

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT INTITULATĂ
„Utilizarea celulelor stem placentare în vederea obținerii
de progenitori pancreatici și neuronali”

Doctorand Asist. Univ. Șuşman Sergiu

Conducător de doctorat Prof. Dr. Pop Ioan Victor

Cuvinte cheie: celula stem, placenta, izolare, cultivare, caracterizare, diferențiere pancreatică, diferențiere neuronală

Cuprinsul tezei de doctorat

INTRODUCERE

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Celulele stem

- 1.1. Definiție și proprietăți
- 1.2. Tipuri și surse de celule stem
- 1.3. Utilizarea celulelor stem în terapie

2. Celulele stem placentare

- 2.1. Dezvoltarea embriologică și morfologia placentei
- 2.2. Tipuri de celule stem placentare
- 2.3. Studii preclinice și clinice care utilizează celulele stem placentare
- 2.4. Stocarea celulelor stem placentare

3. Terapia celulară a bolilor pancreatice și neurodegenerative

- 3.1. Terapia celulară a diabetului zaharat
- 3.2. Terapia celulară a bolilor neurodegenerative
 - 3.2.1. Tratamentul bolii Parkinson
 - 3.2.2. Tratamentul bolii Alzheimer

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Obiective

2. Studiul 1 – Izolarea și cultivarea celulelor stem placentare

- 2.1. Introducere
- 2.2. Ipoteza de lucru
- 2.3. Material și metodă
 - 2.3.1. Determinări virusologice și de cariotip
 - 2.3.2. Realizarea modelului experimental de izolare și cultivare a celulelor stem placentare
- 2.4. Rezultate
- 2.5. Discuții
- 2.6. Concluzii

3. Studiul 2 – Caracterizarea fenotipică, genetică și a expresiei HLA la nivelul celulelor stem placentare

- 3.1. Introducere
- 3.2. Ipoteza de lucru
- 3.3. Material și metodă
 - 3.3.1. Determinarea markerilor de suprafață ai celulelor
 - 3.3.2. Caracterizarea genotipică a celulelor mezenchimale izolate din placentă prin RT-PCR
 - 3.3.3. Tipizarea HLA
- 3.4. Rezultate
 - 3.4.1. Rezultate ale marcării imunocitochimice a celulelor derivate din membrana amniotică și corion
 - 3.4.2. Rezultate marcaj imunocitochimic la celulele stem mezenchimale izolate din membrana amniotică
 - 3.4.3. Rezultate marcaj imunocitochimic la celulele stem mezenchimale izolate din corion
 - 3.4.4. Rezultatele analizei exprimării markerilor de suprafață prin citometru de flux
 - 3.4.5. Rezultatele analizei exprimării genelor la nivel placentar prin RT-PCR
- 3.5. Discuții
- 3.6. Concluzii

4. Studiul 3 – Diferențierea *in vitro* a celulelor stem placentare spre progenitori pancreatici și neuronali

- 4.1. Introducere
- 4.2. Ipoteza de lucru
- 4.3. Material și metodă
 - 4.3.1. Diferențierea pancreatică

4.3.2. Co-cultura celulelor stem mezenchimale placentare cu celule adulte izolate din pancreas

4.3.3. Diferențierea pancreatică – metoda cu substrat și factori de creștere

4.3.4. Diferențierea dublă spre progenitori hepatici și pancreatici

4.3.5. Diferențierea neuronală

4.4. Rezultate

4.4.1. Caracterizarea genotipică a probelor cultivate în mediul de diferențiere pancreatic prin RT-PCR

4.4.2. Diferențierea neuronală

4.5. Discuții

4.6. Concluzii

5. Concluzii generale

6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

REFERINȚE

ANEXE

Introducere

Progresele făcute în ultimii ani în ceea ce privește izolarea, caracterizarea și diferențierea celulelor stem, au adus noi speranțe în dezvoltarea de terapii celulare ce pot fi utilizate în tratamentul unor boli considerate azi incurabile, ca diabetul zaharat de tip I și bolile neurodegenerative.

Entități biologice caracterizate printr-un fenotip funcțional particular, celulele stem pot, în funcție de sursa din care provin, să dea naștere unor celule diferențiate care odată introduse în organism preiau funcția celulelor distruse, corectând astfel modificările patologice apărute.

Făcând o paralelă între structura microscopică a măduvei roșii hematogene, în cadrul acestei teze de doctorat am încercat să demonstrăm că și *la nivelul placentei, pe lângă celule stem hematopoetice a căror utilitate clinică este azi bine definită, există celule stem în structurile vililor și ale membranelor amniotice ce ar putea fi folosite în viitor în practica clinică.*

O altă observație care a stat la baza studiului nostru este aceea că ectodermul amniotic, structură ce derivă din epiblast și dă naștere amniocitelor, are o *dezvoltare embriologică*

particulară care se oprește în ziua a 10a, ceea ce permite păstrarea unui fenotip nediferențiat util în obținerea de celule ce derivă din cele trei foițe embrionare.

Placenta umană reprezintă o structură cu o morfologie și funcție extrem de complexă, ce asigură dezvoltarea produsului de concepție pe parcursul sarcinii, conține celule care îndeplinesc o serie de cerințe necesare utilizării lor în terapia celulară.

Interfața utero-placentară este singurul exemplu de toleranță imunologică naturală dintre două organisme diferite (matern și fetal), acest lucru realizându-se atât datorită expresiei extrem de scăzute a moleculelor HLA, cât și a capacității placentei de a secreta molecule solubile care inhibă proliferarea și activarea LT. Acest fenomen este extrem de important în terapia celulară, în general și în particular în cazul bolilor autoimune ca de exemplu diabetul zaharat de tip I, în care nivelul scăzut de HLA protejează celulele transplantate față de reluarea atacului autoimun.

De asemenea, celulele mezenchimale placentare se găsesc în cantitate suficientă și sunt lipsite de orice probleme etice. Nu în ultimul rând, datorită stocării pe scară largă a sângelui placentar, există astăzi la nivel mondial rețele de bănci publice sau private care asigură infrastructura necesară stocării în vederea utilizării lor ulterioare.

Studiul 1 – Izolarea și cultivarea celulelor stem placentare

Pentru utilizarea acestor celule în viitor în practica clinică este nevoie de protocoale standardizate, care să asigure izolarea de o manieră reproductibilă a diferitelor populații celulare placentare, precum și evaluarea efectelor congelării și decongelării asupra proprietăților lor și a capacității lor de diferențiere. Asupra acestor aspecte ne-am concentrat atenția în primul studiu al acestei teze de doctorat, reușind să definim un protocol standard de izolare, să determinăm mediul optim pentru cultivarea și proliferarea lor și să evaluăm efectele congelării/decongelării la -80°C .

Studiul 2 – Caracterizarea fenotipică și genotipică

În al doilea studiu al tezei am realizat o caracterizare morfologică și moleculară a populațiilor celulare izolate. Acestea au prezentat markeri de pluripotentialitate caracteristici celulelor stem embrionare, Oct-3/4, Rex-1, Nanog și SCF, determinați atât la nivel de mRNA prin PCR, cât și la nivel proteic prin citometrie de flux și imunofluorescență. În ceea ce privește moleculele de histocompatibilitate de clasa II, celulele nu au prezentat expresia HLA-DR α , implicată în patogeneza diabetului zaharat de tip I, această absență păstrându-se și în cursul diferențierii.

Absența telomerazei (hTERT), moleculă prezentă la nivelul celulelor stem embrionare și a tumorilor maligne demonstrează că celulele placentare sunt lipsite de potențial tumorigen când sunt transplantate *in vivo*. O altă constatare la care ne așteptam, dat fiind faptul că avem de-a face cu celule stem mezenchimale, este prezența genei receptorului transmembranar CXCR4, molecula implicată în traficul celulelor stem normale la nivelul organismului.

Studiul 3 – Diferențierea *in vitro* a celulelor stem placentare spre progenitori pancreatici și neuronali

În ultima parte a tezei am evaluat capacitatea de diferențiere a celulelor stem placentare, prin aplicarea de diferite protocoale. Acestea au presupus utilizarea de combinații de factori de creștere, medii și substraturi (matrigel, chitosan, colagen sau laminină).

În ceea ce privește obținerea de progenitori pancreatici am aplicat un protocol în patru etape, esențială fiind variația concentrațiilor de glucoză și adăugarea în etapa finală a exendinului-4 și a nicotinamidei, cei mai puternici inductori spre fenotipul celular β cunoscuți azi. Am urmărit, de asemenea, comportamentul celulelor în funcție de substratul folosit, proveniența liniei celulare și etapa de diferențiere. În prima etapă celulele au prezentat o modificare de fenotip de la unul mezenchimal la unul epitelioid, pentru ca ulterior să se detașeze de pe suprafața vasului de cultură și să formeze agregate celulare asemănătoare insulelor lui Langerhans. Analiza moleculară a pus în evidență prezența mRNA a doi dintre factorii de transcripție esențiali pentru diferențierea pancreatică (Pdx1 și PAX4), dar și a glucagonului. La nivel proteic, insulina și glucagonul au fost puse în evidență prin imunofluorescență în ultima etapă a protocolului de diferențiere. Acest lucru arată că celulele stem izolate de la nivelul placentei sunt capabile să se transforme *in vitro*, în condiții speciale, în celule insulare.

Într-o etapă ulterioară, simulând *in vitro* condițiile din timpul embriogenezei, am reușit să punem la punct un protocol prin care celulele stem placentare pot fi diferențiate în progenitori comuni pancreatici și hepatici. Acest protocol de dublă diferențiere, plecând de la celule izolate de la nivelul placentei, este primul de acest fel din literatură și stă la baza demersurilor făcute de noi în vederea obținerii unui brevet de invenție.

Un experiment original a fost acela al co-cultivării celulelor placentare cu celule pancreatice adulte. Modificarea tranzitorie de fenotip și a expresiei genice arată faptul că micromediul celular în care sunt introduse *in vivo* influențează comportamentul lor când sunt transplantate.

Diferențierea spre progenitori neuronali, ultima etapă a actualei teze, a dat cele mai bune rezultate prin utilizarea acidului trans-retinoic pe un substrat de laminină.

Modificarea de morfologie spre structuri celulare asemănătoare neuronilor, cu numeroase prelungiri care se anastomozează, precum și expresia neurofilamentelor (NF) și a proteinei fibrilare gliale acide (GFAP), denotă capacitatea celulelor placentare de a da naștere unor progenitori ectodermici neuronali și gliali.

Toate aceste experimente relevă faptul că placenta umană este o sursă importantă de celule stem, care vor putea fi utilizate în viitor în terapia celulară a unor boli considerate azi ca fiind incurabile. Acest lucru poate fi luat în considerare de firmele care stochează la naștere sângele placentar, pentru ca în viitor să fie recoltate și alte structuri placentare ce conțin celule stem, precum villi corionici și membrana amniotică.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Acest studiu reprezintă primul de la noi din țară care a reușit izolarea, cultivarea, caracterizarea și diferențierea celulelor stem mezenchimale izolate de la nivelul placentei.

În acest scop am stabilit protocoale de izolare reproductibile, specifice fiecărei componente placentare și am definit mediul de cultivare optim al acestora.

În ceea ce privește caracterizarea celulelor izolate, acestea exprimă markerii clasici de pluripotențialitate Oct 3/4, Sox2 și Nanog. În plus, am pus în evidență absența expresiei HLA-DR α , o moleculă implicată în procesul de patogeneză al diabetului zaharat de tip I. Această absență, datorată proprietăților imunologice particulare ale placentei, necesare acceptării de către organismul matern, face ca celulele izolate de noi să scape atacului imun care duce la distrugerea celulelor β și apariția Dz de tip I. Obținerea de celule secretoare de insulină, plecând de la celule mezenchimale este de asemenea importantă, fiind cunoscut rolul modulator al acestui tip de celule asupra sistemului imunitar. Acest lucru este important în terapia celulară și de transplant, în general și, în mod special, în tratamentul bolilor autoimune.

O altă proprietate importantă ce a rezultat în urma caracterizării moleculare este absența hTERT, enzima ce controlează lungimea telomerelor. Prezentă în celulele embrionare și tumorale, aceasta determină proliferarea celulară necontrolată. Absența expresiei face ca celulele placentare să fie lipsite de riscul apariției proceselor tumorale în urma transplantării.

Pentru prima dată în literatură am realizat un experiment de co-cultivare a celulelor stem placentare, pentru evaluarea influenței micromediului celular asupra fenotipului celulelor transplantate.

Un alt experiment realizat pentru prima dată în literatură este definirea unui protocol de obținere *in vitro* a unor progenitori comuni pancreatici și hepatici din celule izolate de la nivelul placentei.

De asemenea, am reușit să obținem, pentru prima dată la noi în țară și printre pușinii în lume, celule secretoare de glucagon. Diferențierea neuronală s-a realizat printr-o combinație originală de factori de creștere și substrat, celulele progenitoare obținute constituind un model de studiu pentru evenimentele moleculare ce controlează diferențierea neuronală, dar și bolile neurodegenerative.

În experimentele realizate am arătat că stocarea celulelor la -80°C nu influențează capacitatea de proliferare și diferențiere.

Acest studiu reprezintă baza științifică pentru a recomanda în viitor stocarea la naștere a celulelor stem mezenchimale și amniotice, alături de cele din sângele placentar. Acestea vor putea fi utilizate pe parcursul vieții individului, în vederea tratării prin terapie celulară a unor boli considerate azi incurabile.

Curriculum vitae

Informații personale	<p>Nume / Prenume: Susman Valeriu Sergiu</p> <p>Adresă: Str. Stefan Luchian, nr.1 ap. 1, Cluj-Napoca</p> <p>E-mail : sergiu.susman@umfcluj.ro, serman_s@yahoo.com</p> <p>Nationalitate : romană</p> <p>Data nașterii: 06.08.1975</p> <p>Sex : Male</p>
Experiența academică	<p>2009-2011-Asistent universitar - disciplina Histologie, Coordonare lucrari de diploma si activitati stiintifice</p>
Experiența medicală	<p>2009- present Specialist in pathology</p> <p>2003-2008- Residency in pathology</p>
Experiența în cercetare	<p>Articole</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Cornel Iancu, Ioana R. Ilie, Carmen E. Georgescu, Razvan Ilie, Alexandru R. Biris, Teodora Mocan, Lucian C. Mocan, Florin Zaharie, Dana Todea-Iancu, Sergiu Susman, Dan Rus Ciuca, Alexandru S. Biris, Applications of Nanomaterials in Stem Cell Therapies and the Onset of Nanomedicine, Particulate Science and Technology, 27: 6, 562-574, 2009 2. Miha, CM. Miha D, Costin D. Rus Ciuca D, Susman S, Ciortea R Isolation and characterization of stem cells from the placenta and the umbilical cord, Romanian Journal of Morphology and Embryology 2008. 3. Ciprian Tomuleasa, Sergiu Susman, Olga Soritău, Vasile Foris, Emke Páll, Carmen Miha Primum Non Nocere. Is Stem Cell Research Ready For Clinical Trials? Journal of European Medical Student's Association on Medical and Scientific Affairs, 2009 4. Miha CM, Rus Ciucă D, Soritău O, Susman S, Miha D Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. Rom J Morphol Embryol. 2009 5. Ciprian Tomuleasa, Olga Soritau, Teodora Pop, Dan Rus Ciuca, Bogdan Pinteia, Daniela Todea, Sergiu Susman, Vasile Foris, Gabriel

- Kacso, Alexandru Irimie:” Isolation and in vitro propagation of hepatic cancer cells with stem cell properties from hepatocellular carcinoma”
Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases; 2010.
6. Ciprian Tomuleasa, Olga Sorițău, Dan Rus-Ciucă, Vasile Foris, Horațiu Ioani, **Sergiu Susman**, Magda Petrescu, Carmen Miha, Dana Cernea, Ioan Ștefan Florian, Gabriel Kacsó, Alexandru Irimie:”
Functional and molecular characterization of glioblastoma multiforme-derived brain cancer stem cells”, Journal of Balkan Union of Oncology, submitted for publication in 2010.
7. Ciprian Tomuleasa, **Sergiu Susman**, Olga Sorițău, Dan Rus Ciucă, Emőke Páll, Ioana Brie, The Basic Immunology of Stem Cell Trafficking and Cancer Metastasis, Romanian Journal of Radiotherapy and Medical oncology, 2009
8. Ciprian I Tomuleasa , Gabriel Kacsó , **Sergiu Susman** , Olga Sorițău , Alexandru Irimie , Piroska Virág, Cellular interactions in prostate cancer genesis and dissemination. Looking beyond the obvious, Journal of Cancer Education.
9. Ciprian Tomuleasa, **Sergiu Susman**, Olga Sorițău, Dan Rus-Ciucă, Rareș Buigă , Alexandru Irimie Colorectal Cancer Stem Cells, Romanian Journal of Radiotherapy and Medical oncology, 2010
10. Miha CM, **Sușman S**, Rus Ciucă D, Miha D, Costin N. Aspects of placental morphogenesis and angiogenesis. Rom J Morphol Embryol. 2009;50(4):549-57. Review.
11. Tomuleasa C, Soritau O, Fischer-Fodor E, Pop T, **Susman S**, Mosteanu O, Petrushev B, Aldea M, Acalovschi M, Irimie A, Kacso G. Arsenic trioxide plus cisplatin/interferon α -2b/doxorubicin/capecitabine combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. Hematol Oncol Stem Cell Ther. 2011 Second Quarter;4(2):60-66.
12. Soritau O, Tomuleasa C, Aldea M, Petrushev B, **Susman S**, Gheban D, Ioani H, Cosis A, Brie I, Irimie A, Kacso G, Florian IS. Metformin plus temozolomide-based chemotherapy as adjuvant treatment for WHO grade III and IV malignant gliomas. J BUON. 2011 Apr-Jun;16(2):282-9.
13. **Susman S**, Sorițău O, Rus-Ciucă D, Tomuleasa C, Pop VI, Miha

- CM. Placental stem cell differentiation into islets of Langerhans-like glucagon-secreting cells. Rom J Morphol Embryol. 2010;51(4):733-8.
14. **Susman Sergiu**, Olga Soritau, Dan Rus-Ciuca , Ciprian Tomuleasa, , Carmen Mihiu, Victor Ioan Pop Generation of pancreatic exocrine progenitor cells by co-culture of placental stem cells and adult tissue-specific cells. Working together is always the best way to go- acceptat pentru publicare Rom J Morphol Embryol 2011.
15. Tomuleasa C, Kacso G, Soritau O, **Susman S**, Petrushev B, Aldea M, Buiga R, Irimie A. The fundamental mechanisms of metastatic spread and chemotherapy resistance in lung cancer. Pneumologia. 2011 Apr-Jun;60(2):99-103.
16. Rus Ciucă D, Sorițău O, **Sușman 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.
17. Aldea M, Tomuleasa C, Petrushev B, **Susman S**, Kacso GI, Irimie A, Florian IS, Soritau O. Antidiabetic pharmacology: a link between metabolic syndrome and neuro-oncology? J BUON. 2011 Jul-Sep;16(3):409-13.
18. **Susman S**, Rus-Ciucă D, Sorițău O, Tomuleasa C, Buigă R, Mihiu D, Pop VI, Mihiu CM. Pancreatic exocrine adult cells and placental stem cells co-culture. Working together is always the best way to go. Rom J Morphol Embryol. 2011;52(3 Suppl):999-1004.
19. Tomuleasa C, Moșteanu O, **Susman S**, Cristea V. ALDH as a tumor marker for pancreatic cancer. J Gastrointest Liver Dis. 2011 Dec;20(4):443-4;
20. Petrushev B, Tomuleasa C, Soritau O, Aldea M, Pop T, **Susman S**, Kacso G, Berindan I, Irimie A, Cristea V. Metformin plus PIAF combination chemotherapy for hepatocellular carcinoma. Exp Oncol. 2012;34(1):17-24.
21. Ciprian Tomuleasa, Olga Soritau, Anamaria Orza, Mircea Ducea, Bobe Petrushev, Ofelia Mosteanu, **Sergiu Susman**, Adrian Florea, Eموke Pall, Mihaela Aldea, Gabriel Kacso, Victor Cristea, Ioana Berindan-Neagoe, Alexandru Irimie. Gold Nanoparticles Conjugated with

Cisplatin/Doxorubicin/Capecitabine Lower the Chemoresistance of Hepatocellular Carcinoma-Derived Cancer Cells J Gastrointest Liver Dis, June 2012 Vol. 21 No 2

Hirsch index 3 (Citări 31; Citări fără autocitări 25 ; Media citărilor pe articol 2.4).

Proiecte de cercetare

2007-2010 Celulele stem placentare- o alternativă pentru terapia celulară

2008-2011 Studiul vascularizației placentare cu ajutorul ecografiei 3D și 3D Doppler

2008-2011 Profilaxia cancerului colorectal prin generarea , testarea și modularea vaccinurilor pe baza de celule stem nediferențiate

2011-2014 Detectarea precoce a recăderilor în cancerul colorectal prin determinarea markerilor tumorali și imunologici în sangele periferic.

Brevete de invenție

Metodă de obținere *in vitro* a progenitorilor hepatici și pancreatici din celule stem placentare umane. (OSIM 126746 A0).

Premii

Premiul IWIS la Salonul Internațional de Inventică Cluj-Napoca 2011 pentru protocolul de obținere de progenitori pancreatici și hepatici utilizând celule stem izolate de la nivelul placentei

Premiul CNCSIS pentru articolul Applications of Nanomaterials in Stem Cell Therapies and the Onset of Nanomedicine, Particulate Science and Technology.

Premiul I Zilele UMF secțiunea poster discipline preclinice- „Izolarea și caracterizarea celulelor stem izolate de la nivelul placentei

Cărți

Coautor la cartea „ Patologia chirurgicală a glandei tiroide”, Editura Sincron, 2006 sub redacția Conf. dr. Alexandru Irimie

"The use of placental stem cells to obtain pancreatic and neuronal progenitors"

Assistant Professor Sergiu Susman

Prof. Ion Victor Pop Md, PhD

Keywords: stem cell, placenta, isolation, cultivation, characterization, pancreatic differentiation, neuronal differentiation

Thesis Summary

INTRODUCTION

CURRENT KNOWLEDGE

A. Stem cells

1.1. Definition and properties

1.2. Types and sources of stem cells

1.3. The use of stem cells in therapy

2. Placental stem cells

2.1. Embryological development and morphology of the placenta

2.2. Types of placental stem cells

2.3. Preclinical and clinical studies using placental stem cells

2.4. Storing placental stem cells

3. Cellular therapy of pancreatic and neurodegenerative diseases

3.1. Cell therapy of diabetes

3.2. Cell therapy of neurodegenerative diseases

3.2.1. Parkinson's disease

3.2.2. Treatment of Alzheimer's disease

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Objectives

2. 1st Study - Isolation and cultivation of placental stem cells

2.1. Introduction

2.2. Hypothesis

2.3. Means and methods

2.3.1. Virological and karyotype determination

2.3.2. Experimental model of isolation and cultivation of placental stem cells

2.4. Results

2.5. Discussion

2.6. Conclusions

3. 2nd Study -Characterization of phenotype, the genetics and HLA expression in the placental stem cells

3.1. Introduction

3.2. Hypothesis

3.3. Means and methods

3.3.1. Determination of cell surface markers

3.3.2. Genotypic characterization of mesenchymal cells isolated from placenta by RT-PCR

3.3.3. HLA typing

3.4. Results

3.4.1. Results of immunocytochemical marking of cells derived from amniotic membrane and chorion

3.4.2. Results immunohistochemistry marking the mesenchymal stem cells isolated from amniotic membrane

3.4.3. Results immunohistochemistry marking the mesenchymal stem cells isolated from chorion

3.4.4. The results of surface marker expression analysis by flow cytometer

3.4.5. The results of gene expression level analysis by RT-PCR placental

3.5. Discussion

3.6. Conclusions

4. 3rd Study - In vitro differentiation of placental stem cells into pancreatic and neuronal progenitors

4.1. Introduction

4.2. Hypothesis

4.3. Means and methods

4.3.1. Pancreatic differentiation

4.3.2. Co-culture of placental mesenchymal stem cells isolated from adult pancreatic cell

4.3.3. Pancreatic differentiation - method and growth substrate

4.3.4. Dual differentiation toward liver and pancreatic progenitors

4.3.5. Neuronal differentiation

4.4. Results

4.4.1. Genotypic characterization of samples grown in the area of pancreatic differentiation by RT-PCR

4.4.2. Neuronal differentiation

4.5. Discussion

4.6. Conclusions

5. General conclusions

6. Originality and innovative contributions of the thesis

REFERENCES

ATTACHMENTS

Introduction

Progress made in recent years in the isolation, characterization and differentiation of stem cells, have brought new hope in developing cell therapies that can be used to treat diseases now considered incurable, as type I diabetes and neurodegenerative diseases.

Stem cells, a biological entity characterized by a particular functional phenotype, give rise, depending on the source of origin, to differentiated cells which once introduced into the body take the function of pathological cells, thus correcting the pathological changes occurred.

Drawing a parallel between the microscopic structure of bone marrow , in this thesis we tried to demonstrate that in the placenta, in addition to hematopoietic stem cells whose clinical utility is now well defined, there are stem cells in the villi, the amniotic membrane and fluid, which could be used in future clinical practice.

Another observation on which our study was based is that ectodermal amniotic structure derived from the epiblast giving rise to amniocytes, has a particular embryological development which stops on day 10, which allows to maintain an undifferentiated phenotype in obtaining useful cells derived from the three embryonic sheets.

Human placenta is a structure with an extremely complex morphology and function , ensuring development of the fetus during pregnancy, containing cells that meet specific requirements necessary for their use in cell therapy.

Uteroplacental interface is the only example of natural immunological tolerance between two different bodies (maternal and fetal), due to very low expression of HLA molecules and the placental capacity to secrete soluble molecules that inhibit proliferation and TL activation. This is

extremely important in cell therapy in general, and particularly in autoimmune diseases such as diabetes mellitus type I, in which the low level of HLA protects transplanted cells from the autoimmune attack.

Also, placental mesenchymal cells are found in sufficient quantity and rise no ethical issues. Finally, due to large-scale storage of cord blood, there are nowadays worldwide networks of public and private banks that provide the infrastructure required for storage and later use.

1st Study - Isolation and cultivation of placental stem cells

In order to use these cells in future clinical practice standardized protocols are necessary, to ensure isolation of a reproducible manner of different placental cell populations and to evaluate the effects of freezing and defreezing on their properties and their ability to differentiate. On these issues we focused in the first study of this thesis, managing to define a standard protocol for isolation, to determine the optimum medium for the cultivation and proliferation and to evaluate the effects of freezing / defreezing at -80°C .

2nd Study- Phenotypic and genotypic characterization

In the second study of this thesis we made a morphological and molecular characterization of isolated cell populations. These presented markers of pluripotentiality specific to embryonic stem cells, Oct-3/4, Rex-1, Nanog and SCF, as determined by PCR in the mRNA and in the proteins by flow cytometry and immunofluorescence. In terms of class II histocompatibility molecules, cells showed no expression of HLA-DR α involved in the pathogenesis of type I diabetes, its absence is maintained during differentiation also. The absence of telomerase (hTERT), a molecule present in embryonic stem cells and malignant tumors, demonstrates that placental cells lack tumorigenic potential when transplanted in vivo. Another finding that we expected, given that we are dealing with mesenchymal stem cells, is the presence of transmembrane receptor gene CXCR4 molecule involved in trafficking of normal stem cells in the body.

3rd Study - In vitro differentiation of placental stem cells into pancreatic and neuronal progenitors

In the last part of the thesis we evaluated the differentiation capacity of placental stem cells, by applying different protocols. This assumed the use of combinations of growth factors, medium and substrate (Matrigel, chitosan, collagen or laminin).

In order to obtain pancreatic progenitors we applied a protocol in four steps, variations in concentrations of glucose and adding in the final stage exendin-4 and nicotinamide, the most potent inducers for β cell phenotype known today, being essential. We also looked at the behavior of cells depending on the substrate used, the origin of cell line and stage of differentiation. In the first stage cells showed a change from a mesenchymal phenotype an epithelioid one, and later they detached from the culture vessel surface and formed islands of Langerhans-like cell aggregates. Molecular analysis revealed the presence of mRNA, of two transcription factors essential for pancreatic differentiation (Pdx1 and PAX4), and glucagon. At the protein level, insulin and glucagon have been revealed by immunofluorescence in the last stage of the differentiation protocol. This shows that stem cells isolated from the placenta are able to transform in vitro under special conditions into cell island.

Într-o etapă ulterioară, simulând *in vitro* condițiile din timpul embriogenezei, am reușit să punem la punct un protocol prin care celulele stem placentare pot fi diferențiate în progenitori comuni pancreatici și hepatici. Acest protocol de dublă diferențiere, plecând de la celule izolate de la nivelul placentei, este primul de acest fel din literatură și stă la baza demersurilor făcute de noi în vederea obținerii unui brevet de invenție.

In a later stage, simulating in vitro conditions during embryogenesis, we managed to obtain a protocol to differentiate placental stem cells into pancreatic and liver progenitors . This dual differentiation protocol, based on isolated cells from the placenta, is the first of its kind in the literature and it underlying measures taken by us to obtain a patent.

An original experiment was the co-cultivation of placental cells with adult pancreatic cells. Transient change of phenotype and gene expression suggests that cellular microenvironment into which they are put influence their behavior in vivo when transplanted.

Differentiation to neuronal progenitors, the last stage of the present thesis, gave the best results using trans-retinoic acid on a laminin substrate.

Change of morphology to cellular structures like neurons, with numerous extensions that creates anastomosis and neurofilaments (NF) and glial fibrillar acidic protein (GFAP) expression, show the ability of placental cells to give rise to neuronal and glial ectodermal progenitors.

All these experiments show that human placenta is an important source of stem cells that can be used in future cell therapy of diseases considered as incurable today. This can be taken into account by companies that store cord blood at birth, in order to harvest in the future other placental structures containing stem like cells chorionic villi and amniotic membrane.

Originality and innovative contributions of the thesis

This study is the first in our country that has managed to isolate, cultivate, characterize and differentiate of mesenchymal stem cells isolated from the placenta.

In order to achieve this, we have established protocols for reproducible isolation, specific for each placental component, and have defined their optimal growing environment.

Regarding the characterization of single cells, they express classical markers of pluripotentiality Oct 3/4, Sox2 and Nanog. In addition, we revealed the absence of expression of HLA-DR α , a molecule involved in the pathogenesis of diabetes mellitus type I. Its absence, due to the particular immunological properties of the placenta, necessary for the maternal acceptance of the fetus makes the cells isolated by us to escape immune attack that leads to destruction of β cells and the appearance Dz type I. Obtaining insulin-secreting cells from mesenchymal cells is also important, being well known the modulator role of this type of immune cells. This is important in cell therapy and transplantation in general and specifically in the treatment of autoimmune diseases

Another important property that results from molecular characterization is the absence of hTERT, the enzyme that controls the length of telomers. Present in embryonic and tumor cells, it causes uncontrolled cell proliferation. Absence of placental expression causes cells to be free of risk of generating tumors following transplantation.

For the first time in literature we conducted an experiment by co-cultivation of placental stem cells, to assess the cellular microenvironment influence the phenotype of transplanted cells.

Another experiment conducted for the first time in literature is to define a protocol for in vitro obtaining of common pancreatic and liver progenitors from cells isolated from the placenta.

We also managed to obtain, for the first time in our country and among the few in the world, glucagon-secreting cells. Neuronal differentiation has been achieved through an original combination of growth factors and substrate, the progenitor cells obtained being a model to study molecular events that control neuronal differentiation, and neurodegenerative diseases.

The experiments have shown that storage at -80 ° C cells does not influence proliferation and differentiation capacity.

This study is the scientific basis for recommending future storage at birth of amniotic and mesenchymal stem cells, with the placental blood. They can be used in cell therapy for treatment of diseases considered today incurable.

Curriculum vitae

Personal information	<p>First name Surname : Susman Valeriu Sergiu</p> <p>Address: Str. Stefan Luchian, nr.1 ap. 1, Cluj-Napoca</p> <p>E-mail : sergiu.susman@umfcluj.ro, serman_s@yahoo.com</p> <p>Nationality : romanian</p> <p>Date of birth : 06.08.1975</p> <p>Gender : Male</p>
Academic Experience	<p>2009-2011- Assistant professor, University of Medicine and Pharmacy, Morphology Department</p>
Medical Experience	<p>2009- present Specialist in pathology</p> <p>2003-2008- Residency in pathology</p>
Research Experience	<p>Articles</p> <p>1. Cornel Iancu, Ioana R. Ilie, Carmen E. Georgescu, Razvan Ilie, Alexandru R. Biris, Teodora Mocan, Lucian C. Mocan, Florin Zaharie, Dana Todea-Iancu, Sergiu Susman, Dan Rus Ciuca, Alexandru S. Biris, Applications of Nanomaterials in Stem Cell Therapies and the Onset of Nanomedicine, Particulate Science and Technology, 27: 6, 562-574, 2009</p> <p>2. MiHu, CM. MiHu D, Costin D. Rus Ciuca D, Susman S, Ciortea R Isolation and characterization of stem cells from the placenta and the umbilical cord, Romanian Journal of Morphology and Embryology 2008.</p> <p>3. Ciprian Tomuleasa, Sergiu Susman, Olga Sorit�au, Vasile Foris, Em ke P�all, Carmen MiHu Primum Non Nocere. Is Stem Cell Research Ready For Clinical Trials? Journal of European Medical Student's Association on Medical and Scientific Affairs, 2009</p> <p>4. MiHu CM, Rus Ciuc� D, Sorit�au O, Susman S, MiHu D Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. Rom J Morphol Embryol. 2009</p> <p>5. Ciprian Tomuleasa, Olga Soritau, Teodora Pop, Dan Rus Ciuca, Bogdan Pintea, Daniela Todea, Sergiu Susman, Vasile Foris, Gabriel Kacso, Alexandru Irimie:” Isolation and in vitro propagation of hepatic cancer cells with stem cell properties from hepatocellular carcinoma” Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases; 2010.</p>

6. Ciprian Tomuleasa, Olga Sorițău, Dan Rus-Ciucă, Vasile Foris, Horațiu Ioani, **Sergiu Susman**, Magda Petrescu, Carmen Mihiu, Dana Cernea, Ioan Ștefan Florian, Gabriel Kacsó, Alexandru Irimie:” Functional and molecular characterization of glioblastoma multiforme-derived brain cancer stem cells”, Journal of Balkan Union of Oncology, submitted for publication in 2010.
7. Ciprian Tomuleasa, **Sergiu Susman**, Olga Sorițău, Dan Rus Ciucă, Emöke Páll, Ioana Brie, The Basic Immunology of Stem Cell Trafficking and Cancer Metastasis, Romanian Journal of Radiotherapy and Medical oncology, 2009
8. Ciprian I Tomuleasa , Gabriel Kacsó , **Sergiu Susman** , Olga Sorițău , Alexandru Irimie , Piroska Virág, Cellular interactions in prostate cancer genesis and dissemination. Looking beyond the obvious, Journal of Cancer Education.
9. Ciprian Tomuleasa, **Sergiu Susman**, Olga Sorițău, Dan Rus-Ciucă, Rareș Buigă , Alexandru Irimie Colorectal Cancer Stem Cells, Romanian Journal of Radiotherapy and Medical oncology, 2010
10. Mihiu CM, **Sușman S**, Rus Ciucă D, Mihiu D, Costin N. Aspects of placental morphogenesis and angiogenesis. Rom J Morphol Embryol. 2009;50(4):549-57. Review.
11. Tomuleasa C, Soritau O, Fischer-Fodor E, Pop T, **Susman S**, Mosteanu O, Petrushev B, Aldea M, Acalovschi M, Irimie A, Kacso G. Arsenic trioxide plus cisplatin/interferon α -2b/doxorubicin/capecitabine combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. Hematol Oncol Stem Cell Ther. 2011 Second Quarter;4(2):60-66.
12. Soritau O, Tomuleasa C, Aldea M, Petrushev B, **Susman S**, Gheban D, Ioani H, Cosis A, Brie I, Irimie A, Kacso G, Florian IS. Metformin plus temozolomide-based chemotherapy as adjuvant treatment for WHO grade III and IV malignant gliomas. J BUON. 2011 Apr-Jun;16(2):282-9.
13. **Susman 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.
14. **Susman Sergiu**, Olga Soritau, Dan Rus-Ciucă , Ciprian Tomuleasa ,

Carmen Mihiu, Victor Ioan Pop Generation of pancreatic exocrine progenitor cells by co-culture of placental stem cells and adult tissue-specific cells. Working together is always the best way to go- acceptat pentru publicare Rom J Morphol Embryol 2011.

15. Tomuleasa C, Kacso G, Soritau O, **Susman S**, Petrushev B, Aldea M, Buiga R, Irimie A. The fundamental mechanisms of metastatic spread and chemotherapy resistance in lung cancer. Pneumologia. 2011 Apr-Jun;60(2):99-103.

16. Rus Ciucă D, Sorițău O, **Susman 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.

17. Aldea M, Tomuleasa C, Petrushev B, **Susman S**, Kacso GI, Irimie A, Florian IS, Soritau O.Antidiabetic pharmacology: a link between metabolic syndrome and neuro-oncology? J BUON. 2011 Jul-Sep;16(3):409-13.

18. **Susman S**, Rus-Ciucă D, Sorițău O, Tomuleasa C, Buigă R, Mihiu D, Pop VI, Mihiu CM. Pancreatic exocrine adult cells and placental stem cells co-culture. Working together is always the best way to go. Rom J Morphol Embryol. 2011;52(3 Suppl):999-1004.

19. Tomuleasa C, Moșteanu O, **Susman S**, Cristea V. ALDH as a tumor marker for pancreatic cancer. J Gastrointestin Liver Dis. 2011 Dec;20(4):443-4;

20. Petrushev B, Tomuleasa C, Soritau O, Aldea M, Pop T, **Susman S**, Kacso G, Berindan I, Irimie A, Cristea V. Metformin plus PIAF combination chemotherapy for hepatocellular carcinoma. Exp Oncol. 2012;34(1):17-24.

21. Ciprian Tomuleasa, Olga Soritau, Anamaria Orza, Mircea Dudea, Bobe Petrushev, Ofelia Mosteanu, **Sergiu Susman**, Adrian Florea, Eموke Pall, Mihaela Aldea, Gabriel Kacso, Victor Cristea, Ioana Berindan-Neagoe, Alexandru Irimie. Gold Nanoparticles Conjugated with Cisplatin/Doxorubicin/Capecitabine Lower the Chemoresistance of Hepatocellular Carcinoma-Derived Cancer Cells J Gastrointestin Liver Dis, June 2012 Vol. 21 No 2

Hirsch index 3 (Citing Articles 31; Citing Articles without self-citations 25 ; Average Citations per Item 2.4).

Grants

2007-2010 Placental stem cells – an alternative for cell therapy

2008-2011 The study of placental vascularisation using 3D ultrasonography and 3D Power Doppler

2008-2011 Colorectal cancer prophylaxis using embryonic stem cells

2008-2011 The prophylaxis of colo-rectal cancer by generating, modulating and testing of vaccines based on undifferentiated stem cells

2011-2014 Early detection of post-therapeutic relapses of colorectal adenocarcinoma by tumoral and immunological markers follow-up in peripheral blood

Patents

In vitro obtaining of both liver and pancreatic progenitors from stem cells isolated from the human placenta (OSIM 126746 A0).

Awards

IWIS Medal at the International Inventory Meeting Cluj-Napoca 2011
Cncsis award for the article - Applications of Nanomaterials in Stem Cell Therapies and the Onset of Nanomedicine, Particulate Science and Technology

First place UMF University local symposium on research for „Placental stem cells isolation and characterisation”

Books

Co-author „Patologia chirurgicala a glandei tiroide”, Sincron Publishing, 2006 under the supervising of Associate Professor Alexandru Irimie