

Attività di Ricerca

L'attività del Laboratorio verte sulle seguenti linee:

Cellule Staminali Emopoietiche (HSC): Valutazione dell'espressione dei geni che presiedono al self-renewal (staminalità) prima e dopo trapianto, ricostituzione dei progenitori emopoietici in soggetti adulti e pediatrici.

Il successo del trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche è dovuto alla loro capacità ripopolativa. Tuttavia diverse evidenze scientifiche indicano che questa espansione forzata porta ad una perdita parziale della loro capacità di autorinnovamento.

Questo studio utilizza il modello trapiantologico per rispondere alle seguenti domande:

l'espressione genica delle cellule staminali viene modificata col trapianto ed in caso affermativo, per quanto tempo? Quali geni sono coinvolti? Queste modifiche sono influenzate dal tessuto trapiantato (i.e. CB o BM) e/o dall'età del ricevente? Le Cellule Staminali Emopoietiche invecchiano dopo trapianto?

Nello studio saranno utilizzate cellule CD34+ selezionate da sangue cordonale e sangue midollare di soggetti adulti e pediatrici normali utilizzati come controlli. Verranno poi selezionate cellule CD34 di pazienti (adulti e bambini) trapiantati con BM o CB a diversi intervalli dal trapianto (+30,+ 90, +180, +360 giorni).

Verrà valutata l'espressione genica (tramite low-densityTaqMan-basedCARDs) di geni selezionati coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, nella proliferazione, differenziazione e self-renewal.

Inoltre sarà valutata l'influenza del microambiente in relazione all'età del ricevente ed alla fonte del trapianto (CB o BM).

Con questo studio ci proponiamo di individuare i geni coinvolti nell'espansione delle cellule staminali emopoietiche nella fase di ripopolamento dopo trapianto; di scoprire eventuali differenze, a seconda che le cellule trapiantate siano di sangue cordonale o midollare; infine di studiare quali fattori legati all'età del microambiente possano influenzare il comportamento dei progenitori trapiantati.

Ontogenesi del sistema emato-linfopoietico: Valutazione fenotipica e funzionale dei progenitori emopoietici e non emopoietici nel sangue e nel funicolo cordonale di neonati a termine e pre-termine.

Lo sviluppo fisiologico del sistema emopoietico nell'uomo prima della nascita è ad oggi, poco studiato. Non sono note le caratteristiche funzionali e quantitative dei progenitori emopoietici, così come sono sconosciuti la composizione di una eventuale "nicchia emopoietica" e dei meccanismi citochine e/o antigene- mediato che regolino la circolazione delle cellule staminali ed il loro "homing" all'interno dell'organismo.

Il neonato pre-termine, costituisce in questo ambito una buona opportunità di studio attraverso la raccolta del sangue cordonale al momento della nascita. Infatti analizzando la composizione e le proprietà del sangue cordonale di neonati a diversi stadi di immaturità potremmo ricostruire, almeno in parte, lo sviluppo dell'emopoiesi nelle fasi finali della vita fetale. Inoltre, pur essendo noto che nel sangue cordonale sono presenti diverse tipologie cellulari (MSC= cellule staminali mesenchimali; EPC= progenitori endoteliali; USSC= Cellule Staminali Somatiche) oltre a quelle emopoietiche, non si conosce la composizione "staminale" del sangue cordonale di neonati pre-termine.

Questo studio si propone di valutare i seguenti punti:

1) Caratterizzazione e quantificazione dei progenitori emopoietici e non emopoietici nel sangue cordonale di neonati pre-termine rispetto ai precursori presenti nel sangue cordonale di neonati a termine; espressione dei geni "stemness"; molecole di adwsiow.

2) Isolamento, caratterizzazione di Cellule Staminali Mesenchimali (MSC) provenienti da funicolo di neonati pre-termine ed a termine; la capacità espansiva in vitro delle due popolazioni verrà valutata quantitativamente.

Verrà inoltre valutato il contenuto proteico delle microvescicole rilasciate dalle cellule.

3) Valutazione di un possibile utilizzo clinico autologo dei progenitori presenti nei tessuti fetali (sangue cordonale e funicolo).

Inoltre sarà studiata la composizione dei diversi subset linfocitari presenti nel sangue cordonale per valutare la immuno-competenza del neonato pre-termine

□ Microambiente: Isolamento, caratterizzazione fenotipica e funzionale ed espansione di cellule mesenchimali staminali da diversi tessuti.

Le cellule mesenchimali staminali sono cellule multipotenti in grado di differenziare attraverso "lineage" cellulari diversi quali la condrogenesi, l'osteogenesi e l'adipogenesi con alcune caratteristiche comuni quali l'aderenza alla plastica da coltura, una morfologia fibroblasto-simile ed una capacità proliferativa a lungo termine ex-vivo. Immunofenotipicamente, tali cellule non esprimono i marcatori ematopoietici ed endoteliali (CD11c, CD31 and CD45) ma presentano sulla loro superficie altri antigeni quali CD90 (Thy-1), CD105 (endogлина), (CD73) e STRO-1.

Le cellule mesenchimali staminali possono venire isolate da differenti tessuti. Il gruppo, oltre ad avere una consolidata esperienza di espansione di cellule mesenchimali staminali da diversi tessuti (sangue midollare e liquido amniotico), ha dimostrato in un progetto clinico di fase I, l'effetto immunomodulante nel trattamento della malattia trapianto verso ospite resistente agli steroidi. Gli studi in corso mirano a comprendere la funzione di queste cellule nel funicolo cordonale. Studiando le citochine che queste cellule producono e le microvescicole che rilasciano nel sangue del neonato si potrebbe ottenere informazioni sulla composizione della nicchia embrionale e sui meccanismi che la regolano.

Valutazione dei cambiamenti metabolici in cellule staminali mesenchimali isolate da cordone ombelicale di bambini nati pretermine o a termine.

L'energia chimica è fondamentale per ogni processo cellulare. Due sono le principali fonti di energia chimica: la glicolisi, tipica del metabolismo anaerobico, e la fosforilazione ossidativa, che si verifica solo in condizioni aerobiche.

Recentemente, analizzando il metabolismo energetico di nano-vescicole, esosomi, isolati da cellule staminali mesenchimali (MSC) derivate da cordone ombelicale di neonati pretermine e termine, abbiamo osservato che solo quelle derivate dal cordone di bambini nati a termine sono in grado di produrre energia attraverso il metabolismo aerobico, mentre gli esosomi pretermine presentano un metabolismo principalmente glicolitico. Questi dati suggeriscono la presenza di un interruttore metabolico che permette il cambiamento da metabolismo anaerobico ad aerobico durante lo sviluppo fetale, il quale, se incompleto, può contribuire a peggiorare le condizioni patologiche associate alla nascita prematura.

Perciò, gli scopi del progetto sono:

- Confrontare il metabolismo energetico delle MSC isolate da cordone ombelicale di bambini nati a termine o pretermine per valutare a quale età gestazionali avvenga il cambiamento da metabolismo anaerobico ad aerobico.
- Valutare la produzione di stress ossidativo associato ai cambiamenti metabolici.

- Valutare il ruolo dell'immatunità del metabolismo nell'insorgere delle complicanze associate alla nascita prematura, al fine di individuare i marcatori biochimici e molecolari utili per sviluppare nuove strategie per migliorare la sopravvivenza dei neonati prematuri.

Valutazione dello stato energetico e dello stress ossidativo cellulare come marcatore di invecchiamento precoce nei Pazienti sopravvissuti ad un cancro infantile.

Sebbene il tasso di sopravvivenza dei tumori pediatrici sia migliorato notevolmente negli ultimi decenni, i pazienti sopravvissuti ad un cancro infantile (PSCI) presentano un rischio maggiore di sviluppare un secondo tumore e malattie croniche associate all'invecchiamento. Inoltre la comparsa di queste patologie sembra verificarsi prima del previsto, portando a supporre questi Pazienti a rischio di invecchiamento precoce. Perciò lo scopo di questo progetto è quello di individuare dei marcatori predittivi dello stato di "invecchiamento precoce" nei PSCI.

Considerando che l'invecchiamento è sempre associato ad un disequilibrio tra la produzione di stress ossidativo e le capacità antiossidanti della cellula [5], la nostra attenzione si è focalizzata sulla valutazione della funzionalità dei sistemi cellulari coinvolti nella produzione e detossificazione dello stress ossidativo. E' noto che il mitocondrio, la "centrale energetica" della cellula, sia una delle principali fonti di stress ossidativo cellulare, producendo la maggiore quantità di specie reattive dell'ossigeno (ROS), attraverso la fosforilazione ossidativa (OXPHOS). In condizioni fisiologiche, l'attività dell'OXPHOS determina una limitata produzione di stress ossidativo che viene bilanciato dalle difese antiossidanti cellulari. In stati patologici invece la respirazione cellulare e la relativa produzione di ROS aumentano notevolmente tanto che le difese antiossidanti non sono più in grado di contrastarli. Questa condizione provoca diversi danni alla cellula colpendo prevalentemente i lipidi delle membrane e il DNA, causando l'invecchiamento cellulare e quindi invecchiamento.

Come modello di studio sono state scelte le cellule mononucleate isolate da sangue periferico dei PSCI. Questa scelta è stata fatta sia perché il campione biologico su cui eseguire i test è di facile reperibilità, senza rischi per il Paziente, sia perché molti riferimenti bibliografici riportano come le cellule del sangue siano un ottimo modello per valutare lo stress ossidativo di tutto l'organismo.

Perciò, in questo progetto si valuteranno:

- La funzionalità dell'OXPHOS e lo stato energetico cellulare
- I livelli di stress ossidativo, analizzando la produzione di H₂O₂ e lo stato di perossidazione lipidica nelle cellule mononucleate isolate da sangue periferico, e lo stato ossidativo generale nel plasma dei Pazienti
- Le capacità antiossidanti cellulari, verificando le concentrazioni endocellulari di NADPH/NADP e di Glutazione ridotto/Glutazione ossidato (GSH/GSSG), e l'espressione e la funzione di alcuni enzimi antiossidanti: SOD, Catalasi, Glutationeperossidasi (GPx) e Glutazione Transferasi (GST).