



ACADEMIA ROMÂNĂ

Școala de Studii Avansate a Academiei Române

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**IDENTIFICAREA ȘI UTILIZAREA FACTORILOR SECRETAȚI DE
CELULE CU ORIGINE MEZENCHIMALĂ ÎN TERAPIA
RĂNILOR CUTANATE: STUDII *IN VITRO* ȘI *IN VIVO***

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

Acad. Maya Simionescu

DOCTORAND:

Daniela-Mădălina Iacomî (Ghețu)

București

2025

Cuvinte-cheie: răni cutanate cronice, medicină regenerativă, celule stromale mezenchimale, imortalizare, fibroblaste, secretom, cultura tridimensională, vindecarea rănilor, re-epitelizare, angiogeneză

Număr total de pagini – 249

Număr de figuri în Partea I – 15

Număr de tabele în Partea I – 5

Număr de figuri în Partea a II-a – 99

Număr de tabele în Partea a II-a – 3

Număr de referințe bibliografice – 338

Lucrări publicate în jurnale internaționale indexate ISI în perioada stagiului de doctorat – 4 (3 în calitate de autor principal, una în calitate de co-autor)

Număr de lucrări în pregătire – 2 (autor principal)

Capitole de carte – 1

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale – 2

Postere prezentate la manifestări științifice naționale și internaționale – 7 (3 în calitate de autor principal)

Stagii internaționale efectuate în timpul programului doctoral – 1

Participări la cursuri și seminarii în perioada stagiului de doctorat – 7

Premierea de către UEFISCDI a rezultatelor cercetării: 2

Brevete naționale înregistrate – 1 (depus)

Burse obținute în cadrul programului de formare doctorală și finanțarea activității de cercetare – 2 (bursă doctorală de la Academia Română, bursă de la Ministerul Educației pentru un stagiul internațional de cercetare)

Participarea la granturi de cercetare naționale – 4

Participarea la granturi de cercetare internaționale – 2

CUPRINS

LISTĂ DE ABREVIERI	9
INTRODUCERE ȘI OBIECTIVELE GENERALE ALE TEZEI.....	14
I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	18
I.1. RĂNILLE CUTANATE: FUNDAMENTE ANATOMICE, FIZIOLOGICE ȘI ABORDĂRI TERAPEUTICE ACTUALE	19
I.1.1. Structura și fiziologia pielii.....	19
I.1.1.1. Epidermă.....	20
I.1.1.2. Derm	24
I.1.1.3. Hipoderm	27
I.1.1.4. Structurile anexe ale pielii.....	27
I.1.2. Etapele vindecării rănilor cutanate.....	29
I.1.2.1. Hemostaza.....	30
I.1.2.2. Inflamația.....	32
I.1.2.3. Proliferarea.....	33
I.1.2.4. Remodelarea	34
I.1.3. Perturbarea procesului fiziologic de vindecare în cazul rănilor cronice cutanate	34
I.1.4. Abordări terapeutice actuale ale rănilor cronice cutanate	37
I.2. CONTRIBUȚIA SECRETOMULUI PROVENIT DE LA CELULELE STROMALE MEZENCHIMALE (MSC) ÎN PROCESUL DE VINDECARE AL RĂNILOR CUTANATE.....	41
I.2.1. Caracteristicile MSC	41
I.2.2. Compoziția secretomului provenit de la MSC	43
I.2.2.1. Factori solubili.....	44
I.2.2.2. Vezicule extracelulare	46
I.2.3. Metode de îmbunătățire a activității secretomului.....	48
I.2.3.1. Cultura celulelor în condiții hipoxice	49
I.2.3.2. Cultura tridimensională (3D) a celulelor	51
I.2.3.3. Tratamentul celulelor cu diverse molecule inflamatorii.....	54
I.2.4. Secretomul provenit de la MSC – o potențială terapie pentru rănille cutanate	55
I.3. UTILIZAREA FIBROBLASTELOR CA ALTERNATIVĂ A MSC	59

I.3.1. Similitudinea dintre fibroblaste și MSC	59
I.3.2. Utilizarea secretomului provenit de la fibroblaste în terapia rănilor cutanate..	
.....	60
I.3.2.1. Studii <i>in vitro</i>	60
I.3.2.2. Studii <i>in vivo</i>	67
I.4. METODE PENTRU OBTINEREA UNEI SURSE INEPUIZABILE DE CELULE MEZENCHIMALE	69
I.4.1. Imortalizarea celulelor mezenchimale.....	69
I.4.2. Obținerea celulelor mezenchimale din celule stem pluripotente induse.....	77
II. CONTRIBUȚII ORIGINALE	80
II.1. OBTINEREA ȘI CARACTERIZAREA MSC UMANE DERIVATE DIN MĂDUVA OSOASĂ ȘI DIN ȚESUTUL ADIPOS, PRECUM ȘI A FIBROBLASTELOR DERMALĂ UMANE PRIMARE SAU OBTINUTE DIN CELULE STEM PLURIPOTENTE INDUSE UMANE.....	81
II.1.1. Introducere și obiective.....	81
II.1.2. Materiale și metode.....	81
II.1.2.1. Izolarea MSC umane din măduva osoasă	81
II.1.2.2. Izolarea MSC umane din țesutul adipos	82
II.1.2.3. Izolarea fibroblastelor dermale primare.....	83
II.1.2.4. Obținerea fibroblastelor dermale prin diferențierea celulelor stem pluripotente induse umane	84
II.1.2.5. Microscopia electronică de transmisie (TEM).....	85
II.1.2.6. Analiza imunofenotipică prin tehnica de citometrie în flux	86
II.1.2.7. Imagistică de fluorescență	87
II.1.2.8. Analiza potențialului de diferențiere către linia adipogenă, osteogenă și condrogenă	88
II.1.3. Rezultate	88
II.1.3.1. Obținerea culturilor pure de MSC primare umane derivate din măduva osoasă și din țesutul adipos, precum și de fibroblaste dermale umane primare	88
II.1.3.2. În cultură, MSC primare umane derivate din măduva osoasă și din țesutul adipos, precum și fibroblastele dermale umane primare exprimă markerii celulari de suprafață specifici și au potențial de diferențiere către linia adipogenică, osteogenă și condrogenică	92
II.1.3.3. Caracterizarea fibroblastelor dermale obținute prin diferențierea celulelor stem pluripotente induse umane	94

II.1.4. Discuții și concluzii parțiale.....	98
II.2. TESTAREA <i>IN VITRO</i> A SECRETOMULUI PROVENIT DE LA O LINIE IMORTALIZATĂ DE MSC DERIVATE DIN ȚESUT ADIPOS (ADSC) URMĂRIND EFECTUL ASUPRA PROCESELOR IMPLICATE ÎN VINDECAREA RĂNILOR CUTANATE.....	99
II.2.1. Introducere și obiective.....	99
II.2.2. Materiale și metode	100
II.2.2.1. Culturi celulare	100
II.2.2.2. Design experimental pentru obținerea subpopulației clonale de ADSC101	
II.2.2.3. Cinetica proliferării celulare	102
II.2.2.4. Teste de diferențiere multilinie	102
II.2.2.5. Cariotiparea subpopulației clonale de celule imortalizate.....	103
II.2.2.6. Analiza expresiei proteice prin Western Blot.....	104
II.2.2.7. Producerea, colectarea și păstrarea secretomului	104
II.2.2.8. Testarea viabilității celulare.....	104
II.2.2.9. Testarea proliferării celulare	105
II.2.2.10. Evaluarea migrării celulare prin metoda zgârierii monostratului celular („Scratch test”)	105
II.2.2.11. Evaluarea în timp real a chemotaxiei folosind sistemul xCELLigence... ..	105
II.2.2.12. Testul capacității de angieneză pe Matrigel	106
II.2.2.13. Detectia factorilor angiogeni utilizând kit-ul Angiogenesis Array... ..	106
II.2.2.14. Evaluarea re-epitelizării utilizând un model <i>in vitro</i> de cultură organotipică.....	106
II.2.2.15. Colorația Hematoxilină-Eozină.....	107
II.2.2.16. Analiza statistică	107
II.2.3. Rezultate.....	107
II.2.3.1. Caracterizarea subpopulației clonale de ADSC imortalizate cu hTERT.. ..	107
II.2.3.2. Factorii eliberați în secretom (mediul condiționat) de către subpopulația clonală de ADSC transduse cu hTERT au o capacitate mare de a susține viabilitatea, proliferarea și migrarea keratinocitelor și a fibroblastelor dermale	110
II.2.3.3. Secretomul derivat de la subpopulația clonală de ADSC transdusă cu hTERT are proprietăți pro-angiogene	114

II.2.3.4. Secretomul derivat de la subpopulația clonală de ADSC transdusă cu hTERT stimulează re-epitelizarea răni realizate pe o cultură organotipică de piele	118
II.2.4. Discuții și concluzii parțiale	119
II.3. STUDIU COMPARATIV PRIVIND PROPRIETĂȚILE FIBROBLASTELOR DERMALÉ UMANE ȘI A MSC UMANE DERIVATE DIN MĂDUVA OSOASĂ CULTIVATE ÎN SISTEM BI- (2D) ȘI TRIDIMENSIONAL (3D).....	123
II.3.1. Introducere și obiective	123
II.3.2. Materiale și metode.....	124
II.3.2.1. Celule utilizate în studiu	124
II.3.2.2. Model de cultură celulară 3D	124
II.3.2.3. Colorația Hematoxină-Eozină	125
II.3.2.4. Detecția prin imunofluorescență a F-actinei.....	125
II.3.2.5. Microscopia electronică de transmisie (TEM).....	126
II.3.2.6. Colorația Anexină-PI	126
II.3.2.7. Analiza imunofenotipică prin tehnica de citometrie în flux	127
II.3.2.8. Analiza potențialului de diferențiere către linia adipogenă, osteogenă și condrogenă	128
II.3.2.9. Imagistică de fluorescență	128
II.3.2.10. Analiza expresiei proteice prin Western Blot.....	129
II.3.2.11. Analiza statistică	130
II.3.3. Rezultate	130
II.3.3.1. Caracterizarea comparativă a fibroblastelor dermale primare și a MSC derivate din măduva osoasă cultivate în sistem 3D și 2D din punct de vedere al morfologiei și al menținerii proprietăților definitorii de MSC	130
II.3.3.2. Fibroblastele dermale primare și MSC derivate din măduva osoasă își mențin viabilitatea în culturi 3D	141
II.3.3.3. Evidențierea modificărilor de secreție a componentelor matricii extracelulare și de exprimare a moleculelor de adeziune celulară prin cultivarea 3D a fibroblastelor dermale primare și a MSC derivate din măduva osoasă...143	
II.3.3.4. Menținerea markerilor de suprafață specifici în urma cultivării fibroblastelor dermale obținute prin diferențierea celulelor stem pluripotente induse în sistem 3D	151
II.3.4. Discuții și concluzii parțiale	153
II.4. TESTAREA <i>IN VITRO</i> A EFECTULUI SECRETOMULUI PROVENIT DE LA FIBROBLASTELE DERMALÉ PRIMARE ȘI DE LA FIBROBLASTELE DERIVATE	

DIN CELULELE STEM PLURIPOTENTE INDUSE UMANE CULTIVATE ÎN SISTEM 2D ȘI 3D ASUPRA PROCESELOR IMPLICATE ÎN VINDECAREA RĂNILOR CUTANATE.....	158
II.4.1. Introducere și obiective.....	158
II.4.2. Materiale și metode	159
II.4.2.1. Celule utilizate în studiu	159
II.4.2.2. Producerea, colectarea și păstrarea secretomului	159
II.4.2.3. Testarea proliferării celulare	161
II.4.2.4. Testarea proliferării celulare în timp real	161
II.4.2.5. Evaluarea migrării keratinocitelor și a fibroblastelor prin intermediul metodei zgârierii monostratului („Scratch test”)	162
II.4.2.6. Evaluarea în timp real a chemotaxiei folosind sistemul xCELLigence.....	162
II.4.2.7. Analiza expresiei genice prin tehnica qRT-PCR.....	162
II.4.2.8. Analiza Western Blot.....	164
II.4.2.9. Evaluarea migrării celulelor endoteliale microvasculare prin intermediul metodei zgârierii monostratului celular („Scratch test”).....	164
II.4.2.10. Formarea structurilor asemănătoare capilarelor în Matrigel.....	165
II.4.2.11. Detecția factorilor angiogeni utilizând „Angiogenesis Array Kit” ..	165
II.4.2.12. Detecția citokinelor cu ajutorul kit-urilor de tip array.....	166
II.4.2.13. Testul ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	166
II.4.2.14. Testarea viabilității celulare.....	167
II.4.2.15. Model de rană realizată pe un model de cultură organotipică de piele	167
II.4.2.16. Model de rană realizată pe un echivalent de piele obținut din organoizi derivați din celule stem pluripotente induse umane.....	168
II.4.2.17. Colorația „Whole Mount”	169
II.4.2.18. Analiza statistică	170
II.4.3. Rezultate.....	170
II.4.3.1. Efectul secretomului asupra proliferării keratinocitelor și a fibroblastelor	170
II.4.3.2. Efectul secretomului asupra migrării keratinocitelor și a fibroblastelor..	172
II.4.3.3. Efectul chemoatractiv a secretomului asupra keratinocitelor și a fibroblastelor	174

II.4.3.4. Evaluarea capacității fibroblastelor de a sintetiza componente ale matricii extracelulare.....	176
II.4.3.5. Efectul secretomului asupra migrării și chemoatrăției celulelor endoteliale și a capacității de formare a structurilor asemănătoare capilarelor pe Matrigel	180
II.4.3.6. Identificarea și cuantificarea factorilor pro-angiogeni eliberați în cultura 2D, în comparație cu cultura 3D	183
II.4.3.7. Evaluarea funcțională <i>in vitro</i> a proprietăților anti-inflamatorii ale secretomului recoltat de la sferoizi derivați din fibroblaste	184
II.4.3.8. Efectul pro-reparativ al secretomului demonstrat pe un model de rană al unei culturi organotipice de piele.....	189
II.4.3.9. Testarea efectului secretomului provenit de la fibroblastele diferențiate din celule stem pluripotente induse umane asupra rănilor generate pe echivalenți de piele derivați din organoizi	191
II.4.4. Discuții și concluzii parțiale	194
II.5. TESTAREA <i>IN VIVO</i> A SECRETOMULUI PROVENIT DE LA FIBROBLASTELE DERMAL PRIMARE UMANE CULTIVATE ÎN SISTEM 2D ȘI 3D PRIVIND ACȚIUNEA ACESTUIA ASUPRA PROCESELOR IMPLICATE ÎN VINDECAREA RĂNILOR CUTANATE.....	197
II.5.1. Introducere și obiective	197
II.5.2. Materiale și metode.....	198
II.5.2.1. Linia murină C57BL/6.....	198
II.5.2.2. Producerea, colectarea și păstrarea secretomului	198
II.5.2.3. Tehnica implantării subcutanate a Matrigelului.....	198
II.5.2.4. Colorația Hematoxilină-Eozină	199
II.5.2.5. Colorația Tricromă Masson-Goldner	200
II.5.2.6. Imagistică de fluorescență	200
II.5.2.7. Modelul de rană excizională murină	201
II.5.2.8. Evaluarea închiderii răni.....	202
II.5.2.9. Colorația Herovici	202
II.5.2.10. Analiza statistică	203
II.5.3. Rezultate	203
II.5.3.1. Evidențierea <i>in vivo</i> a proprietăților pro-angiogene ale secretomului recoltat de la sferoizi derivați din fibroblaste	203
II.5.3.2. Optimizarea modelului animal de rană cutanată, pregătirea grupelor experimentale și selectarea zilelor de analiză.....	205

II.5.3.3. Evidențierea efectului pro-reparator al secretomului provenit de la fibroblastele cultivate în sistem 3D prin cuantificarea închiderii rănii excizionale murine.....	207
II.5.3.4. Evidențierea efectului pro-reparator al secretomului provenit de la fibroblastele cultivate în sistem 3D asupra rănii excizionale prin evaluare histologică și imunohistochimică.....	210
II.5.4. Discuții și concluzii parțiale.....	217
CONCLUZII GENERALE.....	219
BIBLIOGRAFIE	220

INTRODUCERE ȘI OBIECTIVELE GENERALE

Vindecarea rănilor țesutului cutanat este un proces fiziologic ce implică o succesiune de evenimente biologice și moleculare interconectate, ca răspuns la apariția unei leziuni, rezultând reconstituirea integrității straturilor pielii și restaurarea homeostaziei. În timpul acestui proces dinamic și complex, multiple căi biologice sunt activate și sincronizate, interacțiuni coordonate existând între celulele inflamatorii, fibroblastele (Fb) dermale, keratinocite și celulele endoteliale (Paul și Sharma, 2004; Reinke și Sorg, 2012). Totodată, celulele stem rezidente pot fi supuse auto-replicării și diferențierii în mai multe tipuri celulare și pot afecta implicit semnalizarea paracrină de la nivelul rănii, iar toate aceste atribute sunt cruciale pentru regenerarea tisulară (Chen și colab., 2009).

În funcție de durata procesului de vindecare, rănilor cutanate sunt clasificate în acute și cronice (vindecabile și, respectiv, greu vindecabile) (Robson și colab., 2001). Rănilor acute prezintă semne bine definite de recuperare în decurs de 4 până la 12 săptămâni, perioada de vindecare depinzând de amploarea leziunii. În unele cazuri, este imposibilă restabilirea în mod eficient a structurii și funcției normale a țesutului, procesul fiziologic de vindecare al rănilor fiind întrerupt, ca rezultat al disfuncționalităților în reglarea răspunsurilor de reparare tisulară, precum inflamația, angiogeneza, depunerea matricii extracelulare și recrutarea celulelor. Astfel, faza inflamatorie prelungită asociată cu o inflamație excesivă, scăderea angiogenezei, migrarea

și proliferarea slabă a keratinocitelor și Fb sunt elementele ce definesc rănilor cronice (Falanga, 2005; Lazarus și colab., 1994).

În prezent, incidența rănilor cronice continuă să crească, reprezentând o provocare clinică semnificativă. De obicei, sunt afectați adulții cu comorbidități, precum ar fi insuficiența venoasă, diabetul, obezitatea, neuropatiile, insuficiența arterială sau cei care prezintă diverși factori limitativi precum îmbătrânirea, infecțiile, alimentația deficitară, imunosupresia. Rănilor cronice sunt clasificate în trei mari categorii: ulcere vasculare, ulcere diabetice și ulcere de presiune (Nunan și colab., 2014).

În ciuda eforturilor depuse de-a lungul timpului, rănilor cutanate cronice și vindecarea acestora reprezintă provocări clinice majore, care implică o povară socială și medicală considerabilă. Există însă un interes semnificativ în utilizarea celulelor stem în gestionarea acestei probleme. În ultimele decenii medicina regenerativă a câștigat o atenție considerabilă, bazându-se pe refacerea, înlocuirea sau repararea celulelor, țesuturilor și organelor traumatizate, oferind astfel posibile metode de tratament.

Celulele stromale mezenchimale (MSC) joacă un rol important în acest domeniu. Acestea sunt definite drept un grup heterogen de celule progenitoare nespecializate fusiforme (formă asemănătoare cu cea a Fb), de origine mezodermică, aderente la plastic în condiții de cultură standard și capabile să se auto-reînnoiască prin diviziune și să se diferențieze în mai multe linii celulare (Wei și colab., 2013). Aceste celule au fost identificate pentru prima dată în măduva osoasă (BM), însă, recoltarea celulelor de la nivelul BM (aspirat provenit din BM) este o procedură invazivă și dureroasă, cu randament scăzut de obținere a MSC (Pittenger și colab., 1999).

Aceste limitări au condus la căutarea unor modalități alternative de obținere a celulelor stromale mezenchimale, precum ar fi recoltarea acestora de la nivelul țesutului adipos sau din alte surse tisulare, ca de exemplu gelatina Wharton, sângele din cordonul ombilical, placenta, lichidul amniotic etc. (Keating, 2006; Ullah și colab., 2015; Gottipamula și colab., 2018; Eom și colab., 2011). Cu toate acestea, sunt preferate sursele care permit proceduri de recoltare minim invazive precum și izolarea unor cantități abundente de celule, cum ar fi țesutul adipos (Kuhbier și colab., 2010).

Inițial s-a studiat capacitatea de diferențiere a MSC ca potențială terapie regenerativă în vindecarea rănilor țesutului cutanat. S-a demonstrat însă că transplantul de MSC la locul leziunii acționează în primul rând prin efecte paracrine indirecte, mai degrabă decât prin înlocuirea directă a celulelor afectate. Această acțiune paracrină este datorată secretomului constituit din factorii solubili (citokine, chemokine) și veziculele extracelulare secretate de celule în spațiul extracelular. Astfel, în prezent se încearcă abordarea unor noi metode terapeutice acelulare care vizează utilizarea secretomului MSC în vindecarea rănilor prin stimularea angiogenezei, modularea inflamației, reducerea formării cicatricilor și inducerea re-epitelizării (Zarei și Soleimaninejad, 2018; Guillaumat-Prats, 2021; Ahangar și colab., 2020). În comparație cu utilizarea celulelor, această terapie acelulară este mai puțin imunogenă și prezintă un risc minim de formare a tumorilor (Vizoso și colab., 2017; Lu și colab., 2017; Ha și colab., 2020), oferind de asemenea și avantaje în ceea ce privește manipularea și siguranța.

Celulele prezintă un număr limitat de multiplicări (dublări de populație) *in vitro*, instalându-se destul de repede senescența și implicit moartea acestora. Astfel, pentru a depăși această limitare, se utilizează tehnici de reactivare a telomerazei (enzima ce contribuie la menținerea lungimii telomerelor), celulele realizând un număr nelimitat de diviziuni sau metode de inactivare a proteinelor implicate în reglarea ciclului celular. Totodată, celulele obținute prin această metodă sunt similare sau identice din punct de vedere genetic și fenotipic cu celulele de origine. Această abordare poartă numele de „imortalizare celulară” și a fost posibilă datorită cunoașterii bazelor moleculare care susțin acest fenomen *in vivo* în cazul cancerului (Ivanković și colab., 2007; Chalak și colab., 2024; de Bardet și colab., 2023).

Fb și MSC prezintă numeroase caracteristici comune: morfologia fusiformă, localizarea la nivelul țesutului conjunctiv, potențialul proliferativ, expresia markerilor de suprafață specifici, multipotența, lipsa activității telomerazei, cât și tiparele de expresie genică. Mai mult decât atât, acestea prezintă funcții similare în reglarea imunității. Datorită acestor asemănări, Fb ar putea fi utilizate ca potențială alternativă a MSC pentru utilizarea în aplicații clinice care implică regenerarea țesuturilor, spre exemplu pentru tratamentul rănilor cutanate. Acestea pot fi recoltate cu ușurință în număr mare din diverse țesuturi biologice, cum ar fi pielea, țesutul adipos și gingival, în timp ce sursa cea mai frecvent utilizată de MSC, BM, oferă relativ puțin material de pornire pentru expansiunea celulară și necesită metode de recoltare invazive. În plus, timpul de dublare al populației este semnificativ mai scurt comparativ cu MSC, senescența Fb instalându-

se după mai mult de 50 dublări populaționale (Huang și colab., 2010). Totodată, cerințele mediilor de cultură pentru expandarea și menținerea Fb în cultură nu sunt unele complexe.

Pe de altă parte, potențialul regenerativ al celulelor mezenchimale este influențat de diverși factori, cum ar fi țesutul de origine, vârsta donatorului, condițiile de cultură sau prezența factorilor inflamatori din organism (Ferreira și colab., 2018). Din acest motiv, mai multe strategii de preconditionare a MSC *in vitro*, precum ar fi cultivarea în condiții hipoxice, în sistem 3D sau tratamentul cu factori inflamatori, au fost utilizate pentru a stimula proprietățile lor secretorii (Haider and Ashraf, 2010; Lu și colab., 2010). Mai mult decât atât, fibroblastelor cultivate sub formă de agregate le-a fost atribuit de către Vaheri și colab. conceptul de „nemoză” (Vaheri și colab., 2009). Mai exact, această noțiune este definită ca o modalitate de activare a celulelor, care este caracterizată prin creșterea producției de COX-2 (ciclooxygenază-2), secreția de prostaglandine, proteinaze, citokine chemotactice, HGF (factorul de creștere al hepatocitelor), VEGF (factorul de creștere endotelial vascular) și exprimarea factorului nuclear activat-kappa B (Vaheri și colab., 2009; Enzerink și colab., 2010). Astfel, prin acest proces pot fi îmbunătățite proprietățile paracrine ale Fb, ce pot sta la baza strategiilor terapeutice care utilizează secretomul (terapii „fără celule”).

De asemenea, generarea de MSC din celule stem pare să ofere oportunitatea unică de a depăși majoritatea obstacolelor care există în prezent în ceea ce privește utilizarea pe scară largă a MSC ca terapie inovatoare. De-a lungul timpului, s-a raportat faptul că celulele stem pluripotente induse (iPSC) pot fi diferențiate în MSC, precum și în Fb. Acestea provin dintr-o singură clonă de iPSC, prezentând omogenitate ridicată pentru aplicații clinice. Mai mult decât atât, performanța lor biologică este mai stabilă și mai previzibilă, întrucât tiparul molecular al MSC native se schimbă subtil între diferite loturi.

Astfel, **scopul** acestei tezei de doctorat a fost de a evalua efectele secretomului provenit de la celulele mezenchimale umane asupra procesului de vindecare a rănilor, atât *in vitro*, cât și *in vivo* pe un model murin de rană. Pentru îndeplinirea acestui scop au fost propuse mai multe **obiective** utilizându-se surse celulare multiple, toate de origine umană.

Obiectiv 1. Obținerea și caracterizarea celulelor stromale mezenchimale (MSC) umane derivate din măduva osoasă și din țesutul adipos, precum și a fibroblastelor dermale umane primare sau obținute din celule stem pluripotente induse umane.

Obiectiv 2. Testarea *in vitro* a secretomului provenit de la o linie imortalizată de MSC derivate din țesut adipos (ADSC) urmărind efectul asupra proceselor implicate în vindecarea rănilor cutanate.

Obiectiv 3. Studiu comparativ privind proprietățile fibroblastelor dermale umane și a MSC umane derivate din măduva osoasă cultivate în sistem bi- (2D) și tridimensional (3D).

Obiectiv 4. Testarea *in vitro* a efectului secretomului provenit de la fibroblastele dermale primare și de la fibroblastele derivate din celulele stem pluripotente induse umane cultivate în sistem 2D și 3D asupra proceselor implicate în vindecarea rănilor cutanate.

Obiectiv 5. Testarea *in vivo* a secretomului provenit de la fibroblastele dermale primare umane cultivate în sistem 2D și 3D privind acțiunea acestuia asupra proceselor implicate în vindecarea rănilor cutanate.

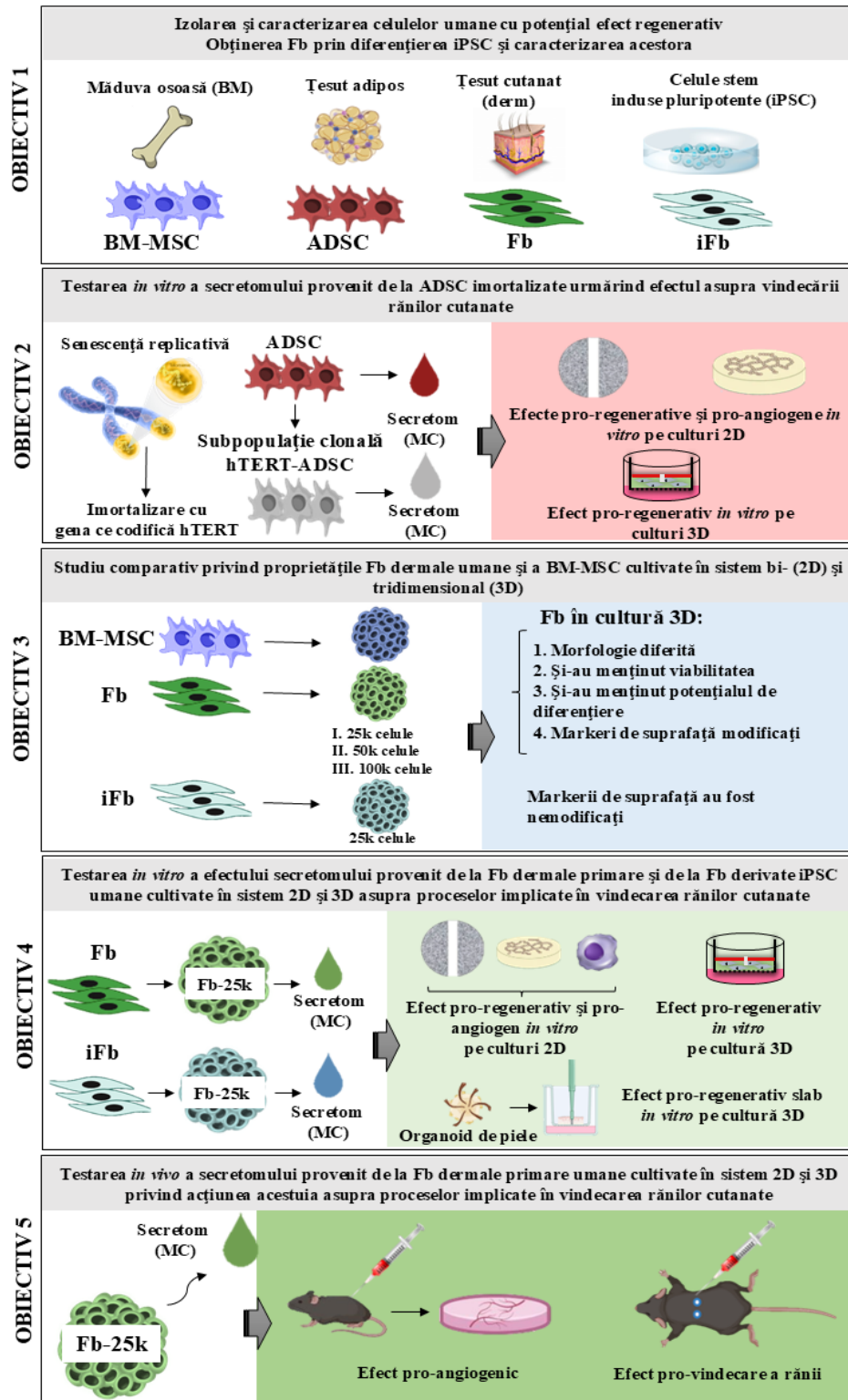
STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza este structurată în **9 capitole**, cuprinzând atât noțiuni teoretice privind stadiul actual al cunoștințelor, cât și rezultatele originale obținute (partea de contribuții originale).

Prima parte („Stadiul actual al cunoașterii”) este structurată în **4 capitole** și cuprinde date din literatură aduse la zi cu privire la subiectul vizat de această teză. Mai exact, în **capitolul I.1** este prezentată problematica rănilor cutanate, fiind vizate fundamentele anatomice și fiziologice ale țesutului cutanat, etapele vindecării rănilor alături de prezentarea succintă a perturbării procesului fiziologic întâlnit în cazul rănilor cronice, dar și abordările terapeutice actuale. **Capitolul I.2** vizează caracteristicile definitorii ale contribuției secretomului provenit de la MSC în procesul de vindecare al rănilor cutanate, punându-se accent pe caracterizarea MSC, descrierea compoziției secretomului provenit de la acestea, dar și prezentarea metodelor actuale de potențare a efectelor. De asemenea, sunt expuse studiile din literatură ce presupun utilizarea secretomului provenit de la celulele stromale mezenchimale drept potențială terapie pentru rănilor cutanate. **Capitolul I.3** se concentrează pe conceptul de utilizare a Fb ca alternativă a MSC, fiind prezentate similitudinile dintre acestea, dar și studiile existente privind

aplicabilitatea secretomului provenit de la Fb drept posibilă terapie pentru rănilor cutanate. În **Capitolul I.4** sunt prezentate potențiale direcții pentru obținerea unei surse inepuizabile de celule mezenchimale: imortalizarea celulară, precum și generarea acestora din iPSC. Unele date cuprinse în această parte fac parte dintr-un articol de tip *review* publicat anul acesta într-un jurnal indexat ISI: **Ghetu, D.-M.**, Raymond, K., Titorencu, I., Simionescu, M. **2025**. Innovative Strategies: Use of Stromal Cell-Derived Secretome for Chronic Wound Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(12), p.5609. 10.3390/ijms26125609 (IF/2024 = 4.9, Q1, AIS = 1.121).

A doua parte („**Contribuții originale**”) este structurată în **5 capitole** care au avut la bază cele 5 obiective enunțate anterior. Astfel, pentru îndeplinirea obiectivelor propuse au fost utilizate tehnici precum cele de culturi celulare, citometrie în flux, biologie moleculară, histologie, precum și teste pe animale, toate acestea fiind descrise în secțiunile „Materiale și Metode” aferente fiecărui studiu. Conținutul capitolelor este schematizat în figura de mai jos și prezentat succint în cele ce urmează.



Schematizarea conținutului celor 5 capitole (obiective) cuprinse în partea a doua a tezei („Contribuții originale”). MC: mediu condiționat; hTERT: subunitatea catalitică a telomerazei umane.

Capitolul II.1 al tezei este asociat cu primul obiectiv (Obiectiv 1), fiind intitulat **„Obținerea și caracterizarea celulelor stromale mezenchimale (MSC) umane derivate din măduva osoasă și din țesutul adipos, precum și a fibroblastelor dermale umane primare sau obținute din celule stem pluripotente induse umane”**. Acesta prezintă obținerea de celule primare cu potențial regenerativ pentru vindecarea rănilor (MSC derivate din BM și țesut adipos și Fb izolate de la nivelul dermului) și caracterizarea acestora din punct de vedere al markerilor specifici și al capacității de diferențiere către liniile celulare mezodermice: linia adipogenă, osteogenă și condrogenă. Mai mult decât atât, acesta este axat și pe obținerea Fb prin diferențierea din iPSC și caracterizarea acestora din punct de vedere al markerilor de suprafață și intracelulari specifici (precum vimentina și colagenul). Descrierea amănunțită a protocoalelor poate fi regăsită în secțiunea „Materiale și metode” aferentă acestui capitol. Rezultatele arată succesul izolării de celule primare care exprimă markerii specifici și dețin capacitatea de diferențiere către liniile celulare mezodermice. De asemenea, au fost obținute Fb prin diferențierea iPSC (iFb), exprimând markerii de suprafață și intracelulari specifici. Aceste celule au fost folosite în experimentele *in vitro* și *in vivo* pentru îndeplinirea celorlalte obiective propuse, care au ca scop utilizarea secretomului (mediului condiționat) drept terapie „acelulară” pentru rănille cutanate.

Capitolul II.2 (Obiectiv 2) este intitulat **„Testarea *in vitro* a secretomului provenit de la o linie imortalizată de MSC derivate din țesut adipos (ADSC) urmărind efectul asupra proceselor implicate în vindecarea rănilor cutanate”**. În cadrul acestuia este prezentată generarea unei linii imortalizate de ADSC (subpopulație clonală) prin transducția lentivirală a genei care codifică transcriptaza inversă (componenta catalitică) a telomazei umane (hTERT) pentru inhibarea fenomenului de senescență replicativă și evaluarea *in vitro* a efectelor secretomului (mediului condiționat) provenit de la aceste celule asupra proceselor cheie asociate vindecării rănilor cutanate. Pe scurt, s-a raportat impactul secretomului (mediului condiționat) asupra proliferării și migrării keratinocitelor, Fb și celulelor endoteliale, cât și asupra angiogenezei (procese care au loc în timpul fazei proliferative a vindecării rănilor). Totodată a fost demonstrat și efectul de susținere a procesului de re-epitelizare a unei răni realizate pe un model de cultură organotipică de piele umană. Rezultatele expuse în acest capitol au fost cuprinse într-o lucrare publicată într-un jurnal indexat ISI: **Iacomi, D. M.**, Roșca A. M., Țuțuianu, R., Neagu, T. P., Prună, V., Simionescu, M., Titorencu, I. **2022**. Generation of an

immortalized human adipose-derived mesenchymal stromal cell line suitable for wound healing therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16):8925. DOI: 10.3390/ijms23168925 (IF/2022 = 5.6, Q1, AIS = 1.028).

Capitolul II.3 (Obiectiv 3) intitulat „**Studiu comparativ privind proprietățile fibroblastelor dermale umane și a MSC umane derivate din măduva osoasă cultivate în sistem bi- (2D) și tridimensional (3D)**” a implicat analiza comparativă a BM-MSC și a Fb dermale primare umane (ca sursă celulară alternativă mult mai accesibilă)/diferențiate din iPSC cultivate în sistem 3D (drept strategie de îmbunătățire a capacității secretorii), mai exact în agregate celulare (sferoizi) obținute prin cultivarea suspensiei celulare în picături suspendate („*hanging drops*”). Sferoizii/celulele primare din componența acestora au fost analizați/analizate din punct de vedere al morfologiei, viabilității, secreției componentelor matricei extracelulare, prezenței moleculelor de adeziune, dar și de menținere al markerilor de suprafață specifici și a potențialului de diferențiere către linia adipogenă, osteogenă și condrogenă. Rezultatele au arătat că ambele tipuri celulare primare prezintă capacitatea de a agrega în sferoizi după 72 de ore, fiind detectată secreția elementelor matricii extracelulare, menținerea potențialului de diferențiere, însă și unele modificări morfologice și de prezență a markerilor de suprafață specifici. Din punct de vedere al viabilității nu s-au remarcat modificări semnificative în urma procesului de agregare. Fb diferențiate din iPSC au format de asemenea sferoizi, menținându-și markerii de suprafață specifici în urma agregării. Datele originale cuprinse în acest studiu fac parte dintr-un articol în curs de redactare.

În **capitolul II.4** (Obiectiv 4) - „**Testarea *in vitro* a efectului secretomului provenit de la fibroblastele dermale primare și de la fibroblastele derivate din celulele stem pluripotente induse umane cultivate în sistem 2D și 3D asupra proceselor implicate în vindecarea rănilor cutanate**” – sunt prezentate rezultatele obținute *in vitro* privind evaluarea efectelor secretomului (mediului condiționat) provenit de la Fb dermale primare cultivate în sistem 3D (sferoizi) asupra proceselor cheie asociate vindecării rănilor cutanate: inflamația, angiogeneza și re-epitelizarea, comparativ cu efectele mediului condiționat provenit de la Fb cultivate în monostrat (2D). S-a arătat creșterea secreției factorilor pro-angiogenici prin cultivarea tridimensională (3D) a Fb dermale umane primare sub formă de sferoizi (25000 celule/sferoid – 25k), îmbunătățirea proceselor de migrare și proliferare, cât și de re-epitelizare la nivelul rănii pe un model 3D de cultură organotipică de piele în prezența mediului condiționat

provenit de la aceste celule. Astfel, rezultatele obținute confirmă faptul că secretomul provenit de la aceste celule cultivate în sistem 3D reprezintă astfel o posibilă strategie de tratament pentru vindecarea rănilor. Totodată, sunt prezentate și rezultatele privind evaluarea secretomului obținut de la Fb derivate din iPSC (iFb) cultivate atât în sistem 2D cât și 3D (25000 celule/sferoid), însă nefiind evidențiat un efect de potențare a re-epitelizării pe un model 3D al unui echivalent de piele obținut din organoizi. Datele originale cuprinse în acest studiu fac parte dintr-un articol în curs de redactare.

Ultimul capitol al părții originale, **capitolul II.5 (Obiectiv 5) - „Testarea *in vivo* a secretomului provenit de la fibroblastele dermale primare umane cultivate în sistem 2D și 3D privind acțiunea acestuia asupra proceselor implicate în vindecarea rănilor cutanate”** este asociat cu evaluarea *in vivo* a efectelor secretomului (mediului condiționat) provenit de la Fb dermale primare cultivate în sistem 3D (sferoizi alcătuiți din 25000 celule/25k) din punct de vedere al angiogenezei și al procesului de re-epitelizare, comparativ cu efectele mediului condiționat provenit de la Fb cultivate în monostrat. Pe scurt, rezultatele au arătat efectul benefic al secretomului provenit de la Fb dermale umane primare asupra angiogenezei și a re-epitelizării rănilor cutanate, utilizându-se tehnica Matrigel *plug assay* și un model de rană la șoareci. Datele originale cuprinse în acest studiu fac de asemenea parte dintr-un articol în curs de redactare.

Conținutul tezei se încheie cu referințele bibliografice aferente.

CONTRIBUȚII PERSONALE

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE ȘI COMUNICATE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL

Lucrări publicate în reviste indexate ISI – autor principal

1. **Ghetu, D.-M.**, Raymond, K., Titorencu, I., Simionescu, M. **2025**. Innovative Strategies: Use of Stromal Cell-Derived Secretome for Chronic Wound Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(12). DOI: (IF/2024 = 4.9, Q1, AIS = 1.121).
2. Sorca[†], B. V., Kaya, D. A., Kaya, M. G. A., Enăchescu, M., **Ghetu[†], D.-M.**, Enache, L.-B., Boerașu, I., Coman, A. E., Rusu, L. C., Constantinescu, R., Titorencu, I. **2025**. Bone Fillers

with Balance Between Biocompatibility and Antimicrobial Properties. *Biomimetics*, 10(2), 100. DOI: 10.3390/biomimetics10020100 (IF/2023 = 3.4, Q2, AIS = 0.567).

3. **Iacomi, D. M.**, Roșca A. M., Țuțuianu, R., Neagu, T. P., Prună, V., Simionescu, M., Titorencu, I. **2022**. Generation of an immortalized human adipose-derived mesenchymal stromal cell line suitable for wound healing therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16):8925. DOI: 10.3390/ijms23168925 (IF/2022 = 5.6, Q1, AIS = 1.028).

Lucrări publicate în reviste indexate ISI – co-autor

1. Țuțuianu, R., Roșca, A. M., **Iacomi, D. M.**, Simionescu, M., Titorencu, I. **2021**. Human mesenchymal stromal cell-derived exosomes promote *in vitro* wound healing by modulating the biological properties of skin keratinocytes and fibroblasts and stimulating angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6239. DOI: 10.3390/ijms22126239 (IF/2021 = 5.924, Q1, AIS = 1.064).

Colaborator la un capitol într-o monografie publicată în străinătate

1. Roșca, A.M., Țuțuianu, R., **Ghetu, D.M.**, Titorencu, I., **2023**. Mesenchymal stromal cells for wound healing therapy: From expectations to reality. In: K.H. Haider, ed. *Handbook of Stem Cell Applications*. Singapore: Springer. DOI: 10.1007/978-981-99-0846-2_53-1.

Lucrări în curs de redactare

1. **Ghetu, D.-M.**, Țuțuianu, R., Titorencu, I., Roșca, A.M. The secretome of human dermal fibroblasts spheroids supports skin regeneration by promoting the remodeling of the extracellular matrix on a full thickness wound mouse model.

2. **Ghetu D.-M.**, Ramovs V., Flesseman M., Titorencu I., Raymond K., A Novel FullThickness In Vitro Human Wound Model Based on Organoid-derived Skin Equivalent.

Comunicări susținute la manifestări științifice internaționale și naționale - autor principal

Prezentări orale (2):

1. **Ghetu D.M.**, Roșca A.M., Țuțuianu R., Neagu T.P., Prună V., Simionescu M., Titorencu I. Aggregates of dermal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells exhibit different characteristics: implications for regenerative therapy, „*International Conference and XXXIX Scientific Session of the Romanian Society of Cell Biology*”, 21-23 octombrie 2022, Cluj, România.

2. **Iacomi D.M.**, Roșca A.M., Țuțuianu R., Prună V., Titorencu I., Simionescu M. Generation and characterization of an immortalized human adipose mesenchymal stromal cell line, *International Conference under the aegis of the Romanian Academy 42nd Anniversary Symposium of the Institute of Cellular Biology and Pathology „Nicolae Simionescu” held jointly with 38th annual scientific session of The Romanian Society for Cell Biology*, 4-6 noiembrie 2021, conferință online.

Postere (3):

1. **Ghețu D. M.**, Țuțuianu R., Albu Kaya M. G., Roșca A. M., Titorencu I. Development of three-dimensional intestinal organotypic models using various collagen-based dermal equivalents", poster prezentat la conferința internațională „*Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering (NanoBioMat)*”, 25-27 iunie, 2025 (ediția de vară), participare online.

2. **Ghețu D.M.**, Țuțuianu R., Roșca A.M., Simionescu M., Titorencu I., Three-dimensional aggregation stimulates the pro-angiogenic properties of adult human dermal fibroblasts, poster prezentat la simpozionul aniversar cu participare internațională „*Aspirație, inspirație și inovație în explorarea de noi frontiere în cercetarea biomedicală*” – organizat cu ocazia a 45 de ani de existență a Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, 17-18 decembrie 2024, București, România.

3. **Ghețu D.M.**, Roșca A.M., Țuțuianu, R., Prună, V., Simionescu, M., Titorencu, I., Human dermal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells display different characteristics when cultured in 3D settings, poster prezentat la simpozionul științific anual al Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” cu participare internațională „*43 years on the never-ending road of cardiovascular discoveries*”, 8-9 decembrie 2022, București, România.

Postere susținute la manifestări științifice naționale și internaționale (co-autor)

1. Țuțuianu R., **Ghețu D.M.**, Titorencu I., Roșca A.M.. Mediul condiționat derivat de la fibroblaste cultivate în sferoizi promovează regenerarea pielii pe un model murin de rană cutanată, poster prezentat la manifestația științifică: Simpozionul ARSAL 2024 „*Evaluarea severității și conceptul 3R în proiectele ce folosesc animale în experimentare*”, organizat de Asociația Română pentru Știința Animalelor de Laborator, găzduită de Institutul Național de

Cercetare-Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babeș”, 29 martie 2024, București, România.

2. Prună V., **Ghetu D.M.**, Vrânceanu D., Cotruț C., Vlădescu (Dragomir) A., Titorencu I., Enhanced osteogenic differentiation of human adult mesenchymal stem cells cultured on plate-like hydroxyapatite coatings, conferința științifică internațională „*Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering (NanoBioMat)*”, 28-30 iunie 2023 (Ediția de vară) – participare online.

3. Țuțuianu R., Roșca A.M., **Ghetu D.M.**, Prună V., Albu Kaya M. Evaluation of mesenchymal cells-derived products as therapeutics for skin regeneration, poster prezentat la manifestația științifică „*Ist NETSKINMODELS Network event*” organizată la Bratislava, Slovacia, 14-18 februarie 2023.

4. Rădulescu A. L., **Iacomi D.M.**, Florea G., Roșca A. M., Tutuianu R., Titorencu I. Obținerea și caracterizarea celulelor stem mezenchimale derivate din țesut adipos, *Conferința dedicată Zilei Internaționale a Microorganismelor (ZIM)*, 17 septembrie 2021, București, România.

Brevete naționale înregistrate

1. Aplicație OSIM nr. A/00370 (25.06.2021): „Hidrogeluri polimerice compozite cu proprietăți antibacteriene și cicatrizante și procedeu de obținere a acestora”; Autori: Simionescu M., Roșca A.M., Titorencu I.D., **Iacomi M.D.**, Țuțuianu R., Prună V., Lasca I., Chercheriță I.A., Neagu P.T., Mogoantă L., Mogoșanu G.D., Pirici N.D., Streba C.T., Birca A.C., Burdușel A.C., Stoica A.E., Grumezescu A.L., Chircov C.

CURSURI ȘI SEMINARII EFECTUATE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL

1. Training School (Școala de formare) “3D Skin Cultures” organizată în cadrul acțiunii COST CA21108 – Rețeaua Europeană pentru Ingineria și Modelarea Pielii (NETSKINMODELS) – 29 iunie-2 iulie 2025, Nijmegen, Țările de Jos.

2. Prof. Dimitris Kardassis: Lectures to the students (Lipoprotein pathways and their roles in the pathophysiology of atherosclerosis; Transcriptional Regulation of Cardiovascular Genes: Basic principles and methodologies *in vitro* and *in vivo*; Hormone Nuclear receptors: from basic

biology to clinical exploitation in cardiovascular disease), 14-18 noiembrie 2024, Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, București, România.

3. Curs de formare realizat la Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București intitulat „Știința animalelor de laborator” în perioada 30.01-10.02.2023.

4. INTERA-1 Summer School „*Encapsulation of cells and drugs: materials, procedures and applications*”, 13-14 mai 2021, Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, București, România.

5. INTERA Online Workshop „*Recent advances in the field of obtaining nanovectors for gene transfection*”, 22 aprilie 2021, Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, București, România.

6. THERAVALDIS Online Workshop „*Diabetes in cardiovascular diseases; pathogenic mechanisms and targeted therapies*”, 27 noiembrie 2020, Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, București, România.

7. DIABETER Online Workshop „*A new therapeutic tool in autoimmune diabetes: Mesenchymal Stromal Cell*”, 20 noiembrie 2020, Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, București, România.

STAGII INTERNAȚIONALE

1. Stagiul internațional cu o durată de 9 luni (1.09.2023-31.05.2024) realizat la Centrul Medical al Universității din Leiden, Țările de Jos, beneficiind de o bursă acordată de Ministerul Educației din România (conform HG 118/2023).

PREMII

1. Premiul oferit de Ministerul Educației și Cercetării și UEFISCDI „Realizări științifice – Articol original”, PN IV, Program 5.2 - Resurse umane – Subprogram 5.2.3 – Suport – Lista 1 – Primele aplicații trimise pentru articolele din 2021 și 2022_13.03.2023 pentru articolul „Generation of an immortalized human adipose-derived mesenchymal stromal cell line suitable for wound healing therapy” publicat în revista „International Journal of Molecular Sciences”, Volumul 23 (16), 8925, având factorul de impact în 2022 = 5.6 (**Iacomi, D. M.**, Roșca, A. M., Țuțuianu, R., Neagu, T. P., Prună, V., Simionescu, M., Titorencu, I.).

2. Premiul oferit de Ministerul Educației și Cercetării și UEFISCDI „Realizări științifice – Articol original ”, Subprogramul 1.1 - Resurse umane - Acordarea rezultatelor cercetării - Articole, Concurență 2021, Rezultatele evaluării_Lista 2 - Cereri de premiere depuse pentru articolele publicate în 2021_18.11.2021 - pentru articolul „Human mesenchymal stromal cell-derived exosomes promote in vitro wound healing by modulating the biological properties of skin keratinocytes and fibroblasts and stimulating angiogenesis” publicat în revista „International Journal of Molecular Sciences”, Volumul 22(12), 6239, 2021, având factorul de impact în 2021 = 5.924 (Țuțuianu, R., Roșca, A. M., **Iacomi, D. M.**, Simionescu, M., Titorencu, I.).

BURSE OBȚINUTE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL ȘI FINANȚAREA CERCETĂRILOR BURSE

1. Bursă acordată de către Ministerul Educației pentru realizarea unui stagiu de cercetare în străinătate (conform HG 118/2023) la Centrul Medical al Universității din Leiden, Țările de Jos cu durată de 9 luni (1.09.2023-31.05.2024).
2. Bursă de doctorat - Școala de Studii Avansate a Academiei Române (2020-2023).

COLABORĂRI ÎN PROIECTE DE CERCETARE

Colaborator în granturi naționale:

1. PN-IV-P7-7.1-PED-2024-1446

Proiect experimental demonstrativ

Titlul proiectului: Substituenți inovativi cu structură tridimensională și activitate antimicrobiană pe bază de colagen pentru reconstrucția cranio-facială (*Innovative antimicrobial collagen based three dimensional scaffolds for craniofacial reconstruction*)

Perioada: 2025-2027

Coordonator: Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, București

Director de proiect: Dr. Irina Titorencu

Partener: LMS PLASTIC SURGERY CLINIQUE SRL – Dr. Ana Căruntu

2. PN-III-P1-1.1-TE-2021-1344

Proiect de cercetare pentru stimularea constituirii de tinere echipe de cercetare independente

Titlul proiectului: Îmbunătățirea proprietăților paracrine ale fibroblastelor prin agregare tridimensională pentru terapia rănilor cronice (*Enhancing the paracrine properties of fibroblasts by three-dimensional aggregation for chronic wounds therapy*) - FIBROTHER

Perioada: 2022-2024

Director de proiect: Dr. Roșca Ana-Maria

3. PN-III-P2-2.1-PED-2021-4275

Proiect experimental demonstrativ

Titlul proiectului: Optimizarea interacțiunii celulelor stem mezenchimale umane cu structuri biomimetice inovative cu aplicabilitate în ingineria tisulară (*Optimization of human mesenchymal stem cells interaction with innovative biomimetic structures for tissue engineering applications*) - BioMimCells

Perioada: 2022-2024

Coordonator: Universitatea Politehnica București

Director de proiect: Dr. ing. Diana Maria Vrânceanu

Parteneri:

Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, București - Responsabil partener: Dr. Irina Titorencu

Institutul National de Cercetare și Dezvoltare în Optoelectronică (INOE 2000) - Responsabil partener: Dr. Alina Vlădescu

4. PN III PCCDI 45/2018

Proiecte complexe realizate în consorții Cercetare Dezvoltare Inovare

Titlul proiectului: Nanostructuri bioactive pentru strategii terapeutice inovatoare (*Bioactive Nanostructures for Innovative Therapeutic Strategies*) - NANOLIFE

Perioada: 2018-2020

Coordonator: Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova

Director de proiect: Dr. Laurențiu Mogoantă

Parteneri:

Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București – Responsabil partener: Dr. Ioan Lascăr

Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu”, București – Responsabil partener: Dr. Irina Titorencu

Universitatea Politehnica București - Responsabil partener: Dr. Alexandru Grumezescu

Colaborator în granturi internaționale:

1. PNRR–III-C9-2022-I8 CF 197/15.11.2022

Planul Național de Recuperare și Reziliență al României (*Romania's National Recovery and Resilience Plan*) - Proiect finanțat de către Uniunea Europeană

Titlul proiectului: Îmbunătățirea potențialului endogen anti-oxidant și de îndepărtare a colesterolului prin editare genică în boala ficatului gras; studii preclinice (*Enhancing the endogenous anti-oxidant and cholesterol removal potential by gene editing in fatty liver disease; pre-clinical studies*) - THERAGENLIV

Perioada: 2023-2026

Director de proiect: Prof. Shlomo Sasson

2. *European Cooperation in Science and Technology*

CA21108 - *European Network for Skin Engineering and Modeling* (NETSKINMODELS)

Perioada: 2022-2026

Director de proiect: Prof. Sandrine Dubrac

REFERINȚE

1. Ahangar, P., Mills, S.J. and Cowin, A.J., 2020. Mesenchymal stem cell secretome as an emerging cell-free alternative for improving wound repair. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), pp.7038.
2. Chalak, M., Hesarak, M., Mirbahari, S.N., Yeganeh, M., Abdi, S., Rajabi, S. and Hemmatzadeh, F., 2024. Cell immortality: in vitro effective techniques to achieve and investigate its applications and challenges. *Life*, 14(3), pp.417.
3. Chen, M., Przyborowski, M. and Berthiaume, F., 2009. Stem cells for skin tissue engineering and wound healing. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 37(4-5), pp.399-421.
4. de Bardet, J.C., Cardentey, C.R., González, B.L., Patrone, D., Mulet, I.L., Siniscalco, D. and Robinson-Agramonte, M.D.L.A., 2023. Cell immortalization: in vivo molecular bases and in vitro techniques for obtention. *BioTech*, 12(1), pp.14.
5. Enzerink, A., Rantanen, V. & Vaheri, A. 2010. Fibroblast nemoisis induces angiogenic responses of endothelial cells. *Exp Cell Res*, 316, pp.826-35.

6. Eom, Y.W., Lee, J.E., Yang, M.S., Jang, I.K., Kim, H.E., Lee, D.H., Kim, Y.J., Park, W.J., Kong, J.H., Shim, K.Y. and Lee, J.I., 2011. Rapid isolation of adipose tissue-derived stem cells by the storage of lipoaspirates. *Yonsei Medical Journal*, 52(6), pp.999-1007.
7. Falanga, V., 2005. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet*, 366(9498), pp.1736-1743.
8. Ferreira, J.R., Teixeira, G.Q., Santos, S.G., Barbosa, M.A., Almeida-Porada, G. and Gonçalves, R.M., 2018. Mesenchymal stromal cell secretome: influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Frontiers in Immunology*, 9, pp.2837.
9. Guillaumat-Prats, R., 2021. The role of MSC in wound healing, scarring and regeneration. *Cells*, 10(7), pp.1729.
10. Ha, D.H., Kim, H.K., Lee, J., Kwon, H.H., Park, G.H., Yang, S.H., Jung, J.Y., Choi, H., Lee, J.H., Sung, S. and Yi, Y.W., 2020. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration. *Cells*, 9(5), pp.1157.
11. Haider, H.K. and Ashraf, M., 2010. Preconditioning and stem cell survival. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 3, pp.89-102.
12. Huang, H.I., Chen, S.K., Ling, Q.D., Chien, C.C., Liu, H.T. and Chan, S.H., 2010. Multilineage differentiation potential of fibroblast-like stromal cells derived from human skin. *Tissue Engineering Part A*, 16(5), pp.1491-1501.
13. Ivanković, M., Ćukušić, A., Gotić, I., Škrobot, N., Matijašić, M., Polančec, D. and Rubelj, I., 2007. Telomerase activity in HeLa cervical carcinoma cell line proliferation. *Biogerontology*, 8, pp.163-172.
14. Keating, A., 2006. Mesenchymal stromal cells. *Current Opinion in Hematology*, 13(6), pp.419-425.
15. Kuhbier, J.W., Weyand, B., Radtke, C., Vogt, P.M., Kasper, C. and Reimers, K., 2010. Isolation, characterization, differentiation, and application of adipose-derived stem cells. *Bioreactor systems for tissue engineering II: strategies for the expansion and directed differentiation of stem cells*, pp.55-105.
16. Lazarus, G.S., Cooper, D.M., Knighton, D.R., Margolis, D.J., Percoraro, R.E., Rodeheaver, G. and Robson, M.C., 1994. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound Repair and Regeneration*, 2(3), pp.165-170.
17. Lu, G., Haider, H., Porollo, A. & Ashraf, M. 2010. Mitochondria-specific transgenic overexpression of connexin-43 simulates preconditioning-induced cytoprotection of stem cells. *Cardiovasc Res*, 88, pp.277-86.

18. Lu, K., Li, H.Y., Yang, K., Wu, J.L., Cai, X.W., Zhou, Y. and Li, C.Q., 2017. Exosomes as potential alternatives to stem cell therapy for intervertebral disc degeneration: in-vitro study on exosomes in interaction of nucleus pulposus cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 8, pp.1-11.
19. Nunan, R., Harding, K.G. and Martin, P., 2014. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Disease Models & Mechanisms*, 7(11), pp.1205-1213.
20. Paul, W. and Sharma, C.P., 2004. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends Biomater Artif Organs*, 18(1), pp.18-23.
21. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. and Marshak, D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), pp.143-147.
22. Reinke, J.M. and Sorg, H., 2012. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), pp.35-43.
23. Robson, M.C., Steed, D.L. and Franz, M.G. 2001. Wound healing; biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Problems Surg*, 38, pp.61-140.
24. Gottipamula, S., Bhat, S. and Seetharam, R.N., 2018. Mesenchymal Stromal Cells: Basics, Classification, and Clinical Applications. *Journal of Stem Cells*, 13(1).
25. Ullah, I., Subbarao, R.B. and Rho, G.J., 2015. Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 35(2), pp.e00191.
26. Vaheri, A., Enzerink, A., Räsänen, K. and Salmenperä, P., 2009. Nemo-sis, a novel way of fibroblast activation, in inflammation and cancer. *Experimental Cell Research*, 315(10), pp.1633-1638.
27. Vizoso, F.J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J. and Perez-Fernandez, R., 2017. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), pp.1852.
28. Wei, X., Yang, X., Han, Z.P., Qu, F.F., Shao, L. and Shi, Y.F., 2013. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(6), pp.747-754.
29. Zarei, F. and Soleimaninejad, M., 2018. Role of growth factors and biomaterials in wound healing. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(sup1), pp.906-911.