

**REZUMAT** al TEZEI DE DOCTORAT, intitulată  
**„Studiul *in vitro* al rolului celulelor stem placentare ca sursă alternativă în  
regenerarea hepatică și miocardică”**

Doctorand: Rus Ciucă Dan

Conducător științific: Prof. Dr. Pop Ioan Victor

**Cuvinte cheie:** celule stem, placentă, diferențiere hepatică, diferențiere miocardică, regenerare, terapie celulară

## **Cuprinsul tezei de doctorat**

### **INTRODUCERE**

### **STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII**

#### **1. Celule stem - generalități**

- 1.1. Definiție și proprietăți ale celulelor stem
- 1.2. Tipuri de celule stem
- 1.3. Celule stem mezenchimale

#### **2. Celule stem placentare**

- 2.1. Structura și compartimentele placentei
- 2.2. Tipuri de celule stem placentare și proprietățile lor
- 2.3. Studii preclinice cu celule stem placentare

#### **3. Celulele stem în regenerarea hepatică**

- 3.1. Structura ficatului
- 3.2. Hepatocitele ca celule stem
- 3.3. Celulele ovale

#### **4. Celulele stem în regenerarea miocardică**

- 4.1. Celule derivate din măduva osoasă
- 4.2. Celule stem cardiace rezidente
- 4.3. Mioblaste scheletale
- 4.4. Celule stem embrionare
- 4.5. Celule stem pluripotente induse

### **CONTRIBUȚIA PERSONALĂ**

#### **1. Ipoteza de lucru/obiective**

#### **2. Izolarea și cultivarea celulelor stem placentare**

- 2.1. Introducere

2.2. Ipoteza de lucru/obiective

2.3. Material și metodă

2.4. Rezultate

2.5. Discuții

### **3. Caracterizarea fenotipică și genetică a celulelor stem placentare**

3.1. Introducere

3.2. Ipoteza de lucru/obiective

3.3. Material și metodă

3.4. Rezultate

3.5. Discuții

### **4. Evaluarea capacității de diferențiere a celulelor stem placentare – diferențiere osoasă**

4.1. Introducere

4.2. Ipoteza de lucru/obiective

4.3. Material și metodă

4.4. Rezultate

4.5. Discuții

### **5. Diferențierea in vitro a celulelor stem placentare spre celule hepatice**

5.1. Introducere

5.2. Ipoteza de lucru/obiective

5.3. Material și metodă

5.4. Rezultate

5.5. Discuții

### **6. Diferențierea in vitro a celulelor stem placentare spre celule miocardice**

6.1. Introducere

6.2. Ipoteza de lucru/obiective

6.3. Material și metodă

6.4. Rezultate

6.5. Discuții

### **7. Concluzii generale (sinteză)**

**REFERINȚE**

**ANEXE**

## **Introducere**

Medicina regenerativă bazată pe metodologia terapiei celulare și a ingineriei tisulare este un domeniu multidisciplinar în curs de dezvoltare, care implică biologie,

medicină și manipulare genetică. Acest tip de terapie are ca scop menținerea, restaurarea sau sporirea funcției țesuturilor și organelor, ajutând astfel la tratamentul unor boli umane cu severitate variabilă, de la situații cronice la cele care pun viața în pericol. În bolile care evoluează cu compromiterea funcției țesuturilor sau organelor, cercetarea celulelor stem promite să ne ofere o cale eficientă spre terapia regenerativă. Totuși, aplicarea acestor cercetări în tratamentul bolilor umane nu este posibilă fără o cunoaștere aprofundată a proprietăților biologice a tuturor tipurilor de celule stem. În contextul unei anumite boli, trebuie hotărât în primul rând care este cel mai bun tip de celulă stem, cea embrionară sau de tip adult. Este de asemenea necesar să identificăm o sursă de celule stem care să fie accesibile în număr mare și să nu genereze preocupări etice.

Țesutul placentar suscită un mare interes drept sursă de celule pentru medicina regenerativă datorită plasticității fenotipice a multor din tipurile de celule izolate din acest țesut. Mai mult, placenta, care este implicată în menținerea toleranței fetale, conține celule care prezintă proprietăți imunomodulatoare. Ambele aceste caracteristici s-ar putea dovedi folositoare pentru viitoare aplicații clinice bazate pe terapia celulară. Țesutul placentar este ușor accesibil, poate fi procurat fără proceduri invazive, iar utilizarea sa nu provoacă dezbateri de natură etică.

Celulele stem mezenchimale (MSC) sunt distribuite variabil în corpul uman, fiind identificate pentru prima dată în măduva osoasă adultă. Ele sunt o populație rară la acest nivel și numărul lor scade semnificativ odată cu vârsta. MSC sunt relativ puține și în sângele periferic al adultului, sângele cordonului ombilical, precum și în sângele și organele fetale (ficat, măduvă osoasă, rinichi). Totuși, probele tisulare fetale sunt greu de obținut, iar sângele cordonului ombilical la termen este o sursă slabă de MSC. MSC sunt multipotente și pot fi induse să se diferențieze în os, cartilaj, adipocite, mușchi și endoteliu dacă aceste celule sunt cultivate în condiții speciale permissive. Dat fiind faptul că MSC au caracteristici imunologice unice, care pot suprima proliferarea limfocitelor in vitro și pot prelungi supraviețuirea grefelor in vivo, este favorizată persistența lor într-un mediu xenogenic. Prin capacitatea lor de diferențiere multiplă și a proprietăților imunoreglatoare, MSC promit mult ca un posibil agent terapeutic.

Teza conține rezultatele unui studiu de cercetare fundamentală, efectuat *in vitro* asupra celulelor provenite din placenta umană și sângele cordonului ombilical, derulat pe o perioadă cumulată de 4 ani (între 2008 și 2011), ale cărui obiective principale au fost:

- 1) izolarea și cultivarea celulelor cu proprietăți stem, de tip mezechimal, din diverse structuri ale placentei obținute din sarcini la termen cu evoluție normală;
- 2) analiza genetică și fenotipică a celulelor placentare pentru a stabili dacă sunt stem sau nu, iar apoi pentru a determina potențialitatea lor;
- 3) evaluarea capacității de diferențiere a celulelor stem în hepatocite după adăugarea la mediul de cultură a unor factori inductori specifici, prin evidențierea genetică și fenotipică a markerilor hepatocitari maturi și imaturi;
- 4) testarea plasticității celulelor stem prin încercarea de a modifica linia de diferențiere cu ajutorul unor substanțe biologice active adăugate la mediul de cultură;
- 5) testarea capacității de orientare spre linie cardiomiocitară în cazul celulelor stem mezenchimale din placenta.

Alegerea lotului de femei gravide incluse în studiu s-a făcut pe bază de voluntariat, după o prealabilă examinare a istoricului medical general și a evoluției sarcinii. Ele au fost pe deplin informate asupra naturii și scopului studiilor care se vor efectua asupra placentei și au consimțit în cunoștință de cauză semnând un formular tip. Lotul a cuprins doar cinci gravide, numărul de celule obținut fiind suficient pentru toate experimentele efectuate.

Partea de sinteză bibliografică, intitulată *Stadiul actual al cunoașterii*, cuprinde o descriere detaliată a conceptului de celulă stem, cu accent asupra celei de tip mezenchimal și a progreselor referitoare la celulele stem placentare, urmată de metodele curente de utilizare a diferitelor tipuri de celule stem în regenerarea hepatică și miocardică.

- Capitolul 1 - Celule stem - generalități

- Prezintă o sinteză obiectivă a cunoștințelor referitoare la definiția, proprietățile și

tipurile de celule stem (embrionare, germinale, fetale, din cordonul ombilical, de tip adult), subcapitolul 1.3 cuprinzând o descriere a celulelor stem mezenchimale (localizare, proprietăți, utilizări). Este discutat și rolul celulelor stem în medicina regenerativă, precum și unele efecte negative pe care le-ar putea avea utilizarea celulelor stem mezenchimale.

- Capitolul 2 – Celule stem placentare

- Prezintă mai întâi câteva noțiuni de bază referitoare la structura și compartimentele placentei, iar apoi sunt descrise tipurile de celule stem placentare, proprietățile lor și studiile preclinice în care au fost implicate (boli cardiace, vasculare, AVC, fibroza hepatică, boala Parkinson).

- Capitolul 3 – Celule stem în regenerarea hepatică

- Este descrisă rezumativ structura de bază a ficatului, urmată de studiul celor trei tipuri importante de celule care sunt utilizate în terapia bolilor hepatice, și anume hepatocitele mature, celulele ovale și celulele stem exogene.

- Capitolul 4 – Celulele stem în regenerarea miocardică

- Sunt descrise tipurile de celule utilizate în repararea miocardului lezat în cadrul bolii coronariene (celule stem embrionare, pluripotente induse, cardiace rezidente, derivate din măduva osoasă, mioblaste scheletale).

Cea de-a doua parte a tezei, intitulată Contribuția personală, cuprinde cele cinci etape importante ale studiului prezentate în capitolele 2-6, primul referindu-se la ipoteza de lucru/obiective, iar ultimul conține concluziile generale ale tezei. Fiecare porțiune a studiului (capitol) este structurată în cinci părți (subcapitole), și anume (1) introducere, (2) ipoteza de lucru/obiective, (3) material și metodă, (4) rezultate și (5) discuții.

- Capitolul 2 – Izolarea și cultivarea celulelor stem placentare

În acest studiu este realizată mai întâi izolarea celulelor cu proprietăți stem, de tip mezechimal, din diverse structuri ale placentei obținute din sarcini la termen (pe cale naturală sau prin cezariană) cu evoluție normală, după obținerea consimțământului avizat de la gravide și evaluarea minuțioasă a sarcinii și a placentei. Componentele placentare utilizate, după care sunt denumite și celulele corespunzătoare, sunt: 1)

Porțiunea mezenchimală a membranei amniotice → celule mezenchimale amniotice (MAM); 2) Epiteliul amniotic → celule epiteliale amniotice (MAE); 3) Placă corială cu sau fără vilozități → celule mezenchimale coriale (MC). Izolarea se efectuează prin procesare mecanică urmată de digestie enzimatică. Aceasta din urmă este variabilă din punct de vedere al enzimelor folosite, concentrația lor, durata reacției și numărul etapelor de digestie, toți acești parametri fiind adaptați tipului de celule stem care trebuie izolate. După izolare sunt testate numeroase condiții de cultivare in vitro a celulelor din cele trei compartimente placentare menționate anterior în vederea expansionării lor într-o cantitate suficientă studierii și caracterizării.

- Capitolul 3 Caracterizarea fenotipică și genetică a celulelor stem placentare

Sunt analizate cele trei tipuri de celule placentare recoltate anterior pentru a stabili în primul rând dacă sunt stem sau nu, iar apoi pentru a determina potențialitatea lor. Ele sunt testate la nivel genetic prin RT-PCR atât pentru expresia genelor de pluripotențialitate (Oct-3/4, SSEA-4, Sox2, Nanog), cât și a celor întâlnite în celule mezenchimale (CD105, CD29) și în celule stem de tip adult unipotente. De asemenea, este verificată prezența sau absența proteinelor codificate de aceste molecule prin intermediul imunofluorescenței. Aceste tehnici sunt utilizate și pentru evaluarea tipurilor de molecule HLA prezente pe celule, iar tipizarea HLA verifică fenotipul fetal sau matern al lor.

- Capitolul 4 Evaluarea capacității de diferențiere a celulelor stem placentare – diferențiere osoasă

În scopul testării diferențierii osoase celulele au fost cultivate într-un mediu special, îmbogățit în substanțe chimice necesare pentru creșterea și funcționarea osteoblastelor (PromoCell). Diferențierea este atestată prin apariția de gene și proteine caracteristice celulelor osoase (osteocalcină, osteopontină, osteonectină), precum și prin producerea de matrice proteică (colagen tip I) și depunerea de cristale de calciu în mediu (colorația Alizarin Red).

- Capitolul 5. Diferențierea in vitro a celulelor stem placentare spre celule hepatice

A fost evaluată capacitatea de diferențiere a celulelor stem placentare în hepatocite prin adăugarea la mediul de cultură a unor factori inductori specifici (HGF și oncostatina M) în două etape succesive. Celulele coriale cultivate pe colagen au evoluat cel mai bine. Procesul de diferențiere și nivelul până la care ajunge acesta a fost monitorizat prin evidențierea genetică și fenotipică a markerilor hepatocitari maturi și imaturi (CK18,  $\alpha$ -fetoproteina,  $\alpha$ 1-antitripsina, albumina, citocromul P450, lipaza hepatică). Plasticitatea crescută a celulelor stem placentare a fost dovedită prin modificarea liniei de diferențiere cu ajutorul unor substanțe biologice active adăugate la mediul de cultură (hepatic  $\rightarrow$  osos, neuronal  $\rightarrow$  hepatic și pancreatic  $\rightarrow$  hepatic).

- Capitolul 6. Diferențierea in vitro a celulelor stem placentare spre celule miocardice

A fost testată această capacitate în cazul celulelor mezenchimale din placentă, utilizând 5-azacitidina drept substanță inductoare. Neavând posibilitatea de accentuare a cardiomiogenezei prin coculturi cu linii celulare miocardice sau cu țesut cardiac de la modele animale, s-au utilizat diverse tipuri de substrat și stimularea electrică artificială a celulelor. Un rol important l-au avut laminina și colagenul metalizat cu nanoparticule de aur, care au stimulat proliferarea și diferențierea celulelor. Pentru a evalua rezultatele s-au folosit atât markeri genetici și proteici (GATA-4, Nkx2.5, troponina T, ANP, Tbx5, Baf60c), precum și morfologia, reorganizarea sarcomerică a filamentelor de actină, rata de proliferare și viabilitatea celulelor.

### Rezultate

Celulele placentare sunt izolate prin protocoale simple și specifice, cu evitarea contaminării cu alte tipuri de celule, iar stocarea lor pe perioade de câțiva ani nu le influențează viabilitatea și proprietățile. Ele se comportă foarte bine în culturi, necesită un mediu standard cu ser fetal (fără substrate complexe și factori biologici), au proliferare rapidă și pot fi expansionate in vitro timp îndelungat, cu păstrarea stabilității genetice și a stării nediferențiate.

Celulele din placentă exprimă atât markeri de pluripotență (Oct-4, Nanog, Rex-1 și SSEA-4) și de celule mezenchimale (CD90, CD105, CD29 și vimentină), cât și unele molecule caracteristice celulelor mai mature (ex. GFAP). Aceste constatări plasează

celulele pe un loc special în ierarhia dezvoltării, și anume un intermediar între celulele stem embrionare multipotente și cele de tip adult, cu capacitate de diferențiere mai limitată. Toate celulele evaluate prezintă absența completă a antigenului de clasă II de tip HLA-DR, nu doar o confirmare a statusului lor imunoprivilegiat, ci și o necesitate mai recentă a definirii celulelor stem mezenchimale. Riscul de a da naștere la diverse tumori benigne sau maligne (teratom, teratocarcinom) după transplantare este foarte redus, sau chiar absent (nu exprimă telomerază).

Celulele placentare se pot diferenția în linii de natură mezenchimală (ex. osoasă), dar posedă o plasticitate impresionantă, prin posibilitatea orientării spre linii endodermale (ex. hepatică). Capacitatea de diferențiere este variabilă și depinde de tipul de celulă stem utilizată, linia dorită (ex. celulele coriale sunt mai eficiente pentru generarea de hepatocite, dar MAM și MAE pentru cardiomiocite), substratul (ex. collagen metalizat la cardiogeneză, Matrigel la osteogeneză) și factorii biologici din mediu (ex. PromoCell pentru osteoblaste).

Celulele stem pot fi diferențiate până la nivelul unor celule hepatocit-like parțial maturizate, însă care nu exprimă albumină și nu îndeplinesc toate funcțiile unor celule hepatice adevărate. De asemenea, au fost obținute printr-un protocol destul de simplu celule care se apropie foarte mult de cardiomiocite, în special ca genotip și unele proteine esențiale, dar care totuși nu sunt complet funcționale, lipsindu-le capacitatea de contracție.

## CURRICULUM VITAE

**Nume și prenume:** RUS CIUCĂ DAN FLORIN

**Data și locul nașterii:** 2.03.1979, Cluj-Napoca, jud. Cluj

**Cetățenie:** română

**Stare civilă:** căsătorit

**Limbi străine cunoscute:** engleza, japoneza

**Număr de telefon:** acasă 0364264633

mobil 0728215686

**Adresă de e-mail:** ruscdan@yahoo.com

### Studii:

| Instituția  | Perioada  | Grade sau diplome obținute   |
|---|-----------|--|
| Liceul de Informatică "Tiberiu Popoviciu"<br>Cluj-Napoca  | 1993-1997 | - Diploma de bacalaureat<br>- Atestat profesional (ajutor de<br>analist programator) |
| Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu<br>Hațieganu", Cluj-Napoca, Facultatea de<br>Medicină Generală | 1997-2003 | Diploma de doctor medic  |
| Spitalul Clinic Județean de Urgență Cluj,<br>Anatomie Patologică  | 2007-2011 | Diploma de medic specialist în<br>anatomie patologică                                |

### Experiența profesională:

| Perioada  | Angajator  | Locul               | Funcția                          |
|-----------|--|---------------------|----------------------------------|
| 2004-2006 | Institute of Development, Aging and<br>Cancer, Department of Molecular<br>Immunology | Sendai<br>(Japonia) | Research student                 |
| 2007-2011 | Spitalul Clinic Județean de Urgență<br>Cluj, Anatomie Patologică                     | Cluj-Napoca         | Medic rezident                   |
| 2008-2011 | Spitalul Clinic Județean de Urgență Cluj   | Cluj-Napoca         | Cercetător (diverse<br>granturi) |
| 2009-2012 | Universitatea de Medicină și Farmacie<br>"Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca              | Cluj-Napoca         | Preparator (plata cu<br>ora)     |

### Educație (Cursuri și pregătire postuniversitară)

| Anul | Numele și locul              | Subiectul sau specialitatea   | Nivelul cursului<br>(grad, diplomă,<br>certificat) |
|------|------------------------------|---|--|
| 2006 | Kyoto, Japonia, 18-23 iunie  | 20 <sup>th</sup> IUBMB International<br>Congress of Biochemistry and<br>Molecular Biology and 11 <sup>th</sup><br>FAOBMB Congress | Certificat   |
| 2007 | UMF Cluj, 23 februarie       | Patologie pulmonară secundară:<br>influența patologiei<br>cardiovasculare asupra<br>plămânului (curs)                             | Certificat   |
| 2007 | UMF Timișoara, 19-21 aprilie | Celula endotelială și angiogeneza<br>tumorală (conferință + curs)   | Certificat   |
| 2007 | Zilele UMF Cluj, 3 decembrie | Colestaza la copii și adolescenți<br>(simpozion)  | Certificat   |

|      |  |  |                  |
|------|--|--|------------------|
| 2008 | Barcelona, Spania, 17-22 mai                           | 3 <sup>rd</sup> Intercontinental Congress of Pathology   | Certificat       |
| 2008 | UMF Târgu-Mureș, 29 sept – 10 octombrie                | Curs de patologie urologică: rinichi, prostată, vezică urinară, testicul                       | Diplomă          |
| 2008 | Institutul Oncologic Cluj-Napoca, 24-25 octombrie      | OECI Pathobiology Workshop: Structure and Genetics, the New Paradigm                           | Certificat       |
| 2009 | UBB Cluj, Facultatea de inginerie chimică, 2-4 aprilie | Modelare moleculară în chimie și biochimie   | Certificat       |
| 2009 | UMF Cluj, 14-17 mai                                    | Al 10-lea congres internațional pentru studenți și medici tineri – MEDICALIS                   | Certificat       |
| 2009 | Institutul oncologic Cluj-Napoca, 1-3 octombrie        | Zilele Institutului Oncologic “Prof. Dr. Ion Chiricuta” – 80 ani de luptă împotriva cancerului | Certificat       |
| 2011 | Cluj-Napoca, martie                                    | 9 <sup>th</sup> PRO INVENT Exhibition (Salon internațional de inventică)                       | Medalie de bronz |
| 2011 | Helsinki, Finlanda, 27 august - 1 septembrie           | 23 <sup>rd</sup> European Congress of Pathology  | Certificat       |
| 2011 | București, 4-5 noiembrie                               | Al 4-lea curs internațional de patologie digestivă   | Certificat       |

## CERCETARE

*Domeniile de cercetare de interes:*

1. Celule stem normale și tumorale
2. Modificări genetice implicate în carcinogeneză
3. Imunologie moleculară

În anul 2004 am câștigat o bursă de cercetare medicală fundamentală oferită de guvernul japonez și am lucrat timp de trei ani în cadrul departamentului de imunologie moleculară a Institute of Development, Aging and Cancer din Sendai. Am studiat familia de factori de transcripție Runx/CBFβ și implicarea lor în dezvoltarea limfocitelor T (Runx1, Runx3), repararea leziunilor ADN (Runx3), patogeneza leucemiilor (funcția proteinei de fuziune CBFβ/SMMHC în leucemia acută mieloblastică de tip M4Eo după clasificarea FAB) și spermatogeneză (o izoformă a Runx2).

În România, în perioada 2007-2011, am fost membru a numeroase granturi guvernamentale, în primul rând legat de celulele stem mezenchimale din placentă, dar și de celule stem tumorale (din glioblastom și hepatocarcinom) și utilizarea nanomaterialelor în cercetarea celulelor stem (în special implicarea colagenului funcționalizat cu nanoparticule de aur în creșterea și diferențierea miocardică).

## Publicații și prezentări

### PUBLICAȚII

1. Mihiu CM, Mihiu D, Costin N, Rus Ciucă D, Șușman S, Ciordea R. *Isolation and characterization of stem cells from the placenta and the umbilical cord*. Rom J Morphol Embryol. 2008;49(4):441-6. Review.
2. Mihiu CM, Rus Ciucă D, Sorișău O, Șușman S, Mihiu D. *Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane*. Rom J Morphol Embryol. 2009;50(1):73-7.
3. Mihiu CM, Șușman S, Rus Ciucă D, Mihiu D, Costin N. *Aspects of placental morphogenesis and angiogenesis*. Rom J Morphol Embryol. 2009;50(4):549-57. Review.
4. Iancu C, Ilie IR, Georgescu CE, Ilie R, Biriș AR, Mocan T, Mocan LC, Zaharie F, Todea-Iancu D, Șușman S, Rus Ciucă D, Biriș AS. *Applications of Nanomaterials in Cell Stem Therapies and the*

- Onset of Nanomedicine. Particulate Science and Technology. 2009;27(6):562 – 574.*
5. Tomuleasa C, Sorițău O, Rus-Ciucă D, Pop T, Todea D, Mosteanu O, Pinteana B, Foris V, Șușman S, Kacsó G, Irimie A. *Isolation and characterization of hepatic cancer cells with stem-like properties from hepatocellular carcinoma.* J Gastrointest Liver Dis. 2010 Mar;19(1):61-7.
  6. Mocan T, Șușman S, Rus-Ciucă D, Mișu C, Sorițău O, Simon S, Mocan LC, Agoșton-Coldea L, Biriș AR, Biriș AS, Clichici S, Mureșan A, Iancu C. *Effects of mesenchymal stem cells exposure to single wall carbon nanotubes involve oxidative stress mechanisms.* Acta Physiol. 2010 Apr;198(4):68 - 70.
  7. Tomuleasa C, Sorițău O, Rus-Ciucă D, Ioani H, Șușman S, Petrescu M, Timiș T, Cernea D, Kacsó G, Irimie A, Florian IS. *Functional and molecular characterization of glioblastoma multiforme-derived cancer stem cells.* J BUON. 2010 Jul-Sep;15(3):583-91.
  8. Șușman S, Sorițău O, Rus-Ciucă D, Tomuleasa C, Pop VI, Mișu CM. *Placental stem cell differentiation into islets of Langerhans-like glucagon-secreting cells.* Rom J Morphol Embryol. 2010;51(4):733-8.
  9. Orza A, Sorițău O, Olenic L, Diudea M, Florea A, Rus Ciucă D, Mișu C, Casciano D, Biriș AS. *Electrically conductive gold-coated collagen nanofibers for placental-derived mesenchymal stem cells enhanced differentiation and proliferation.* ACS Nano. 2011;5(6):4490-503.
  10. Rus Ciucă D, Sorițău O, Șușman S, Pop VI, Mișu CM. *Isolation and characterization of chorionic mesenchymal stem cells from the placenta.* Rom J Morphol Embryol. 2011;52(3):803-8.

## PREZENTĂRI

1. A Runx2 Isoform as a Novel Type of Nuclear Protein Expressed at Specific Stages during Murine Spermatogenesis, 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, Kyoto, Japonia, 2006.
2. Celule stem mezenchimale din placenta – izolare și caracteristici, Zilele UMF “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, decembrie 2008 (premiul întâi la secțiunea Cercetare fundamentală).
3. Placenta Stem Cells: One Man’s Trash Is Another Man’s Treasure, prezentată la International Course on Stem Cell Biology, din cadrul celui de-al 10-lea Congres internațional pentru studenți și medici tineri – MEDICALIS, mai 2009.
4. Placenta Stem Cells, Zilele Institutului oncologic “Prof. Dr. Ion Chiricuță” – 80 ani de luptă împotriva cancerului, octombrie 2009.
5. Diferențierea hepatică și pancreatică a celulelor stem mezenchimale din diverse structuri placentare, Zilele UMF “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, decembrie 2009.

**SUMMARY** of the PhD THESIS, entitled  
**„Placental Stem Cells as an Alternative Source in Hepatic and Myocardial  
Regeneration: An *in vitro* Study”**

Doctoral student: Rus Ciucă Dan, MD

Scientific advisor: Prof. Pop Ioan Victor, MD, PhD

**Keywords:** stem cells, placenta, hepatic differentiation, myocardial differentiation, regeneration, cell based therapy

**PhD thesis table of contents**

**INTRODUCTION**

**CURRENT KNOWLEDGE STATUS**

**1. Stem cells – general issues**

- 1.1. Definition and features of stem cells
- 1.2. Types of stem cells
- 1.3. Mesenchymal stem cells

**2. Placental stem cells**

- 2.1. Structure and components of the placenta
- 2.2. Types of placental stem cells and their characteristics
- 2.3. Preclinical studies involving placental stem cells

**3. Stem cells in liver regeneration**

- 3.1. Structure of the liver
- 3.2. Hepatocytes as stem cells
- 3.3. Oval cells

**4. Stem cells in myocardial regeneration**

- 4.1. Bone marrow derived cells
- 4.2. Resident cardiac stem cells
- 4.3. Skeletal myoblasts
- 4.4. Embryonic stem cells
- 4.5. Induced pluripotent stem cells

**PERSONAL CONTRIBUTION**

**1. Research hypothesis/goals**

**2. Isolation and culture of placental stem cells**

- 2.1. Introduction

2.2. Study hypothesis/objectives

2.3. Materials and methods

2.4. Results

2.5. Discussion

### **3. Phenotypic and genetic characterization of placental stem cells**

3.1. Introduction

3.2. Study hypothesis/objectives

3.3. Materials and methods

3.4. Results

3.5. Discussion

### **4. Evaluation of the differentiation potential of placental stem cells – bone differentiation**

4.1. Introduction

4.2. Study hypothesis/objectives

4.3. Materials and methods

4.4. Results

4.5. Discussion

### **5. In vitro differentiation of placental stem cells towards liver cells**

5.1. Introduction

5.2. Study hypothesis/objectives

5.3. Materials and methods

5.4. Results

5.5. Discussion

### **6. In vitro differentiation of placental stem cells towards myocardial cells**

6.1. Introduction

6.2. Study hypothesis/objectives

6.3. Materials and methods

6.4. Results

6.5. Discussion

### **7. General conclusions**

### **REFERENCES**

### **ANNEX**

### **Introduction**

Regenerative medicine based on cell therapy and tissue engineering is a multidisciplinary evolving field, which implicates biology, medicine and genetic

manipulation. This type of therapy is used in order to maintain, restore or enhance the function of tissues and organs, thus aiding in the treatment of various human diseases, from chronic situations to life threatening ones. In the case of diseases which compromise tissue or organ function, stem cell research promises to offer us an efficient way towards regenerative therapy. However, the application of this research in treating human diseases is not possible without a thorough knowledge of the biological properties of all types of stem cells. In the context of a certain disease, the best type of stem cells must first be decided, namely embryonic or adult. It is also necessary to identify an easily available source of a large number of stem cells, which doesn't raise any ethical concerns.

The placental tissue represents a very interesting source of cells for regenerative medicine, due to the phenotypical plasticity of many cell types isolated from this tissue. Moreover, the placenta, being involved in fetal tolerance, contains cells capable of immune modulation. Both these features may prove useful for future cell based clinical applications. The placental tissue is readily available, without invasive procedures, and its use isn't the subject of any ethical debate.

Mesenchymal stem cells (MSC) can be found all over the human body, but they were identified for the first time in the bone marrow. They are a rare population in this location and their number decreases significantly with age. MSCs are relatively few in adult peripheral blood, umbilical cord blood, and in fetal blood and organs (liver, bone marrow, kidneys). However, fetal tissue samples are difficult to obtain and term cord blood is a poor source of MSCs. The MSCs are multipotent and can be induced to differentiate into bone, cartilage, muscle and endothelium if cultured in special permissive conditions. Given the unique immune features of MSCs, which can suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and extend graft survival *in vivo*, their persistence in a xenogenic environment is favored. MSCs hold a great promise in therapy because of their wide differentiation capacity and their immunoregulatory properties.

The thesis contains the results of an *in vitro* basic research study involving cells from the human placenta and umbilical cord blood. This study was performed over a period of 4 years (2008-2011) and its main goals were:

- 1) isolation and culture of mesenchymal stem-like cells from various components of the human term placenta from pregnancies with normal evolution;
- 2) genetic and phenotypic analysis of placental cells in order to establish their stemness and their potential;
- 3) evaluation of the stem cells' capacity to differentiate into hepatocytes after adding specific induction factors to the culture medium, by testing mature and immature hepatocyte markers;
- 4) test the plasticity of stem cells by trying to change the differentiation lineage using biologically active substances added to the culture medium;
- 5) test the capacity of cardiomyocyte differentiation in placental mesenchymal stem cells.

The women were included in this study on a voluntary basis, after a preliminary examination of their general medical and pregnancy records. They were fully briefed on the nature and purpose of the experiments that were to be conducted on the placenta and they agreed by signing a typical consent form. Our study group had placentas from only five pregnant women, the number of cells being sufficient for all the procedures.

The theoretical synthetic part, entitled *Current knowledge status*, is a detailed description of the stem cell concept, especially the mesenchymal type, and the advances regarding placental stem cells, followed by the current uses of various types of stem cells in hepatic and myocardial regeneration.

- Chapter 1 - Stem cells – general issues

- Presents an objective summary of the knowledge regarding the definition, properties and types of stem cells (embryonic, germinal, fetal, umbilical and adult), subchapter 1.3 describing mesenchymal stem cells (location, features, uses). Moreover, the role of stem cells in regenerative medicine and certain negative aspects of mesenchymal stem cells are discussed.

- Chapter 2 – Placental stem cells

- Presents basic information on the structure and components of the placenta, followed by a description of the types of placental stem cells, their properties and the related preclinical studies concerning cardiovascular diseases, stroke, liver fibrosis

and Parkinson's disease.

- Chapter 3 – Stem cells in liver regeneration

- Describes the liver's histological structure and the three main types of cells used in the treatment of liver diseases, namely mature hepatocytes, oval cells and exogenous stem cells.

- Chapter 4 – Stem cells in myocardial regeneration

- Describes the types of cells used for repairing the injured myocardium due to coronary disease (embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, resident cardiac stem cells, bone marrow derived and skeletal myoblasts).

The second part of the thesis, entitled *Personal contribution*, contains the five main steps of our study presented in chapters 2 to 6, while the first one describes the goals and the last one, the conclusions. Every part of the study (chapter) is divided into five subchapters, namely (1) introduction, (2) study hypothesis/objectives, (3) materials and methods, (4) results and (5) discussion.

- Chapter 2 – Isolation and culture of placental stem cells

At first, this study deals with the isolation of mesenchymal stem-like cells from various structures of placentas from term pregnancies (both natural and cesarean section) with normal evolution. They are harvested after informed consent from the women and a thorough evaluation of the placenta. The tissue components and their corresponding cell types are as follows: 1) Mesenchymal part of the amniotic membrane → mesenchymal amniotic cells (MAM); 2) Amniotic epithelium → amniotic membrane epithelial cells (MAE); 3) Chorionic plate with or without villi → mesenchymal chorionic cells (MC). The isolation procedure usually has two steps, mechanical processing and enzymatic digestion. The latter step is variable (enzymes used, their concentration, the duration and number of digestion stages), its parameters adjusted to the type of cells being isolated. Afterwards, many in vitro culture conditions are tested for all the three aforementioned types in order to expand them to a sufficient amount for study and characterization.

- Chapter 3 – Phenotypic and genetic characterization of placental stem cells

The three types of placental cells that were previously harvested are analyzed in order to establish whether they are stem or not, and their potential. They are tested on a genetic level using RT-PCR for the expression of both pluripotentiality genes (Oct-3/4, SSEA-4, Sox2, Nanog) and genes found in mesenchymal (CD105, CD29) and adult stem cells. The presence of proteins encoded by these genes was assessed using immunofluorescence. These techniques are also used for evaluating HLA molecules on the surface of these cells, while HLA typing checks their fetal or maternal phenotype.

- Chapter 4 – Evaluation of the differentiation potential of placental stem cells – bone differentiation

In order to test the possibility of bone differentiation, the cells were cultured in a special medium, enriched in various chemical substances required for the growth and proper function of osteoblasts (PromoCell). The presence of differentiation was confirmed by the expression of genes and proteins typical for bone cells (osteocalcin, osteopontin, osteonectin), the production of protein matrix (type I collagen) and deposition of calcium crystals in the medium (alizarin red stain).

- Chapter 5 – In vitro differentiation of placental stem cells towards liver cells

The capacity of placental stem cells to differentiate along a hepatocyte lineage was tested by adding specific inductive factors (HGF and oncostatin M) to the medium in two stages. The chorionic cells cultured on collagen were the best choice in this case. The differentiation process was monitored by highlighting mature and immature hepatocyte markers, such as CK18,  $\alpha$ -fetoprotein,  $\alpha$ 1-antitrypsin, albumin, cytochrome P450 and hepatic lipase. The wide plasticity of placental stem cells was proved by changing the lineage with active biological factors added to the culture medium (hepatic → bone, neuronal → hepatic and pancreatic → hepatic).

- Chapter 6 – In vitro differentiation of placental stem cells towards myocardial cells

This type of differentiation was tested in the case of placental stem cells using azacytidine as an inductor. Not being able to stimulate cardiomyogenesis with myocardial cell lines in co-culture or with cardiac tissue from animal models, we tried various types of extracellular matrix-type substrates and artificial electric stimulation of

the cells. Laminin and gold coated collagen nanofibers were very effective, enhancing the proliferation and differentiation of cells. The results were evaluated using genetic and protein markers (GATA-4, Nkx2.5, troponin T, ANP, Tbx5, Baf60c), and also the morphology, sarcomeric organization of actin filaments, proliferation rate and viability of cells.

### **Results**

Placental cells can be isolated using simple and specific protocols, avoiding contamination with other types of cells, and storing them in liquid nitrogen for a few years doesn't alter their viability and properties. They behave very well in culture, require a standard simple medium with fetal serum (without complex substrates and biological factors), proliferate quickly and can be expanded in vitro for a long time, preserving their genetic stability and undifferentiated status.

Placental cells express not only markers of pluripotency (Oct-4, Nanog, Rex-1 and SSEA-4), but also of mesenchymal cells (CD90, CD105, CD29 and vimentin) and of more mature cells (e.g. GFAP). These findings place our cells on a special position on the development hierarchy, namely somewhere between multipotent embryonic stem cells and adult stem cells with limited differentiation capacity. All cells lack the class II HLA-DR antigen, this fact representing both a confirmation of their immunoprivileged status and a newly established requirement for the definition of mesenchymal stem cells. The risk of various benign or malignant tumors (teratomas, teratocarcinomas) after transplantation is almost nonexistent (the cells do not express telomerase).

Placental cells can be differentiated towards mesenchymal lineages (e.g. bone), but they possess an impressive plasticity, including orientation to endodermal structures (like the hepatocytes). The differentiation potential is variable and depends on the type of stem cell, the target lineage (e.g. chorionic cells are more effective for generation of hepatocytes, while MAM and MAE are better for myocardial cells), the substrate (e.g. gold coated collagen for cardiogenesis, Matrigel for osteogenesis) and the biologic factors from the medium (PromoCell for osteoblasts).

The stem cells can be differentiated until the stage of partially mature hepatocyte-like cells which do not express albumin and don't have all the functional properties of true liver cells. Moreover, using a relatively simple protocol, we obtained cells which

come pretty close to myocardial cells, especially as genotype and some essential proteins, but which are not completely functional, lacking the basic property of contractility.

## CURRICULUM VITAE

**First and Last Name:** RUS CIUCĂ DAN FLORIN

**Date and Place of Birth:** 2.03.1979, Cluj-Napoca, jud. Cluj

**Citizenship:** Romanian

**Marital Status:** Married

**Foreign Languages:** English, Japanese

**Telephone:** home 0364264633

mobile 0728215686

**E-mail Address:** ruscdan@yahoo.com

### Studies:

| Institution  | Period    | Degrees or diplomas awarded  |
|--|-----------|--|
| “Tiberiu Popoviciu” Computer Science Highschool, Cluj-Napoca                         | 1993-1997 | - Bachelor’s Degree<br>- Professional certificate (programming analyst aide) |
| General Medicine, “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca | 1997-2003 | Medical Doctor degree  |
| Emergency Clinical County Hospital Cluj, Department of Pathology                     | 2007-2011 | Specialist Doctor degree in Pathology  |

### Employment:

| Period    | Employer   | Location (City) | Position                     |
|-----------|--|-----------------|------------------------------|
| 2004-2006 | Institute of Development, Aging and Cancer, Department of Molecular Immunology | Sendai (Japan)  | Research student             |
| 2007-2011 | Emergency Clinical County Hospital Cluj, Department of Pathology               | Cluj-Napoca     | Resident doctor              |
| 2008-2011 | Emergency Clinical County Hospital Cluj  | Cluj-Napoca     | Researcher (various grants)  |
| 2009-2012 | “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy                          | Cluj-Napoca     | Part-time teaching assistant |

### Education (Courses and postgraduate training)

| Year | Name and location          | Subject or speciality  | Level of course (degree, diploma certificate) |
|------|----------------------------|--|---|
| 2006 | Kyoto, Japan, June 18-23   | 20 <sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11 <sup>th</sup> FAOBMB Congress | Certificate                                   |
| 2007 | UMF Cluj, February 23      | Secondary Pulmonary Pathology – Influence of Cardiovascular Pathology on the Lung (Course)                               | Certificate                                   |
| 2007 | UMF Timisoara, April 19-21 | The Endothelial Cell and Tumor Angiogenesis (Conference + Course)  | Certificate                                   |
| 2007 | UMF Cluj Days, December 3  | Colestasis in Children and Adolescents (Symposium)   | Certificate                                   |

|      |  |  |              |
|------|--|--|--------------|
| 2008 | Barcelona, Spain, May 17-22                              | 3 <sup>rd</sup> Intercontinental Congress of Pathology                               | Certificate  |
| 2008 | UMF Targu-Mures, Sept 29-October 10                      | Urological Pathology: Kidney, Prostate, Urinary Bladder, Testis (Course)             | Diploma      |
| 2008 | Oncology Institute, Cluj-Napoca October 24-25            | OECI Pathobiology Workshop: Structure and Genetics, the New Paradigm                 | Certificate  |
| 2009 | UBB Cluj, Chemical Engineering, April 2-4                | Molecular Modelling in Chemistry and Biochemistry                                    | Certificate  |
| 2009 | UMF Cluj, May 14-17                                      | 10 <sup>th</sup> International Congress for Students and Young Doctors – MEDICALIS   | Certificate  |
| 2009 | Cluj-Napoca, Romania, Oct 1-3, 2009 (Oncology Institute) | “Prof. Dr. Ion Chiricuta” Oncology Institute Days – 80 Years of Fight against Cancer | Certificate  |
| 2011 | Cluj-Napoca, March, 2011                                 | 9 <sup>th</sup> PRO INVENT Exhibition (Invention Show)                               | Bronze Medal |
| 2011 | Helsinki, Finland, August 27-September 1 <sup>st</sup>   | 23 <sup>rd</sup> European Congress of Pathology                                      | Certificate  |
| 2011 | Bucharest, November 4-5                                  | 4 <sup>th</sup> International Course on the Pathology of the Digestive System        | Certificate  |

## RESEARCH

*Main areas of interest in research:*

1. Normal and cancer stem cells
2. Genetic events and modifications involved in tumorigenesis
3. Molecular immunology

In 2004 I won a Japanese Government scholarship in basic medical research and I worked for three years in the Molecular Immunology department of the Institute of Development, Aging and Cancer located in Sendai. I was studying the Runx/CBF $\beta$  family of transcription factors and their involvement in T cell development (Runx1, Runx3), DNA mismatch repair (Runx3), leukemogenesis (function of the CBF $\beta$ /SMMHC fusion protein in FAB type M4Eo acute myeloid leukemia) and spermatogenesis (isoform of Runx2).

In Romania, during 2007-2011, I co-managed a government grant regarding mesenchymal stem cells in the placenta and worked in several other grants involving cancer stem cells (mainly in glioblastomas) and the use of nanomaterials in stem cell research (mainly collagen with gold nanoparticles in myocardial growth and differentiation).

## Publications & Presentations

### PUBLICATIONS

1. Mihiu CM, Mihiu D, Costin N, Rus Ciucă D, Şuşman S, Ciortea R. *Isolation and characterization of stem cells from the placenta and the umbilical cord*. Rom J Morphol Embryol. 2008;49(4):441-6. Review.
2. Mihiu CM, Rus Ciucă D, Sorişău O, Şuşman S, Mihiu D. *Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane*. Rom J Morphol Embryol. 2009;50(1):73-7.
3. Mihiu CM, Şuşman S, Rus Ciucă D, Mihiu D, Costin N. *Aspects of placental morphogenesis and angiogenesis*. Rom J Morphol Embryol. 2009;50(4):549-57. Review.
4. Iancu C, Ilie IR, Georgescu CE, Ilie R, Biriş AR, Mocan T, Mocan LC, Zaharie F, Todea-Iancu D, Şuşman S, Rus Ciucă D, Biriş AS. *Applications of Nanomaterials in Cell Stem Therapies and the*

- Onset of Nanomedicine. Particulate Science and Technology. 2009;27(6):562 – 574.*
5. Tomuleasa C, Sorițău O, Rus-Ciucă D, Pop T, Todea D, Mosteanu O, Pintea B, Foris V, Șuşman S, Kacsó G, Irimie A. *Isolation and characterization of hepatic cancer cells with stem-like properties from hepatocellular carcinoma.* J Gastrointest Liver Dis. 2010 Mar;19(1):61-7.
  6. Mocan T, Șuşman S, Rus-Ciucă D, Mihiu C, Sorițău O, Simon S, Mocan LC, Agoșton-Coldea L, Biriș AR, Biriș AS, Clichici S, Mureșan A, Iancu C. *Effects of mesenchymal stem cells exposure to single wall carbon nanotubes involve oxidative stress mechanisms.* Acta Physiol. 2010 Apr;198(4):68 - 70.
  7. Tomuleasa C, Sorițău O, Rus-Ciucă D, Ioani H, Șuşman S, Petrescu M, Timiș T, Cernea D, Kacsó G, Irimie A, Florian IS. *Functional and molecular characterization of glioblastoma multiforme-derived cancer stem cells.* J BUON. 2010 Jul-Sep;15(3):583-91.
  8. Șuşman S, Sorițău O, Rus-Ciucă D, Tomuleasa C, Pop VI, Mihiu CM. *Placental stem cell differentiation into islets of Langerhans-like glucagon-secreting cells.* Rom J Morphol Embryol. 2010;51(4):733-8.
  9. Orza A, Sorițău O, Olenic L, Diudea M, Florea A, Rus Ciucă D, Mihiu C, Casciano D, Biriș AS. *Electrically conductive gold-coated collagen nanofibers for placental-derived mesenchymal stem cells enhanced differentiation and proliferation.* ACS Nano. 2011;5(6):4490-503.
  10. Rus Ciucă D, Sorițău O, Șuşman S, Pop VI, Mihiu CM. *Isolation and characterization of chorionic mesenchymal stem cells from the placenta.* Rom J Morphol Embryol. 2011;52(3):803-8.

## PRESENTATIONS

1. A Runx2 Isoform as a Novel Type of Nuclear Protein Expressed at Specific Stages during Murine Spermatogenesis, 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 2006.
2. Mesenchymal Stem Cells in the Placenta – Isolation and Characteristics, “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy Days, December 2008 (awarded first prize in the Basic Research section).
3. Placenta Stem Cells: One Man’s Trash Is Another Man’s Treasure, presented at the International Course on Stem Cell Biology, during the 10<sup>th</sup> International Congress for Students and Young Doctors – MEDICALIS, May 2009.
4. Placenta Stem Cells, “Prof. Dr. Ion Chiricuță” Oncology Institute Days – 80 Years of Fight against Cancer, October 2009.
5. Hepatic and Pancreatic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Various Placental Structures, “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy Days, December 2009