesutului celular subcutanat(40x); E,F. Secțiune prin ficat (40x) (original)

În figura de mai sus se observă indicate la nivelul săgeților celule imunomarcate cu anticorpul anti-human CD34 (Novocastra, UK), cu specificitate pentru celule umane.

Celulele ce exprimă markerul CD34 se găsesc în sângele placentar, măduva osoasă hematogenă sau sângele periferic, fiind celule hematopoietice. De asemenea, celule CD34+ pot fi : precursori de celule endoteliale, mastocite sau subpopulații de celule dendritice. Prezența celulelor CD34+ la nivelul secțiunilor IHC din organele fetale murine analizate indică greșarea celulelor stem umane transplantate *in utero* .

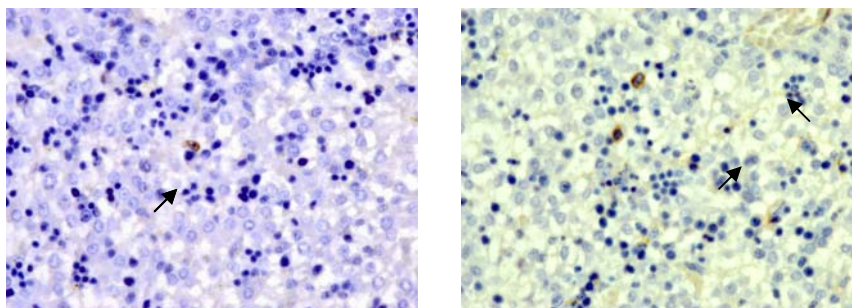


Figura 3 – Celule imunomarcate Cd45+ în ficat fetal murin (40x) (original)

În figura 3 se observă la nivelul secțiunilor imunohistologice realizate la nivelul ficatului fetal murin prezența celulelor pozitive pentru markerul CD45 (indicate de săgeți). Markerul CD45 este prezent pe suprafața tuturor celulelor hematopoietice diferențiate mai puțin la nivelurile eritrocitelor. În figura 4 putem distinge celule pozitive pentru markerul CD117 (c-kit) la nivelurile secțiunilor imunohistologice efectuate pe organe fetale murine. În special celulele stem hematopoietice (HSC), progenitorii multipotenți sau precursorii liniei mielocitare exprimă pe suprafața lor celulară nivele crescute de CD117 (c-kit). În plus, mastocitele, melanocitele de la nivelurile pielii sau celulele interstițiale din tractul digestiv exprimă CD117. În preparatele IHC prezentate în figura 7, celulele c-kit+ sunt prezente la nivelul ficatului fetal murin (care reprezintă principalul organ hematopoietic la vârsta gestațională analizată), în ganglioni limfatici și la nivelul țesutului celular subcutanat. În această ultimă localizare (comună pentru celulele c-kit pozitive) celulele imunomarcate prezintă caractere histologice asemănătoare cu mastocitele.

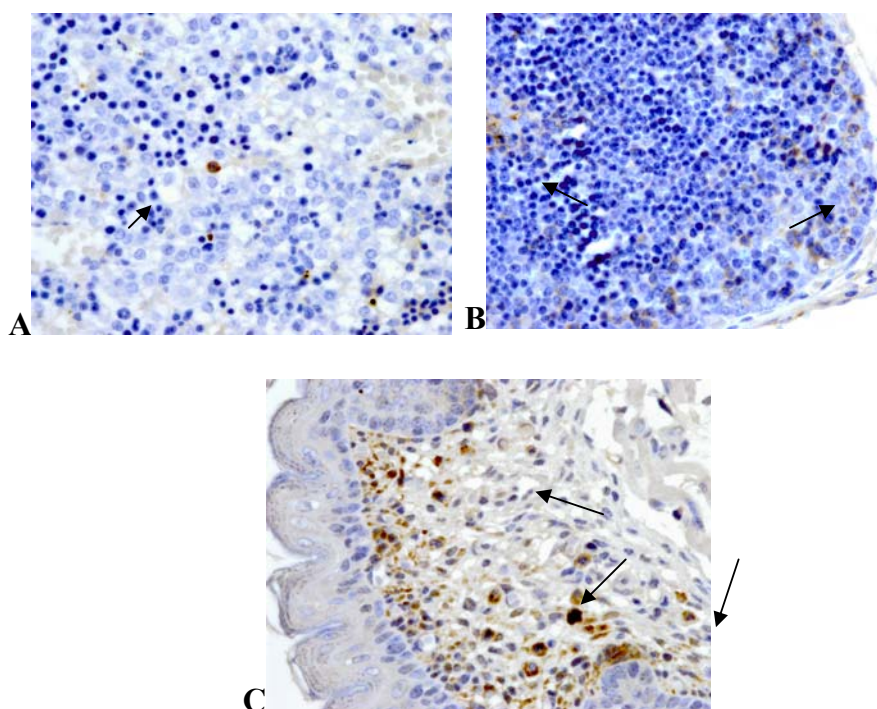


Figura 4 – Celule imunomarcate c-kit pozitive în organe fetale murine:
A. Secțiune la nivelul ficatului (40x); B. Secțiune prin ganglion limfatic (40x);
C. Secțiune la nivelul țesutului celular subcutanat (40x) (original)

În figurile 3 și 4 se pot observa celule imunomarcate CD45+ și c-kit+ prezente în secțiunile imunohistologice efectuate pe organe fetale murine. Pozitivarea celulelor pentru markerii CD45 și c-kit (Novocastra, UK) indică prezența celulelor stem umane care s-au greșat în urma transplantului *in utero* efectuat.

CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI

Se recomandă utilizarea metodei de recoltare in utero in vederea optimizării probei de sânge placentar prelevat.

În urma cercetărilor efectuate cu privire la evidențierea capacității de multilinearitate a celulelor stem mezenchimale, putem să concluzionăm următoarele:

➤ densitate celulară de 2×10^4 celule / cm^2 este optimă pentru inițierea diferențierii celulelor stem mezenchimale;

➤ pe substratul gelatinat și cu mediul osteogenic modificările morfologice au fost vizualizate numai după 7 zile de cultură, cu apariția de celule cu aspect stelar și foarte puține celule cu morfologie rotundă;

➤ la 10 zile de la inițierea diferențierii s-a constatat apariția unor colonii celulare distincte dispersate neuniform pe suprafața plăcii de cultură, care s-au transformat în noduli osteogenici de diferite dimensiuni;

➤ acidul retinoic în combinație cu mediul neurobasal duce la apariția cu ușurință a celulelor diferențiate pe linie neuronală;

➤ la 48 de ore de la inducție neurogenică, la culturile fără substrat specific s-a constatat o schimbare drastică a morfologiei celulelor cu apariția de celule cu aspect stelar asemănătoare neuronilor (neuron-like) într-o proporție de 60% și câteva celule plate, pe lângă cele normale fusiforme și cele cu multipolaritate accentuată;

➤ după 72 de ore s-a observat apariția unor filamente fine bine individualizate, localizate intercelular;

➤ după 14 zile s-a observat apariția unui procent crescut de celule cu multipolaritate accentuată și a unor celule cu aspect asemănător celulelor gliale și foarte puține celule cu prelungiri, asemănătoare neuritelor, aceste prelungiri fiind inegale, unele mai scurte altele mai lungi;

➤ la culturile celulare diferențiate pe linie osteogenică au fost identificate celule osteopontin și osteonectin pozitive;

➤ nodulii osteogenici au fost 100% pozitive pentru osteonectin ceea ce sugerează că acești noduli sunt formați din osteoblaști;

➤ la culturile celulare diferențiate pe linie neuronală au fost identificate celule GFAP, enolază, S100 și sinaptofizin pozitive ceea ce demonstrează prezența de neuronilor, astrocitelor și a celulelor gliale;

Recomandăm utilizarea densității celulare optime pentru inducerea diferențierii pentru excluderea apariției inhibiției de contact. De asemenea recomandăm utilizarea substraturilor celulare mai ales pentru culturile supuse la diferențiere. Putem să afirmăm faptul că, o strategie destul de bună pentru inducerea diferențierii pe lineaj neural este inducerea diferențierii pe vase de culturi fără substrat special și adăugarea unui agent inductor nefiziologic cum este acidul retinoic (RA). Doza de administrare recomandată de către noi este de 10^{-4} . Se poate afirma că, liniile obținute de către noi sunt linii multipotente fapt dovedit prin suportarea diferențierii direcționate in vitro.

În urma efectuării transplantului de celule stem umane *in utero* la oi gestante se evidențiază următoarele concluzii și recomandări:

• în urma efectuării procedurilor de transplant *in utero* pe model animal ovin cu evidențierea grefării celulelor stem transplantate, am obținut în premieră în România, 3 animale chimerice ovine-umane;

• existența animalelor chimerice ovine-umane oferă posibilitatea studierii comportamentului *in vivo* al celulelor stem umane;

• recomandăm metoda de transplant prin puncție cutanată dirijată ecografic datorită operativității, preciziei, costului scăzut și riscurilor post-operatorii minime, atât pentru femela gestantă cât și pentru fetus.

CURRICULUM VITAE

DATE PERSONALE BIOGRAFICE:

1. **Nume:** GROZA

2. **Prenume:** DARIA MARIA

3. **Data și locul nașterii:** 02.07.1980, Cluj-Napoca

4. **Cetățenie:** Română

5. **Stare civilă:** Necăsătorită

6. **Domiciliul:** 3400, Cluj-Napoca, str.Moșilor nr.98, ap.2

Telefon: 0753 709191

Email : dariagroza@yahoo.com

6.Studii:

➤ Liceul Teoretic “Avram Iancu”, Cluj-Napoca ,(1995-1999);

➤ Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca,

Facultatea de Medicină Generală, (1999-2005).

7. **Limbi străine cunoscute:** (între 1 și 5 pentru competență – 5 este maxim, 1 este minim)

Limba străină	Citit	Vorbit	Scris
Engleză	5	5	5
Franceză	4	4	3
Spaniolă	5	5	3
Italiană	3	3	3

8. **Situația profesională actuală:** medic rezident obstetrică ginecologie

9. **Locul de muncă actual:** Spitalul Județean de Urgență, Cluj Napoca

ACTIVITATE PROFESIONALĂ:

- Noiembrie 2005 – *doctorand* la UMF „Iuliu Hatieganu”-Cluj Napoca, , având drept conducător științific al tezei de doctorat pe dl. Prof.Dr. NICOLAE COSTIN.

Mobilități

- Bursă Erasmus , Spania, Zaragoza (martie – mai 2005);
- Bursă de studii universitare și postuniversitare, în conformitate cu prevederile Hotărârii Guvernului nr.697/16.08.1996, modificată prin H.G.nr. 533/1998 la Universitatea din Reno, Nevada, în perioada 2006 – 2007, în cadrul Departamentului de Biotehnologii Animale condus de către Prof. Dr. Esmail D. Zanjani.

Cursuri absolvite:

- Microchirurgie experimentală - Spania, Zaragoza (mai 2005);
- Corelații clinico morfologice ale placentei – 17.03.2008-21.03.2008, Cluj Napoca;
- Tromboflebita membrelor inferioare – Actualități: 19.02.2009-20.02.2009, Cluj Napoca;
- Ecografia în Obstetrică și Ginecologie, 2008,2009, Cluj Napoca.
- Absolventă a Programului “*Soluții pentru optimizarea comunicării în structurile publice și private*” prin Phare, ADRBI și Guvernul României.

LUCRARI ELABORATE SI / SAU PUBLICATE :

- ◆ Lucrare de diplomă cu titlul “ ***Rolul factorului infecțios în ruperea prematură de membrane***”, conducător științific: Prof.Dr.Nicolae COSTIN – Seful Clinicii de Obstetrică și Ginecologie “Dominic Stanca”, Cluj-Napoca , susținută în 2005;
- ◆ GONZÁLEZ RAMOS Pedro, MORALES ASÍN José, MEDRANO PENÂ Joaquin, ORÓS LÓPEZ Daniel, BESCÓS SANTANA Elena, **GROZA Daria** (2005) – “***Linfadenectomia pélvico – aórtica en la rata Wistar***. Progresos de Obstetricia y Ginecologia, Spania.
- ◆ **Groza Daria**, Pall Eموke, Cenariu M., Pop R., Costin N., Groza I.S. In utero transplantation of human stem cells using an animal model: a comparison between two techniques. Cluj Veterinary Journal.2009; 15(1):9-14;
- ◆ **Groza Daria**, Costin N., Cenariu M., Pall Eموke, Peștean C., Groza I.S. Modelul experimental animal pentru transplantul in utero cu celule stem umane.Lucrări Științifice Universitatea de Științe Agricole Iași.2009;52(11):109-114;
- ◆ **Groza Daria**, Costin N., Miہu D., Ciortea R., Pall Eموke. The influence of certain obstetric factors on the quality of cord blood units. Clujul Medical.2009;82(3):403-406;

- ◆ Skopal-Chase Jessica, Pixley J, **Groza Daria**, Cenariu M, Torabi A et al. Immune Ontogeny and engraftment Receptivity in sheep fetuses. *Fetal Diagn Ther* 2009;25:102-110;
- ◆ Groza I., Cenariu M., **Groza Daria**, Pall Eموke, Peştean C. Flow cytometrical identification and characterization of human cord blood derived hematopoietic stem cells engrafted in sheep bone marrow following in utero transplantation. *Romanian Biotechnological Letters*. 2009;6 :32-38;
- ◆ Groza I., Simona Ciupe, Brînduşa Stegeran, M. Cenariu, **Daria Groza**. Cercetări privind biotehnica procedurii embrionilor de şoricioaică în vederea izolării Celulelor Stem Embrionare. Simpozion FMV Iaşi. 2006;13(2):34-39;
- ◆ Groza I, Ciupe Simona, Ciupercescu DD, Emőke Páll, Brandusa Stegeran, **Groza Daria**. Rescherches regarding the collection of mouse embryos and their use to obtain the stem cells. *Buletin Simpozion Stiñific*. Bucureşti. 2006;228-238;
- ◆ Pall Eموke, Groza I.S, Sorişău Olga, Cenariu M, **Groza Daria**, Tomuloasa C. Role of BMP-4 in mouse embryonic stem cells differentiation. *Lucrări Ştiinţifice Iaşi*. 2009; 52(11):94-98.

**PARTICIPĂRI LA PROIECTE DE CERCETARE,
FUNCTIA ÎNDEPLINITA: MEMBRU**

*Proiect CEE X 2/2005 - CELULA STEM: IMPLICAŢII ÎN PROCESELE DE
REGENERARE ŞI VINDECARE TISULARĂ*

*Proiect CEE X 103/2006 - STEROIZII ANIMALI ŞI IMPLICAŢIA LOR
ASUPRA TUMORILOR GENITALE LA OM*

*Proiect PN II 107//2007 - MODERNIZAREA ŞI EXTINDEREA
LABORATORULUI DE GERMOPLASMĂ*



“IULIU HAIEGANU”
UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
CLUJ-NAPOCA

EXPERIMENTAL RESEARCH REGARDING *IN VITRO* AND *IN VIVO* BEHAVIOUR OF STEM CELLS IN HUMAN REPRODUCTION

RESUME

Phd candidate: ***Groza Daria Maria***

Scientific Coordinator: ***Prof.Dr. Nicolae Costin***

2009

KEYWORDS: stem cells, umbilical cord blood, stem cell bank, chimerism, in utero transplantation

Recent interest in stem cell biology and its therapeutic potential has led to the search for accessible new sources of stem cells. Fetal stem cells from umbilical cord blood and placenta are less ethically contentious than embryonic stem cells and their differentiation potential appears greater than adult stem cells. Fetal stem cells represent powerful tools for exploring many aspects of cell biology and hold considerable promise as therapeutic tools for cell transplantation.

The purpose of this PhD thesis is to isolate hematopoietic and mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and placenta, to differentiate them into osteogenic and neural tissues and to study their in vivo behaviour by using experimental animal models for in utero transplantation. The evaluation of cell population engraftment in chimeric animals was assessed using fluorescent activated cells sorting(FACS) and immunohistochemistry(IHC).

Given the importance of the subject and the complexity of the purpose, the personal contributions were divided into several experiments:

7. the evaluation of current methods of collecting umbilical cord blood;
8. assessing whether certain obstetric factors influence the quality of the umbilical cord blood units. For this, we conducted a retrospective analysis of obstetric factors that might influence the total volume of collection and the total nucleated cells.
9. the isolation and in vitro culture of stem cells from the umbilical cord blood and from the placenta. We evaluated different culture media and created some original culture media in order to increase the viability rate;
10. assessing the differential potential of isolated mesenchymal stem cells by obtaining osteogenic and neural tissues;
11. the evaluation of in vivo behaviour of stem cells from umbilical cord blood and placenta by in utero transplantation using experimental animal models. We obtained for the first time in Romania (to our knowledge) murin-human and sheep-human chimeric animals;
12. engraftment evaluation using FACS and IHC.

Background data concerning the stem cell topic was presented in the first 5 chapters and the personal contributions were presented in the following 9 chapters, out of which the first contains the purpose of the thesis and the last contains the general conclusions of the research.

The personal contributions were carried out in 2008-2009, in four different locations:

- “DOMINIC STANCA” Clinic of Obstetrics and Gynecology Cluj-Napoca;
- The Obstetric Reproduction and Veterinary Gynecology Department belonging to the Faculty of Veterinary Medicine, Cluj-Napoca;
- The Oncology Institute “I.Chiricuța” Cluj-Napoca and

- Cord Blood Center RO SRL laboratory Cluj-Napoca, Part of Cord Blood Center Group.

Part of the research was carried out in United States of America, during a governmental scholarship obtained by the PhD candidate at the University of Reno, Nevada, in 2006-2007.

Chapter 7 “ Umbilical cord blood collection methodology” presents a comparison between two methods of umbilical cord blood collection (in utero collection and ex utero collection) and the aim of this experiment was to asses whether certain obstetric factors influence the quality of the umbilical cord blood units. We based our study on data from medical records regarding 72 deliveries with cord blood collections from healthy women with singleton term pregnancies. 42 cord blood collections were performed using the in utero collection method and 32 using the ex utero collection method. The complete medical and obstetric history was taken and subjects with complications during pregnancy or any genetic/infectious risk factors were excluded from the study. Written consent was obtained before the onset of labour. Cord blood was collected after normal vaginal delivery or after cesarean section. After delivery the umbilical cord was double clamped and sectioned in the usual way. The newborn was removed and taken care of in the neonate ward. After disinfection, the umbilical vein was punctured and the blood was collected by gravity drainage using a closed blood collection system (MacoPharma CellFlex MSC 1201 DU, Slovakia). In all cases the umbilical cord blood collection was performed before the delivery of the placenta. Every placenta was weight after delivery and the length of the umbilical cord from the insertion on the placenta to the puncture site was measured. All 72 collections were successful and the cord blood samples were transferred to the Cord Blood Center stem cell laboratory and were dealt with, analyzed and cryopreserved within 24 hours. Every sample was analyzed in terms of total blood volume and total nucleated cell count.

Volume determination, nucleated cell separation and cryopreservation were performed at Cord Blood Center laboratory in Cluj Napoca by trained personnel. Statistical analysis: to evaluate the correlation between the obstetric variables and the umbilical cord outcome indicators (cell count and volume) we used the T-Test; a p – value < 0.05 was considered to be statistically significant.

Our results agree in part with those already published by other authors. We found that infant birth weight, placental weight and the length of the umbilical cord have an impact on the quality of the UCB units.



Chart 1 – Correlation between mean volumes collected by the two methods

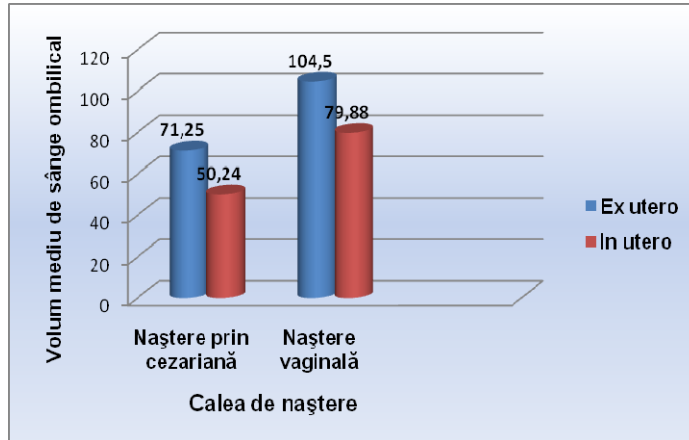


Chart 2 – Correlation between mean volumes collected by the two methods and by route of delivery

In utero umbilical cord blood collection

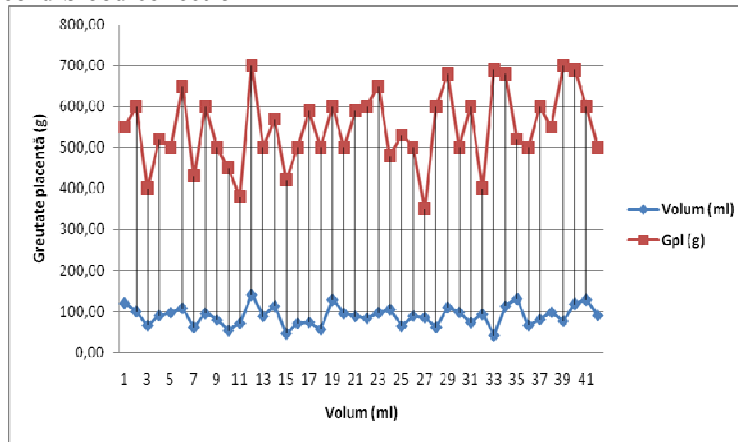


Chart 3 – Correlation between volume and placental weight

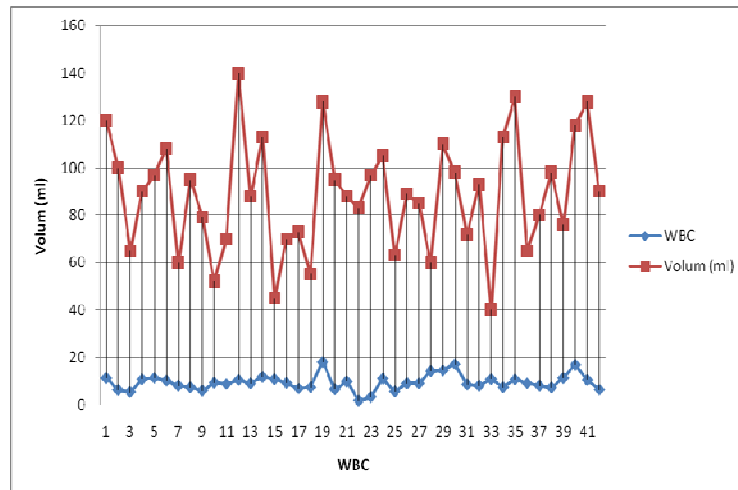


Chart 4 - Correlation between volume and WBC

Ex utero umbilical cord blood collection

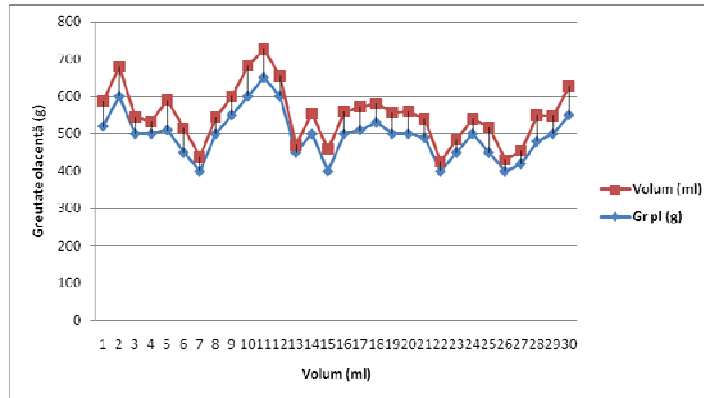


Chart 5 - Correlation between volume and placental weight

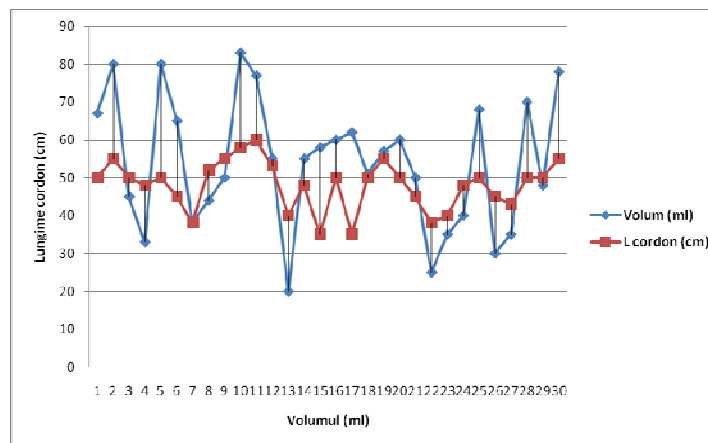


Chart 6 - Correlation between volume and umbilical cord length

The observation that the weight of the infant and the placenta are consistent predictors of cord blood volume is not surprising in view of the well-known direct correlation between infant and placental weight and fetoplacental blood volume. Based on this, it seems reasonable to reject cord blood samples with low volume.

The length of the umbilical cord influences the volume of cord blood that can be collected, but the association is not surprising, considering that a large fraction of the blood that is collected comes from the blood that remains in the umbilical vein itself. This observation is important because, independent of inherent variability in cord length, the obstetrician can maximize the retrievable volume simply by placing the umbilical clamp as close to the infant as reasonably possible to maximize the length available for the collection.

The results of our study also showed that the route of delivery, the gestational age and the neonate sex did not influence the quality of cord blood collection in a meaningful manner.

Chapter 8 and 9 deal with isolation and in vitro culture of mesenchymal stem cell from the umbilical cord blood and from the placenta. The global analysis of the 5 different culture media used (out of which 2 were originally supplemented) shows that all

media used permit cell attachment, but there are differences regarding the confluence of the cultures (as shows below).

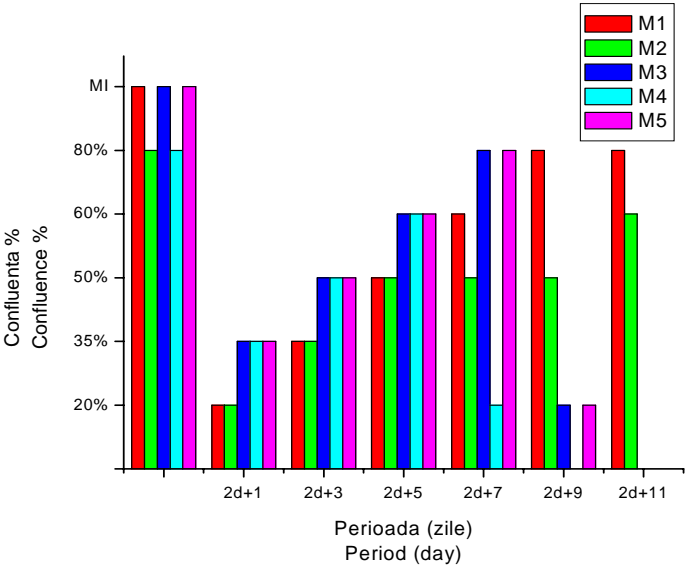


Chart 7 – Global analysis of cell confluency in all 5 culture mediums

Chapter 10 presents the differential potential of isolated mesenchymal stem cells by obtaining osteogenic and neural tissues. The cell cultures differentiated into osteogenic tissue were tested in order to identify the osteopontin and osteocalcin positive cells. The cell cultures differentiated into neural tissues were tested for GFAP, S100, NSE and synaptophysine positive cells using IHC techniques (figure 1).

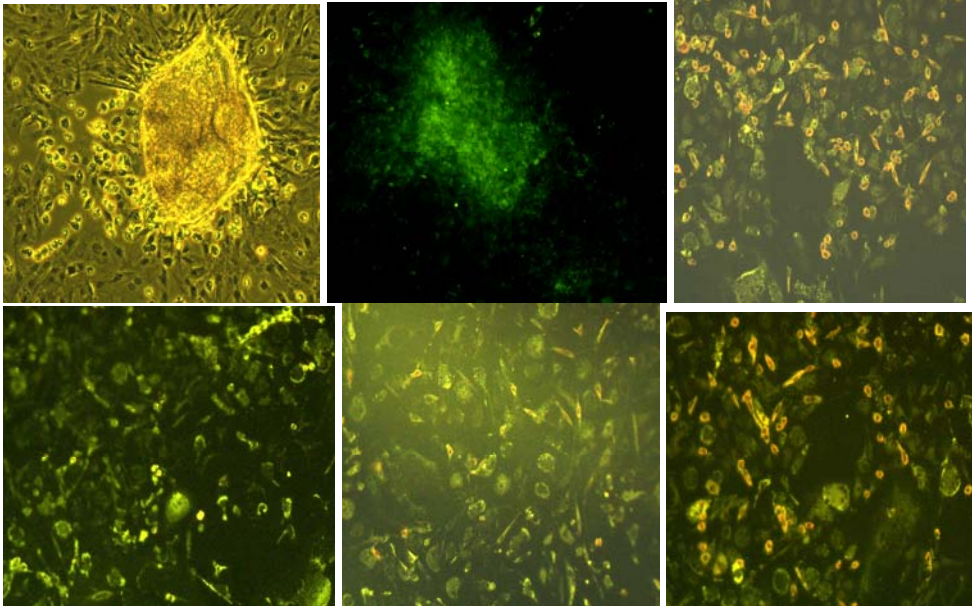
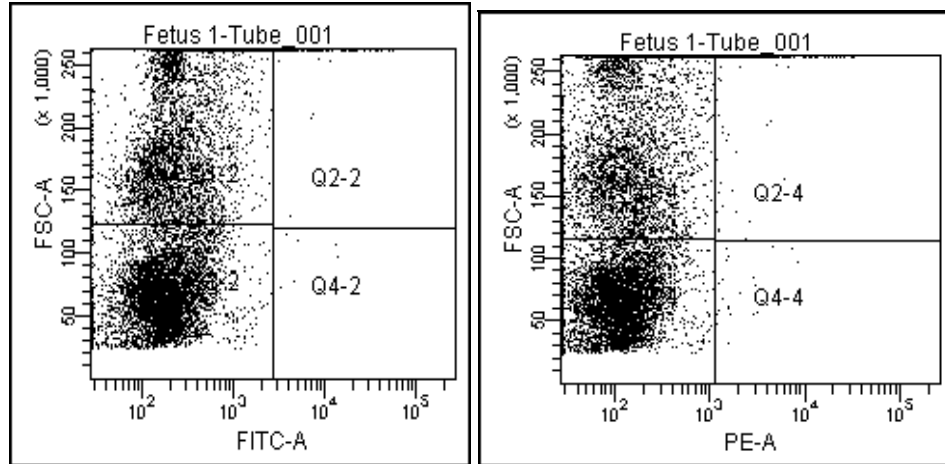


Figure 1. IHC positive cells for osteocalcin, osteopontin, GFAP, S100, NSE and synaptophysine

Chapter 11, 12 and 13 present data from experiments using animal models for in utero stem cell transplantation.

In chapter 11 we used the murin animal model for in utero stem cell transplantation. The female CD1 inbred line used for the experiment (n=10) were 8-10 weeks old. They were naturally bred and the conception date was assessed by vaginal plug elimination. The in utero transplantation using human mesenchymal stem cells was performed at day 13,5 of gestation. The engraftment was proven using FACS and IHC techniques, as shown in figures below.



Specimen Name: Fetus 1		Tube Name: Tube_001		FSC-A	FITC-A
Population	#Events	%Parent	Mean	Mean	
■ All Events	10,000	###	128,281	376	
☒ Q1	4,401	44.0	202,710	365	
☒ Q2	98	1.0	245,888	9,205	
☒ Q3	5,468	54.7	66,882	213	
☒ Q4	33	0.3	59,538	2,516	
☒ Q1-1	4,212	42.1	204,327	330	
☒ Q2-1	153	1.5	256,658	6,991	
☒ Q3-1	5,613	56.1	67,815	218	
☒ Q4-1	22	0.2	103,052	3,280	
☒ Q1-2	4,278	42.8	206,025	370	
☒ Q2-2	109	1.1	258,864	8,879	
☒ Q3-2	5,605	56.0	66,468	207	
☒ Q4-2	8	0.1	82,921	5,969	
☒ Q1-3	4,156	41.6	209,046	385	
☒ Q2-3	89	0.9	258,216	10,222	
☒ Q3-3	5,750	57.5	67,917	210	
☒ Q4-3	5	0.0	101,245	7,867	
☒ Q1-4	4,381	43.8	201,584	335	
☒ Q2-4	194	1.9	251,842	5,915	
☒ Q3-4	5,404	54.0	64,628	198	
☒ Q4-4	21	0.2	74,306	3,388	

Figure 2 – Histogram representation of engraftment (original)

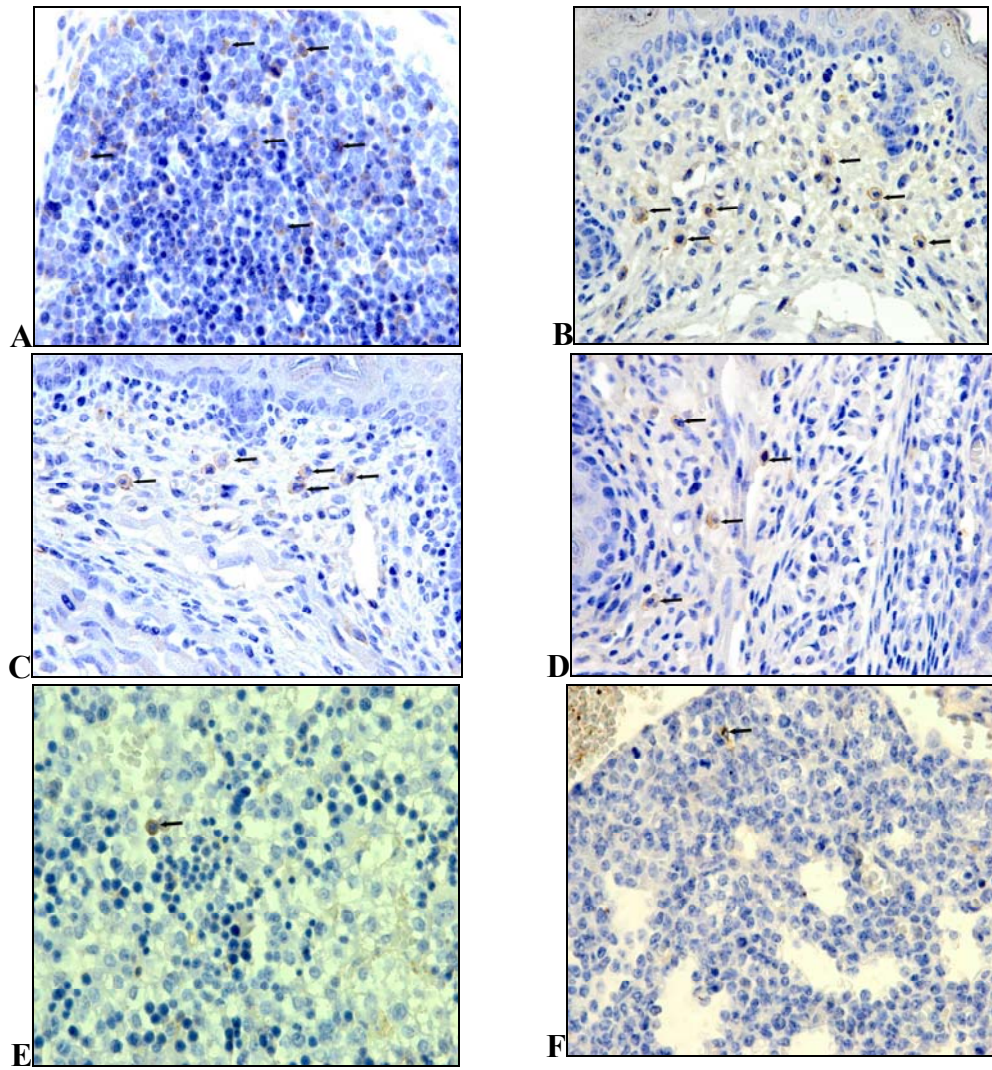


Figure 3 – CD34+ cells in murine fetal organs: A. Lymphnode section (40x); B,C,D. Murine fetal subcutaneous section (40x); E,F. Murine fetal liver section (40x) (original)

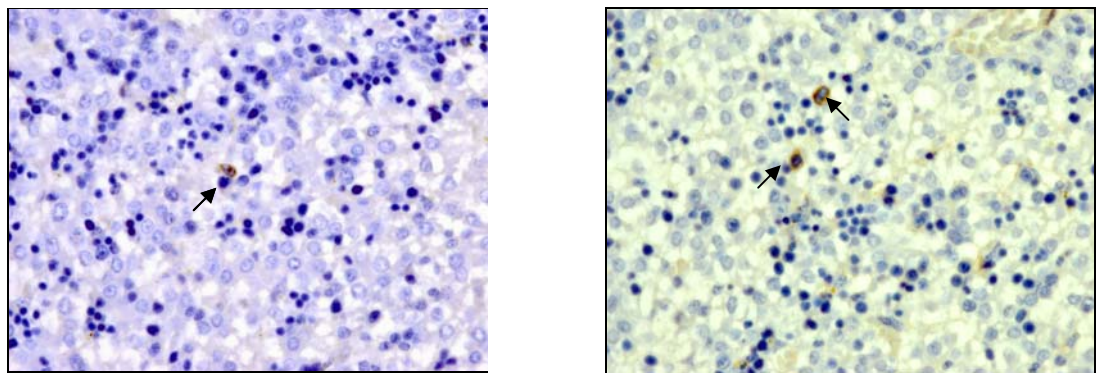


Figure 4 – CD45+ human cells in murine fetal liver (40x) (original)

In chapter 12 and 13 we present data regarding in utero stem cell transplantation using a sheep animal model. First, we studied the immune ontogeny and engraftment receptivity in sheep fetuses.

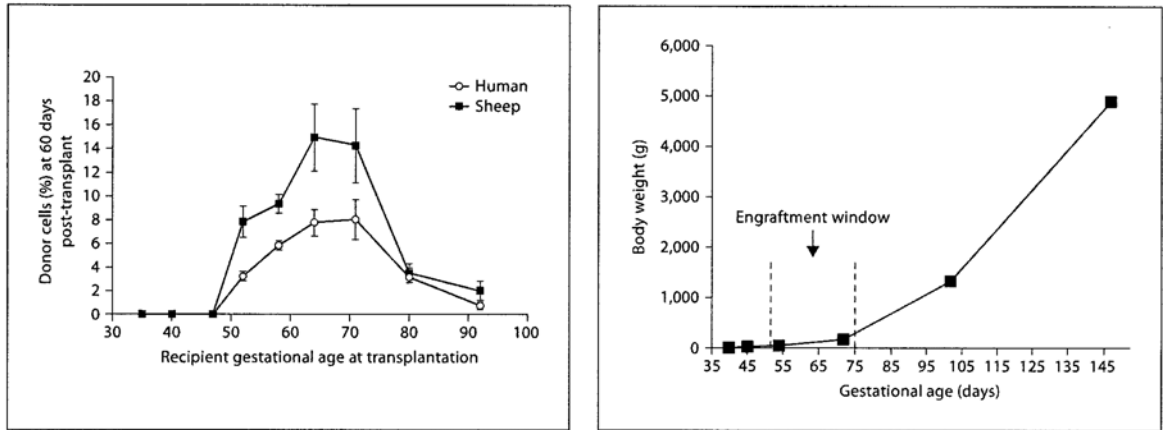


Chart 8 – The relationship between engraftment receptivity and recipient gestational age at transplantation. Fetal sheep body weight during gestation in relation to engraftment window

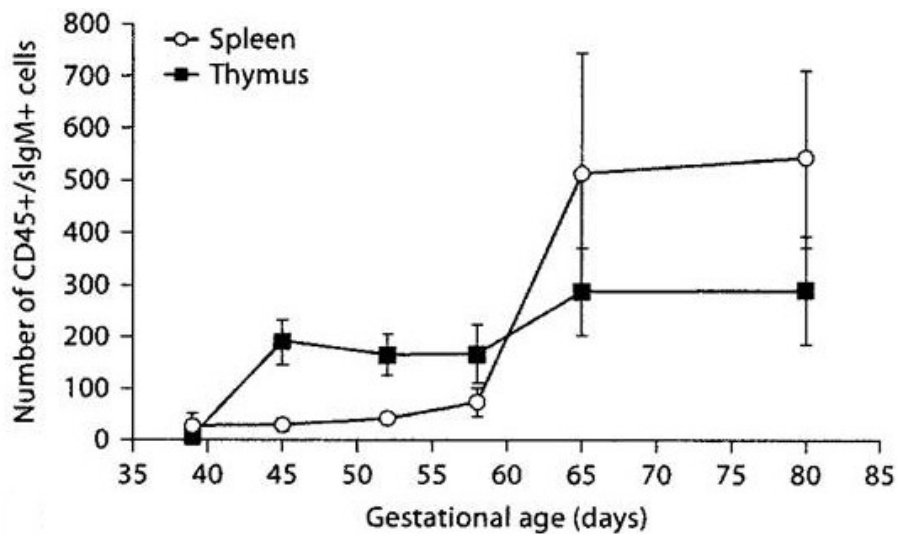


Chart 9 – Maturation profiles of CD45⁺/IgM⁺ cell in thymus and spleen

In summary, engraftment receptivity and immune ontogeny were studied in fetal sheep. We identified an engraftment window (days 51-71 of gestation) to donor hematopoietic stem cells. The window is associated temporally with the establishment of the thymic medulla and the onset of multilineage CD45 differentiation in the thymus. Central deletion is supported as the underlying mechanism for fetal long-term engraftment receptivity by the absence of maturing cells in the periphery, as evidenced by the lack of CD45 expression. These observations support a model for deletional tolerance that requires imprinting of long-term deletional memory. Implications with regard to performing in utero stem cell transplantation in humans to treat congenital diseases remain to be discussed.

The last experiment performed is presented in chapter 13. The purpose of this experiment was to assess the feasibility of in utero stem cell transplantation of human

umbilical cord blood stem cells in fetal sheep and to compare two different techniques of in utero transplantation, namely ultrasound-guided in utero transplantation and in utero transplantation after midline celiotomy. Umbilical cord blood units were collected from term deliveries, after obtaining written informed consent. Human cord blood-derived, CD34+ stem cells were injected into the peritoneal cavity of 60- to 65-day-old ovine fetuses by using 2 different techniques: ultrasound-guided transabdominal percutaneous needle puncture and midline celiotomy with the exposure of the pregnant uterus. Engraftment was determined after birth by flow cytometry with use of human-specific anti-CD 34/45 antibodies.

We obtained a total of 3 chimeric lambs. Using the midline celiotomy technique the fetal loss rate was 75% and only 33,3% when using ultrasound-guided transabdominal percutaneous needle puncture technique.

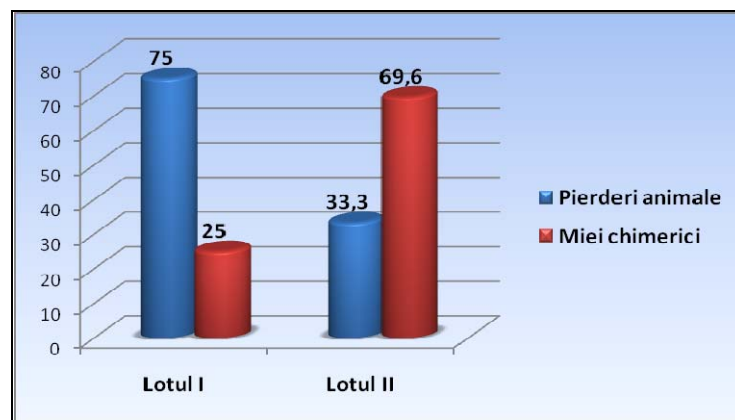


Chart 10 – Chart representation of animal loss in batches I and II

Engraftment of donor cells was found in all fetuses, with a mean level of 1.4% in fetal peripheral blood and 3.3% in fetal bone marrow, assessed by FACS.

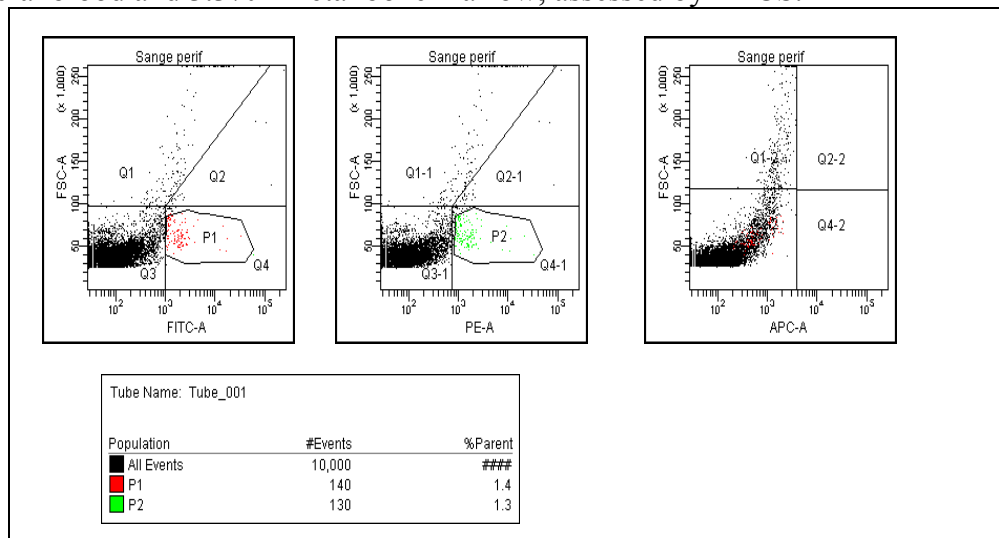


Figure 5 - The results of the FACS analysis for peripheral blood (original)

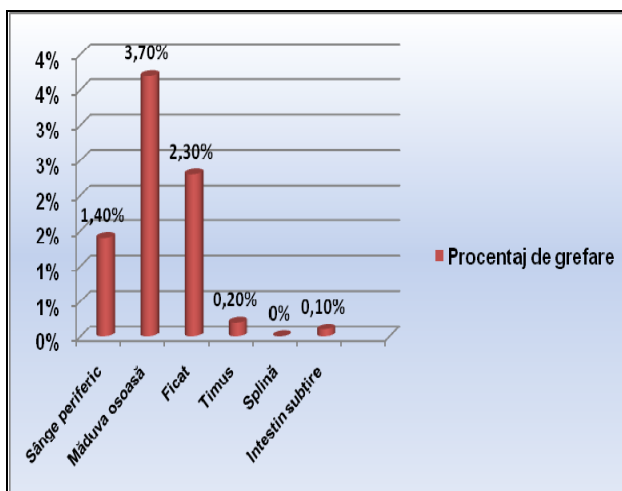


Chart 11 – Chart representation of human CD 45⁺ cells engrafted

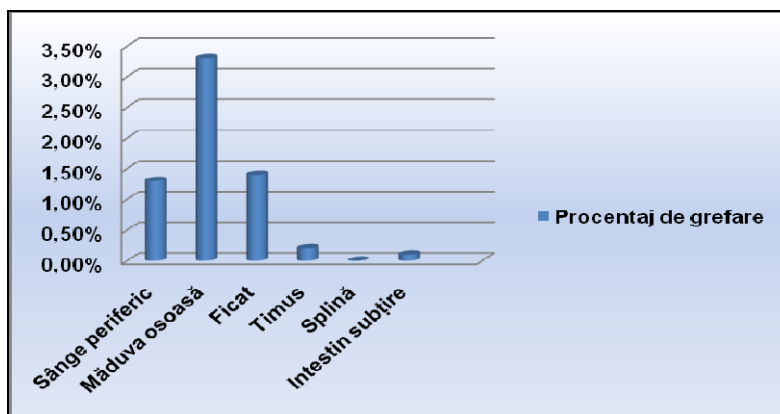


Chart 12 – Chart representation of human CD 34⁺ cells engrafted

We were able to show for the first time in an Romanian university that in utero transplantation of human CD34⁺ stem cells leads to successful engraftment in fetal sheep peripheral blood and bone marrow. The level of engraftment was low in our study. It was, however, not our main purpose to achieve high-level engraftment. Some groups have reported higher engraftment levels using human cells in preimmune fetal sheep. The low engraftment levels may be due to the lack of human stromal elements supporting hematopoietic cells in homing, proliferation, and differentiation. Cotransplantation of human stromal elements has been shown to increase engraftment levels.

We used two different techniques for in utero stem cell transplantation, both of them proving to produce engraftment of human stem cells in fetal lamb recipients. Comparing the two techniques in terms of fetal loss, we concluded that the ultrasound-guided transabdominal percutaneous needle puncture technique is more effective than the midline celiotomy technique.

This technique has a low fetal loss rate (33.3%), marginally above the natural loss rate. Although this natural loss varies between breeds, it is estimated to be between 15% to 20%. Our data proved to be similar to the data already published.

The second technique used in our study had a fetal loss rate of 75%; our data was above the one reported in literature to be as high as 50% .

The differences in fetal loss rate between the two techniques suggest that the surgical trauma associated with midline celiotomy and exposure of the pregnant uterus is more of a factor in fetal loss than specific effects that are due to the introduction of human cells in the sheep fetus.

We have demonstrated for the first time in Romania that in utero stem cell transplantation into sheep fetuses at an early gestational age is feasible and it is associated with engraftment in hematopoietic tissues, such as bone marrow and peripheral blood. The relevance of the ovine animal model to evaluate human stem cell activity must be carefully addressed in further studies with longer animal follow-up and secondary stem cell transplants.

CURRICULUM VITAE

Personal data:

1. **Name:** GROZA

2. **Surname:** DARIA MARIA

3. **Date and place of birth:** 02.07.1980, Cluj-Napoca

4. **Citizenship:** Română

5. **Marital Status:** Necăsătorită

6. **Home adress:** 3400, Cluj-Napoca, str.Moșilor nr.98, ap.2

Phone: 0753 709191

Email : dariagroza@yahoo.com

6. Background education:

- “Avram Iancu” Highschool, Cluj-Napoca ,(1995-1999);
- “Iuliu Hațieganu” University of medicine and Pharmacy Cluj-Napoca, (1999-2005). The dissertation title “ *The role of the infectious factor in the premature rupture of the membranes*”, scientific coordinator Prof.Dr.Nicolae COSTIN.
- Phd student at “Iuliu Hațieganu” University of medicine and Pharmacy Cluj-Napoca, since November 2005.

7. Foreign languages:

Language	Reading	Speaking	Writing
English	5	5	5
French	4	4	3
Spanish	5	5	3
Italian	3	3	3

8. Current professional situation: resident of obstetrics and gynecology

9. Current place of work: Regional Emergency Hospital, Cluj Napoca

Publishing and presentation of articles, participation to symposiums, conferences and congresses, attendance of post-university courses.

SCHOLARSHIP:

ERASMUS Scholarship
University of Zaragoza, Spain

Spring 2005

Scholarship offered by the Romanian Ministry of Education and Research
University of Nevada, Reno, USA

Dec.2006- Oct.2007

POST-UNIVERSITY COURSES:

- Experimental microsurgery - Spain, Zaragoza (mai 2005);
- Clinical and morphology correlation of the placenta – 17.03.2008-21.03.2008, Cluj Napoca;
- Lower limb thrombosis: 19.02.2009-20.02.2009, Cluj Napoca;
- Ultrasound in obstetrics and gynecology, 2008,2009, Cluj Napoca.

ARTICLES PUBLISHED:

- ◆ GONZÁLEZ RAMOS Pedro, MORALES ASÍN José, MEDRANO PENÂ Joaquin, ORÓS LÓPEZ Daniel, BESCÓS SANTANA Elena, **GROZA Daria** (2005) – *“Linfadenectomia pélvico – aórtica en la rata Wistar*. *Progresos de Obstetricia y Ginecologia*, Spania.
- ◆ **Groza Daria**, Pall Eموke, Cenariu M., Pop R., Costin N., Groza I.S. In utero transplanted human stem cells using an animal model: a comparison between two techniques. *Cluj Veterinary Journal*.2009; 15(1):9-14;
- ◆ **Groza Daria**, Costin N., Cenariu M., Pall Eموke, Peştean C., Groza I.S. Modelul experimental animal pentru transplantul in utero cu celule stem umane. *Lucrări Stiinţifice Universitatea de Stiinţe Agricole Iaşi*.2009;52(11):109-114;
- ◆ **Groza Daria**, Costin N., Mişu D., Ciortea R., Pall Eموke. The influence of certain obstetric factors on the quality of cord blood units. *Clujul Medical*.2009;82(3):403-406;
- ◆ Skopal-Chase Jessica, Pixley J, **Groza Daria**, Cenariu M, Torabi A et al. Immune Ontogeny and engraftment Receptivity in sheep fetuses. *Fetal Diagn Ther* 2009;25:102-110;
- ◆ Groza I., Cenariu M., **Groza Daria**, Pall Eموke, Peştean C. Flow cytometrical identification and characterization of human cord blood derived hematopoietic stem cells engrafted in sheep bone marrow following in uterotransplantation. *Romanian Biotechnological Letters*. 2009;6 :32-38;
- ◆ Groza I., Simona Ciupe, Brînduşa Stegeran, M. Cenariu, **Daria Groza**. Cercetări privind biotehnica procedurii embrionilor de şoricioaică în vederea izolării Celulelor Stem Embrionare. *Simpozion FMV Iaşi*.2006;13(2):34-39;

- ◆ Groza I, Ciupe Simona, Ciupercescu DD, Emőke Páll, Brandusa Stegeran, **Groza Daria**. Rescherches regarding the collection of mouse embryos and their use to obtain the stem cells. Buletin Simpozion Stiñific. București.2006;228-238;
- ◆ Pall Eموke, Groza I.S, Sorițau Olga, Cenariu M, **Groza Daria**, Tomuloasa C. Role of BMP-4 in mouse embryonic stem cells differentiation. Lucrări Științifice Iași.2009; 52(11):94-98.

RESEARCH GRANTS:

Proiect CEE X 2/2005 - STEM CELL in TISSUE REGENERATION AND HEALING

Proiect CEE X 103/2006 - ANIMAL STEROIDS AND THEIR INFLUENCE IN GENITAL TUMORS IN HUMANS

Proiect PN II 107//2007 - GERMOLAB