

ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biologie și Patologie Celulară “Nicolae Simionescu”



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT
EXPLORAREA CAPACITĂȚII SECRETOMULUI
CELULELOR STROMALE MEZENCHIMALE COMBINAT
CU NANO-BIOMATERIALE DE A CONTRIBUI LA
DEZVOLTAREA UNOR TERAPII INOVATOARE ÎN
MEDICINA REGENERATIVĂ

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
Acad. Maya SIMIONESCU

DOCTORAND:
Raluca Țuțuianu

București
2021

Cuvinte cheie: celule stromale mezenchimale, nanoparticule, keratinocite, fibroblaste dermale, matrice tridimensională, secretom, exosomi, răni cutanate, angiogeneză

Număr total de pagini: 221

Număr de figuri în Partea I: 7

Număr de tabele în Partea I: 7

Număr de figuri în Partea a II-a: 89

Număr de tabele în Partea a II-a: 4

Referințe bibliografice: 441

Lucrări publicate în reviste indexate ISI: 10 (4 – autor principal)

Recenzii publicate în reviste indexate ISI: 2

Capitole carte: 1

Postere prezentate la manifestări științifice internaționale: 3

Comunicări orale susținute la manifestări științifice naționale: 2

Premii naționale: 2

Burse obținute pe durata programului doctoral: 1 (bursă doctorală de la Academia Română)

Participarea la proiecte de cercetare naționale: 6

Specializări: 2

Brevete: 1 aprobat și 1 depus

CUPRINS

LISTA ABREVIERILOR	1
INTRODUCERE ȘI OBIECTIVELE GENERALE ALE TEZEI	3
PARTEA I- STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTIȚELOR	6
I.1. CELULELE STROMALE MEZENCHIMALE DERIVATE DIN MADUVĂ OSOASĂ ȘI ȚESUT ADIPOS, ȘI IMPLICAREA ACESTORA ÎN REGENERAREA CUTANATĂ	6
I.1.1. Caracteristicile celulelor stromale mezenchimale derivate din maduvă osoasă și țesut adipos	6
I.1.2. Potentialul terapeutic al celulelor stromale mezenchimale derivate din maduvă osoasă și țesut adipos	8
I.2. PROCESUL DE VINDECARE AL RĂNILOR CUTANATE	14
I.2.1. Structura pielii	14
I.2.2. Etapele vindecării rănilor cutanate	25
I.3. APLICAȚIILE NANOPARTICULELOR ȘI BIOMATERIALELOR ÎN REGENERAREA TISULARĂ	31
I.3.1. Nanoparticule pe bază de fier	31
I.3.2. Nanoparticule pe bază de argint	35
I.3.3. Substituenți cutanați pe bază de biomateriale	40
I.4. CONTRIBUȚIA SECRETOMULUI CELULELOR STROMALE MEZENCHIMALE ADULTE ÎN REGENERAREA CUTANATĂ	47
I.5. EXOSOMII SECRETAȚI DE CELULELE STROMALE MEZENCHIMALE DERIVATE DIN MADUVĂ OSOASĂ ȘI ȚESUT ADIPOS PENTRU REGENERAREA CUTANATĂ	51
I.5.1. Biogeneza și compoziția exosomilor	53
I.5.2. Metode de izolare a exosomilor	57
I.5.3. Tehnici de cuantificare și caracterizare a exosomilor	61
I.5.4. Efectele exosomilor secretați de celule stromale mezenchimale asupra procesului de vindecare a rănilor cutanate	64
PARTEA A II-A: CONTRIBUȚII ORIGINALE	75
II.1. POTENȚIALUL TERAPEUTIC AL NANOPARTICULELOR PE BAZĂ DE FIER CA VECTORI PENTRU ELIBERAREA CONTROLATĂ DE PRINCIPII ACTIVE	75
II.1.1. Introducere și obiective	75
II.1.2. Materiale și metode	76

II.1.2.1. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor hibride Fe-PEI	76
II.1.2.2. Linii celulare	78
II.1.2.3. Colorația Albastru de Prusia pentru evidențierea fierului	78
II.1.2.4. Interacțiunea NP Fe-PEI marcate fluorescent cu MSC	79
II.1.2.5. Imagistică de bioluminescență pe celule în cultură	79
II.1.2.6. Microscopia electronică de transmisie (TEM)	80
II.1.2.7. Măsurarea potențialului membranelor mitocondriale ($\Delta\Psi_m$)	80
II.1.2.8. Determinarea dimensiunii agregatelor de nanoparticule	80
II.1.2.9. Evaluarea biocompatibilității NP Fe-PEI cu aparatul xCelligence	81
II.1.2.10. Testul de hemoliză	81
II.1.2.11. Evaluarea <i>in vivo</i> pe un model de xenogrefă heterotopică de glioblastom pe șoareci imunodeficienți	81
II.1.3. Rezultate	82
II.1.3.1. Selecția și caracterizarea fizico-chimică a NP Fe-PEI	82
II.1.3.2. Agregarea NP Fe-PEI în mediul de cultură	86
II.1.3.3. NP Fe-PEI cu DiI încorporat în timpul agregării sunt capabile să elibereze fluorocromul prin contact direct cu celulele	88
II.1.3.4. NP Fe-PEI cu substanțe încorporate în timpul agregării sunt capabile să elibereze prin contact direct cu celulele	90
II.1.3.5. Încorporarea de cisplatină în NP Fe-PEI în timpul sintezei hidrotermale este asociată cu o eficiență crescută a medicamentului	91
II.1.4. Discuții și concluzii parțiale	96
II.2. POTENȚIALUL SECRETOMULUI DERIVAT DIN CELULE STROMALE MEZENCHIMALE UMANE ÎN VEDEREA DEZVOLTĂRII DE TERAPII PENTRU VINDECAREA RĂNILOR CUTANATE	99
II.2.1. Introducere și obiective	99
II.2.2. Materiale și metode	99
II.2.2.1. Sinteza și caracterizarea matricei de colagen tridimensională	99
II.2.2.2. Tehnici de culturi celulare	100
II.2.2.3. Caracterizarea MSC prin citometrie de flux	101
II.2.2.4. Caracterizarea fibroblastelor dermale umane prin imunocitochimie	101
II.2.2.5. Evaluarea capacității matricelor de colagen de a fi colonizate cu keratinocite și fibroblaste umane	101

II.2.2.6. Evaluarea calitativă a viabilității keratinocitelor și fibroblastelor umane cultivate pe matrici de colagen	102
II.2.2.7. Evaluarea efectului secretomului asupra aderării și proliferării keratinocitelor și fibroblastelor umane cultivate în sistem 2D și pe matricile 3D de colagen	102
II.2.2.8. Evaluarea capacității de migrare prin metoda “scratch test”	103
II.2.2.9. Evaluarea expresiei genice folosind tehnica PCR cantitativ în timp real (qPCR)	103
II.2.2.10 Testarea efectului chemo-attractant al secretomului	104
II.2.2.11. Evaluarea profilului citokinelor de la nivelul secretomului	104
II.2.2.11. Analiza statistică	104
II.2.3. Rezultate	105
II.2.3.1. Caracterizarea MSC derivate din maduvă osoasă și a fibroblastelor izolate din derm	105
II.2.3.2. Matricea de colagen poroasă permite colonizarea cu keratinocite și fibroblaste	106
II.2.3.3. Secretomul influențează proprietățile keratinocitelor și fibroblastelor în sistemul clasic 2D de cultură	110
II.2.3.4. Secretomul promovează colonizarea matricelor de colagen cu keratinocite și fibroblaste	114
II.2.3.5. Secretomul prezintă proprietăți pro-angiogene și conține factori mito- și motogeni, precum și modulatori ai angiogenezei	118
II.2.4. Discuții și concluzii parțiale	120
II.3. POTENȚIALUL TERAPEUTIC AL NANOPARTICULELOR PE BAZĂ DE ARGINT (NP AG) PENTRU TRATAMENTUL RĂNILOR CUTANATE	123
II.3.1. Introducere și obiective	123
II.3.2. Materiale și metode	123
II.3.2.1. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor hibride pe bază de argint	123
II.3.2.2. Linii celulare	124
II.3.2.3. Evaluarea viabilității celulare	124
II.3.2.4. Evaluarea capacității de migrare prin metoda “scratch test”	125
II.3.2.5. Evaluarea efectului apoptotic indus de NP Ag	125
II.3.2.6. Marcare fluorescentă a actinei filamentoase	125
II.3.2.7. Formarea de tubi pe GELTRES	125

II.3.2.8. Testarea microbiologică- metoda microdiluțiilor binare în bulion	126
II.3.3. Rezultate	126
II.3.3.1. Caracterizarea fizico-chimică a NP Ag	126
II.3.3.2. Evaluarea citotoxicității NP Ag pe keratinocite, fibroblaste și celule endoteliale	128
II.3.3.3. Evaluarea efectelor NP Ag asupra migrării keratinocitelor, fibroblastelor și celulelor endoteliale	133
II.3.3.4. Evaluarea efectelor NP Ag asupra citoscheletului actinic de la nivelul keratinocitelor, fibroblastelor și celulelor endoteliale	136
II.3.3.5. Evaluarea efectelor NP Ag asupra procesului de angiogeneză	139
II.3.3.6. Evaluarea efectelor antibacteriene ale NP Ag	141
II.3.4. Discuții și concluzii parțiale	141
II.4. EVALUAREA EFECTELOR EXOSOMILOR ELIBERAȚI DE CELULE STROMALE MEZENCHIMALE ASUPRA CELULELOR PIELII, ÎN VEDEREA DEZVOLTĂRII UNUI TRATAMENT PENTRU VINDECAREA RĂNILOR CUTANATE	145
II.4.1. Introducere și obiective	145
II.4.2. Materiale și metode	146
II.4.2.1. Izolarea și caracterizarea celulelor stromale mezenchimale din țesut adipos subcutan (ADSC)	146
II.4.2.3. Izolarea și caracterizarea exosomilor	146
II.4.2.3. Testarea funcțională comparativă a exosomilor în vederea selecției unei surse adecvate prin tehnica „scratch test	148
II.4.2.4. Evaluarea viabilității și proliferării celulare	149
II.4.2.5. Preluarea exosomilor de către fibroblaste	149
II.4.2.6. Imunocito- și imunohistochimie	150
II.4.2.7. Tehnica PCR cantitativ (qPCR)	150
II.4.2.8. Western blot	151
II.4.2.9. Tehnica contracției gelului de colagen	151
II.4.2.10. Cuantificarea nivelului de TNF α prin tehnica ELISA	152
II.4.2.11. Formarea de tubi pe matrice extracelulară	152
II.4.2.12. Modelul de cultură organotipică cutanată (OTC)	152
II.4.2.13. Analiza α SMA prin citometrie de flux	153

II.4.2.14. Caracterizarea și testarea funcțională a gelului de fibrina cu nanoparticule și exosomi	153
II.4.2.15. Analiza statistică	153
II.4.3. Rezultate	154
II.4.3.1. Caracterizarea celulelor stromale mezenchimale izolate din țesut adipos și maduvă osoasă	154
II.4.3.2. Caracterizarea exosomilor izolați prin ultracentrifugare	155
II.4.3.3. Testarea funcțională comparativă a exosomilor în vederea selecției unei surse adecvate	158
II.4.3.4. Efectele biologice ale exosomilor secretați de BM-MSC asupra principalelor celule implicate în vindecarea rănilor cutanate	160
II.4.4. Discuții și concluzii parțiale	178
CONCLUZII GENERALE	184
BIBLIOGRAFIE	186
LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE ȘI COMUNICATE	218
BREVETE	220
SPECIALIZĂRI ȘI CURSURI EFECTUATE	220
BURSE OBTINUTE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL ȘI FINANȚAREA CERCETĂRILOR	221

Introducere și obiectivele generale ale tezei

Medicină regenerativă, reprezintă una din ramurile medicinei dezvoltate în vederea îmbunătățirii calității vieții pacienților. Conform unei definiții din 2006, acest domeniu interdisciplinar utilizează diverse abordări tehnologice cum ar fi: administrarea de molecule solubile, terapia genică, transplantul de celule stem, reprogramarea celulară și mai ales, ingineria tisulară [Greenwood et al. 2006]. Johnson et al au efectuat o analiză a categoriile de activități privind cele mai bune abordări din domeniu, concluzionând că este necesară înțelegerea și controlul angiogenezei, alături de răspunsul imun al organismului, a comportamentului celulelor stem și standardizarea utilizării acestora, precum și capacitatea de producerea în masă a construcțiilor de inginerie tisulară rezultați [Johnson et al. 2007]. Astfel, sinergia unor discipline de bază cum ar fi: biologia celulară și știință materialelor au generat sisteme complexe tridimensionale (3D) celule-biomaterial, implantabile cu scopul de a regenera țesutul, dar și sisteme exclusiv celulare, cum ar fi transplantul de celulele stem, sau bazate exclusiv pe biomateriale, care în urmă implantării se integrează la nivelul organismului [Muzzio et al. 2021].

Unul din principalii piloni care au susținut dezvoltarea domeniului medicinei regenerative, inclusiv a ingineriei tisulare, a fost stabilit acum mai bine de 50 de ani, când Friedenstein et al. au raportat izolarea unei populații clonogene, multipotente, fibroblastoide, derivate din măduvă osoasă [Friedenstein et al. 1968]. Ulterior, aceste celule stromale mezenchimale (MSC), considerate celule multipotente ușor accesibile, au fost izolate din diverse țesuturi umane adulte cum ar fi țesut adipos, sau prenatale: cordon umbilical, fluid amniotic. MSC au fost evaluate în studii clinice sub formă de terapie celulară pentru diferite patologii: precum infarctul miocardic acut, scleroza multiplă sau forma acută a bolii grefă versus gazdă rezistentă la steroizi [NCT00877903, NCT02239393, NCT02923375]. În ciuda potențialului de diferențiere observat *in vitro*, efectele benefice obținute în urma administrării de MSC nu au fost asociate cu grefarea acestor celule sau modificarea fenotipului către unul specific țesutului țintit. Mai mult, deși studiile preclinice au evidențiat rezultate promițătoare, efectele terapeutice nu au fost reproduse și în cadrul studiilor clinice; de altfel, în Europa prima autorizație de punere pe piață pentru un produs pe bază de MSC, s-a obținut abia în 2018 [Galipeau și Sensebe, 2018]. În același timp, secretomul MSC, constituit din totalitatea factorilor solubili (chemokine, citokine, factori de creștere) și veziculele extracelulare (microvesicule, exosomi) eliberate în mediul extracelular, s-a evidențiat ca efector paracrin pentru acțiunea benefică observată în cazul administrării acestor celule, conturându-se astfel o nouă abordare terapeutică „cell-free” [Praveen Kumar et al. 2019].

Pe de altă parte, domeniul științei materialelor s-a axat pe dezvoltarea unor compuși care să fie complementari acțiunii MSC. Mai exact, pornind de la matricea extracelulară ca model pentru fabricarea biomaterialelor, s-au propus diverși suportți tridimensionali („scaffolds”) care să sprijine proliferarea și diferențierea celulelor cu scopul de a promova regenerarea tisulară. În general, pentru țesuturile moi s-au utilizat polimeri precum colagenul, alginatul, proteoglicanii,

chitosanul, datorită biocompatibilității și acțiunii bioactive ce permite aderarea și creșterea celulelor la nivelul lor. Totodată, domeniul nanomaterialelor a contribuit la dezvoltarea domeniului medicinei regenerative, mai exact prin varietatea nanoparticulelor (NP) ce pot fi utilizate fie ca vectori pentru eliberarea de principii active, fie ca agenți antibacterieni care să asigure siguranța utilizării biomaterialelor, prevenind infecțiile locale [Hasan et al. 2018].

În lucrarea de față au fost propuse următoarele obiective:

1. evaluarea unor nanoparticule superparamagnetice pe bază de fier și polietilenimina (NP Fe-PEI) obținute printr-o metodă de sinteză blândă, care să permită simultan încorporarea de agenți terapeutici cu prezervarea acțiunii lor, în scopul de a valida utilizarea acestor nanoparticule ca vectori pentru eliberarea de principii active;
2. investigarea capacității secretomului celulelor stromale mezenchimale umane, de a îmbunătăți performanțele *in vitro* ale unei matrice de collagen poroase utilizate în vindecarea rănilor cutanate;
3. selecția unor nanoparticule cu efecte antibacteriene pe bază de argint și polimeri, în funcție de acțiunea lor biologică asupra principalelor tipuri celulare implicate în vindecarea leziunilor pielii: keratinocite, fibroblaste dermale și celule endoteliale;
4. selecția exosomilor secretați de MSC izolate din două surse: măduva osoasă și țesut adipos, în vederea validării acestora *in vitro* ca agenți terapeutici activi capabili să stimuleze regenerarea cutanată prin acțiunea lor asupra principalelor etape din vindecarea rănilor cutanate.

Structura tezei de doctorat

Lucrarea este structurată în două părți: **prima parte**- Stadiul actual al cunoștințelor-divizat în cinci capitole ce prezintă principalele caracteristici ale celulelor stromale mezenchimale și potențialul lor terapeutic, structura pielii și etapele vindecării leziunilor cutanate, urmate de aspecte legate de aplicațiile nanoparticulelor, biomaterialelor precum și a secretomului pentru regenerarea cutanată. Ultimul capitol este dedicat exosomilor, conținând aspecte generale privind originea, izolarea și caracterizarea acestora, concentrându-se apoi pe cei secretați de MSC ca agenți terapeutici pentru vindecarea rănilor pielii. **Partea a doua** a lucrării include contribuțiile originale, organizate în patru capitole, corespunzătoare studiilor desfășurate pentru atingerea obiectivelor tezei.

Primul studiu- *Potențialul terapeutic al nanoparticulelor pe bază de fier ca vectori pentru eliberarea controlată de principii active*, a presupus investigarea biocompatibilității unor nanoparticule superparamagnetice hibride pe baza de fier și polietilenimina (NP Fe-PEI) atât pe celule umane normale cât și tumorale, a capacității acestor nanoparticule de a încorpora principii active în urmă agregării în mediu de cultură și ulterior de a elibera substanță prin contact cu

celulele, precum și a efectului anti-tumoral al nanoparticulelor Fe-PEI cu cisplatina încorporată în timpul sintezei hidrotermale, pe modele *in vitro* și *in vivo*.

Principalele rezultate originale (Fig. 1):

1. nanoparticulele hibride cu un raport masic Fe:PEI de 1:2 obținute prin sinteză hidrotermală la 100 atm și 40°C și resuspendate într-o soluție de NaCl în prezența de PAA (acid poliacrilic) pentru stabilizare, au fost asociate cu o lipsă de toxicitate pe celulele stromale mezenchimale (MSC) murine la aceleași concentrații însă manifestând un efect citotoxic pe celulele tumorale de glioblastom (linia U87);

2. nanoparticulele hibride Fe:PEI au agregat spontan în mediu de cultură, iar agregatele astfel formate au încorporat substanțe active (DiI, valinomicina) prezente în soluție, pe care apoi le-au eliberat prin contact direct cu celula, activitatea biologică a substanțelor fiind preservată;

3. nanoparticulele hibride Fe-PEI cu cisplatină încorporată în timpul sintezei au prezentat o acțiune anti-tumorală mai puternică comparativ cu medicamentul administrat ca atare la aceeași concentrație sau cu nanoparticulele cu cisplatina adăugată după sinteză atât *in vitro* pe linia U87 cât și *in vivo* pe modelul murin de xenogrefă heterotopică de glioblastom.

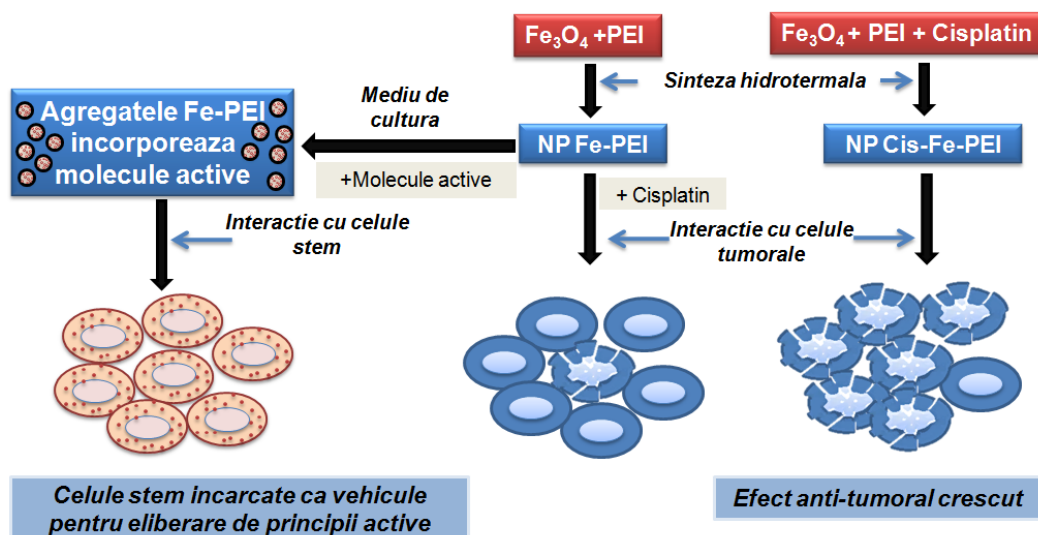


Figura 1. Reprezentare schematică sumarizând rezultatele prezentate în primul studiu privind potențialul terapeutic al nanoparticulelor hibride Fe-PEI. Rezultatele prezentate în acest capitol indică faptul că $NP Fe-PEI$ au încorporat molecule active prin incubarea în mediu de cultură, și au eliberat ulterior aceste substanțe prin contact direct cu celulele stem mezenchimale. De asemenea, nanoparticulele cu cisplatină încorporată în timpul sintezei, au prezentat un efect

anti-tumoral mult mai puternic comparativ cu nanoparticulele la care s-a adăugat cisplatină în aceeași concentrație după sinteză.

În cadrul celui de-al doilea studiu- *Potențialul secretomului derivat din celule stromale mezenchimale umane în vederea dezvoltării de terapii pentru vindecarea rănilor cutanate*, s-a evaluat îmbunătățirea adusă unei matrici poroase de collagen bovin de tip I prin adăugarea unui agent trofic potent- secretomul derivat de la celule stromale mezenchimale (MSC) umane sub formă de mediu condiționat, în ceea ce privește colonizarea cu keratinocite și fibroblaste dermale umane, precum și efectul secretomului asupra proliferării, migrării celulare și angiogenezei *in vitro*.

Principalele rezultate originale (Fig. 2):

1. secretomul MSC a promovat colonizarea matricii de collagen cu keratinocite și fibroblaste, prin stimularea aderenței și proliferării acestora;
2. secretomul MSC a modificat expresia genică a moleculelor implicate în sinteză și degradarea matricii extracelulare (colagen de tip I și III, α SMA, TIMP-1, TIMP-2, MMP-9);
3. secretomul MSC a prezentat proprietăți pro-angiogene, fiind motogen și chemo-attractant pentru celulele endoteliale.

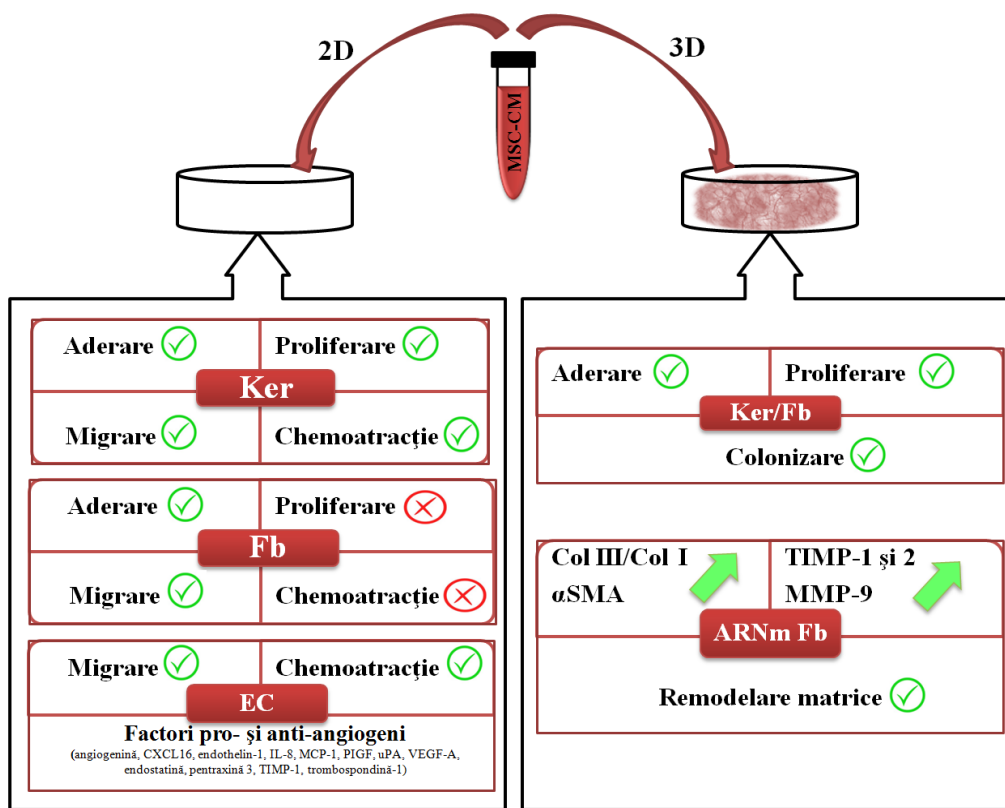


Figura 2. Reprezentare schematică sumarizând rezultatele prezentate cel de-al doilea studiu privind potențialului terapeutic al secretomului derivat de la celulele stromale mezenchimale izolate din măduvă osoasă combinat cu o matrice poroasă de collagen pentru tratamentul leziunilor cutanate.

Cel de-al treilea studiu inclus în teza de doctorat, se referă la selecția unor nanoparticule de argint (NP Ag), în vederea utilizării acestora ca agenți antibacterieni pentru încorporarea într-un compus pe bază de gel de fibrină pentru tratamentul rănilor cutanate. Alegerea NP Ag adecvate a fost fundamentată de o serie de experimente, care pe lângă efectul citotoxic asupra viabilității keratinocitelor, fibroblastelor dermale și celulelor endoteliale, a urmărit și migrarea celulară și dispunerea citoscheletului actinic, alături de acțiunea antibacteriană.

Principalele rezultate originale (Fig. 3) :

1. concentrația maximă de nanoparticule pentru care viabilitatea celulară a keratinocitelor nu a scăzut față de control a fost de 40 μg/ml pentru NP Ag EG și EG/PVP, 25 μg/ml pentru NP Ag PEG și respectiv, 30 μg/ml pentru NP Ag PEG PVP;
2. concentrația maximă de nanoparticule pentru care viabilitatea celulară a fibroblastelor și celulelor endoteliale nu a scăzut față de control a fost de 30 μg/ml pentru NP Ag EG și EG/PVP, 20 μg/ml pentru NP Ag PEG și respectiv, 25 μg/ml pentru NP Ag PEG PVP;
3. concentrația maximă de NP Ag care nu a afectat migrarea celulară a fost de 25 μg/ml pentru NP Ag EG și EG/PVP, și de 10 μg/ml în cazul NP Ag PEG și PEG/PVP, iar prezența NP Ag a indus o creștere a densității fibrelor de stres de actină.

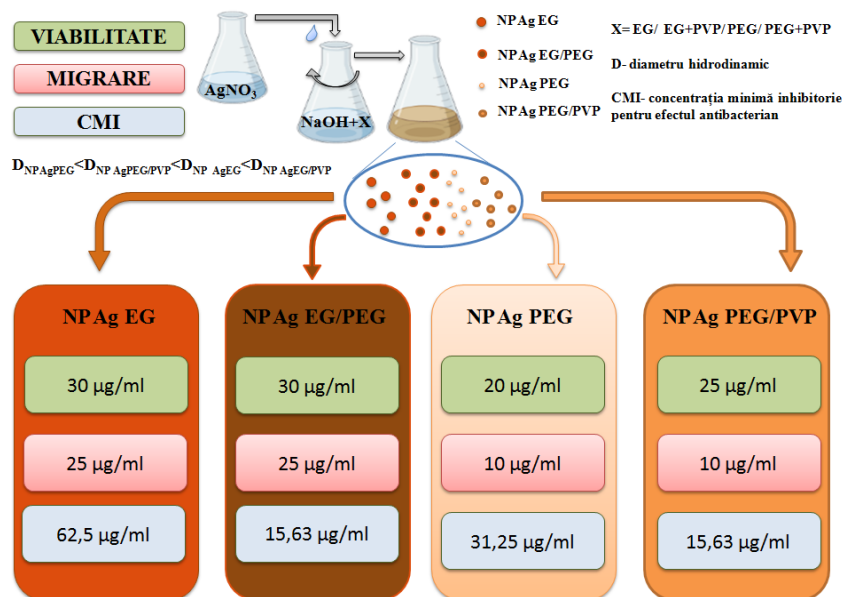


Figura 3. Reprezentare schematică a principalelor rezultate prezentate în cel de-al treilea studiu privind activitatea biologică a nanoparticulelor pe bază de argint sintetizate prin metoda

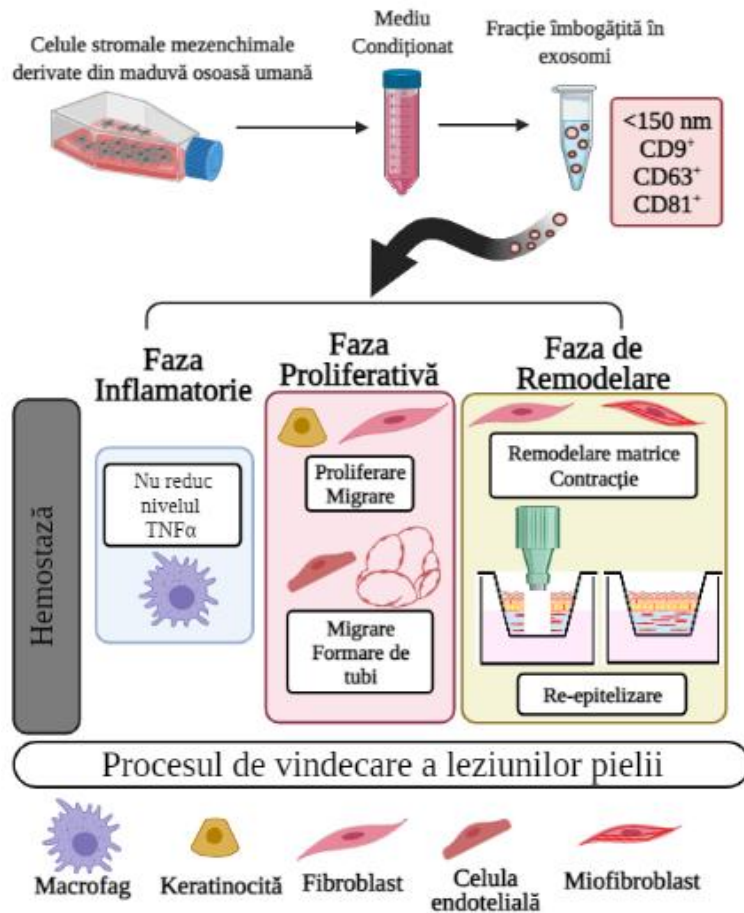
chimică, ce presupune reducerea alcalină a azotatului de argint, și funcționalizate cu etilen glicol (EG), polietilenglicol (PEG), cu sau fără polivinilpirolidonă (PVP). Dintre cele patru tipuri de nanoparticule studiate din punct de vedere al viabilității, capacității de a interfera cu migrarea celulară și a valorilor concentrației minime inhibitorii pentru acțiunea bacteriostatică, rezultatele au susținut utilizarea NP Ag EG/PVP până la concentrații de 25 μg/ml, fără a compromite viabilitatea și motilitatea keratinocitelor, fibroblastelor dermale și a celulelor endoteliale, fiind în același timp eficiente împotriva bacteriilor frecvent întâlnite în infecțiile cutanate.

Cel de-al patrulea studiu din partea de contribuții originale, s-a concentrat pe exosomii secretați de MSC, inițial alegându-se sursa cea mai adecvată: MSC izolate din țesut adipos (ADSC) sau măduva osoasă (BM-MS). Exosomii astfel selectați au fost evaluați din punct de vedere al acțiunii stimulante asupra proliferării și migrării celulare, angiogenezei, a modificării expresiei genice și proteice în cadrul diferențierii fibroblastelor către miofibroblaste, și a capacității de a promova re-epitelizarea unei răni complete efectuate pe un model de cultură organotipică cutanată umană.

Modelul de cultură organotipică umană dezvoltat în cadrul programului de pregătire doctorală, reprezintă o alternativă la studiile pe animale, care, în cazul ranilor pielii, își pierde din relevanță pentru translația spre fază clinică, din cauza diferențelor majore anatomice și fiziologice față de om [Parnell et al 2019]. De altfel, un model similar este deja utilizat pentru testele standard de iritație ale pielii conform ISO 10993-23:2021-Partea 23.

Principalele rezultate originale (Fig. 4):

1. exosomii izolați prin centrifugare diferențială din mediul condiționat secretat de MSC derivate din măduvă osoasă, au stimulat proliferarea și migrarea keratinocitelor și fibroblastelor umane;
2. exosomii în interacție cu fibroblastele dermale, chiar și în cazul unui mediu bogat în TGFβ1, nu au indus un fenotip pro-fibrotic, ci unul pro-vindecare, caracterizat de o creștere a expresiei proteice pentru colagen de tip I, fibronectină, decorină, precum și de o îmbunătățire a capacității contractile, însoțită de o mărire a expresiei enzimei lizil oxidaza, și nu a proteinei αSMA;
3. exosomii au conținut factori cu acțiune atât pro- cât și anti-angiogenă: Ang-2, ET-1, EG-VEGF/PK1, persefină, uPA și, respectiv, TSP-1, TIMP-1, PEDF, PAI-1, iar aceste nanovezicule au stimulat migrarea și formarea de tubi a celulelor endoteliale;
4. exosomii au susținut procesul de re-epitelizare pe un model de cultură organotipică cutanată umană lezată pe toată grosimea, similar cu mediu control pozitiv suplimentat cu factori de creștere.



Created in BioRender.com 

Figura 4. Reprezentare schematică sumarizând principalele rezultate din cel de-al patrulea studiu privind acțiunea exosomilor secretați de BM-MSC asupra principalelor tipuri celulare implicate în vindecarea rănilor cutanate [creat cu BioRender.com].

Astfel, în urma studiilor efectuate în cadrul programului de pregătire doctorală, s-au obținut următoarele rezultate originale:

1. Nanoparticulele superparamagnetice hibride pe bază de fier și poli(etilenimină), sintetizate prin metoda hidrotermală în condiții ce suportă în același timp încorporarea de principii active fără a compromite activitatea lor terapeutică, au fost biocompatibile atât pe celule normale cât și tumorale. Acest tip de nanoparticule au agregat spontan în mediu de cultură și permit astfel încorporarea de substanțe active în structurile micrometrice rezultate, pe care apoi le-au eliberat prin contact direct cu celulele. În cazul încorporării în timpul sintezei a unui compus anti-tumoral, precum cisplatina, la o concentrație fără efecte secundare, nanoparticulele au

prezentat un efect citotoxic asupra celulelor de glioblastom și o tendință de scădere a dimensiunii tumorii *in vivo*, susținând utilizarea lor ca vectori pentru eliberarea controlată.

2. Secretomul, sub formă de mediu condiționat, provenit de la celulele stromale mezenchimale (MSC) umane izolate din măduva osoasă, a avut efecte chemo-atractive și mitogene asupra keratinocitelor și celulelor endoteliale, cultivate în sistemul clasic bidimensional. Mai mult, acest secretom a promovat colonizarea matricelor tridimensionale poroase de colagen bovin de tip I cu keratinocite și fibroblaste dermale; de asemenea, prezența mediului condiționat a modulat expresia genică a moleculelor implicate în sinteză și degradarea matricei extracelulare (colagen de tip I și III, α SMA, TIMP1, TIMP2, MMP14). Astfel, datele obținute au susținut fezabilitatea combinării matricei de colagen cu secretomul derivat de la MSC în vederea utilizării sub forma unui produs acelular disponibil „direct de pe raft” pentru vindecarea rănilor cutanate.

3. Nanoparticulele de argint (NP Ag) funcționalizate cu etilen glicol, etilen glicol și poli(vinilpirolidonă), poli(etilenglicol), sau poli(etilenglicol) și poli(vinilpirolidonă) sintetizate prin metoda reducerii nitrului de argint, au prezentat nivele de citotoxicitate diferite pentru keratinocite, fibroblaste dermale și celule endoteliale; cea mai mare concentrație care nu a afectat viabilitatea și capacitatea migratorie fiind înregistrată pentru NP Ag cu etilen glicol și poli(vinilpirolidonă)- 25 μ g/ml, care, corelată cu concentrația minimă inhibitorie pentru efectul antibacterian- 15,63 μ g/ml, a susținut utilizarea acestor nanoparticule pentru potențiale aplicații în cazul tratamentului leziunilor pielii.

4. Exosomii secretați de MSC izolate din măduva osoasă umană au avut un efect stimulator mai puternic asupra migrării keratinocitelor, comparativ cu cei secretați de MSC izolate din țesut adipos; acești exosomi selectați au promovat proliferarea keratinocitelor și fibroblastelor dermale, inducând un fenotip pro-vindecare la nivelul fibroblastelor diferențiate către miofibroblaste, caracterizat de o creștere a contractilității fără modificarea expresiei de α SMA. De asemenea, aceste nanovezicule au susținut migrarea celulelor endoteliale și formarea de tubi, sugerând o acțiune pro-angiogenă, datorată cel mai probabil citokinelor și factorilor de creștere identificați la nivelul acestora. Mai mult, tratarea cu exosomi a leziunilor efectuate pe culturilor organotipice cutanate umane, care mimează structura pielii, a fost asociată cu o re-epitelizare completă, sprijinind astfel aplicarea acestui tip de vezicule extracelulare pentru terapia rănilor tegumentului.

Referinte:

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation. 1968; 6(2):230-47.

Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. Cell Stem Cell. 2018; 22(6):824-833.

Greenwood HL, Singer PA, Downey GP, Martin DK, Thorsteinsdóttir H, Daar AS. Regenerative medicine and the developing world. PLoS Med. 2006; 3(9):e381.

Hasan A, Morshed M, Memic A, Hassan S, Webster TJ, Marei HE. Nanoparticles in tissue engineering: applications, challenges and prospects. Int J Nanomedicine 2018; 24(13):5637-5655.

Johnson PC, Mikos AG, Fisher JP, Jansen JA. Strategic directions in tissue engineering. Tissue Eng. 2007;13(12):2827-37.

Muzzio N, Moya S, Romero G. Multifunctional Scaffolds and Synergistic Strategies in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Pharmaceutics. 2021; 13(6):792.

Praveen Kumar L., Sangeetha K., Ranjita M., Vijayalakshmi S., Rajagopal K., Rama Shanker V. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. Cytokine Growth Factor Rev. 2019;46:1-9.

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE ȘI COMUNICATE

LUCRĂRI PUBLICATE ÎN REVISTE INDEXATE ISI- autor principal

1. **Tutuianu R**, Rosca AM, Iacomî DM, Simionescu M, Titorencu I. Human Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Promote In Vitro Wound Healing by Modulating the Biological Properties of Skin Keratinocytes and Fibroblasts and Stimulating Angiogenesis. Int J Mol Sci. **2021** Jun 9;22(12):6239. doi: 10.3390/ijms22126239. (factor de impact- 5,54; Q1).
2. **Tutuianu R**, Rosca AM, Albu Kaya MG, Pruna V, Neagu TP, Lascar I, Simionescu M, Titorencu I. Mesenchymal stromal cell-derived factors promote the colonization of collagen 3D scaffolds with human skin cells. J Cell Mol Med. **2020** Sep;24(17):9692-9704. doi: 10.1111/jcmm.15507. (factor de impact- 4,83; Q1).
3. **Tutuianu R**, Roșca AM, Florea G, Prună V, Iacomî DM, Rădulescu LA, Neagu TP, Lascăr I, Titorencu ID. Heterogeneity of human fibroblasts isolated from hypertrophic scar. Rom J Morphol Embryol. **2019**;60(3):793-802. PMID: 31912089. (factor de impact- 1,38; Q4).

4. **Tutuianu R**, Popescu LM, Preda MB, Rosca AM, Piticescu RM, Burlacu A. Evaluation of the Ability of Nanostructured PEI-Coated Iron Oxide Nanoparticles to Incorporate Cisplatin during Synthesis. *Nanomaterials (Basel)*. **2017** Oct 12;7(10):314. doi: 10.3390/nano7100314. (factor de impact- 3,5; Q1).

LUCRĂRI PUBLICATE ÎN REVISTE INDEXATE ISI- co-autor

1. Mocioiu AM, **Tutuianu R**, Cursaru LM *et al.* 3D structures of hydroxyapatite obtained from *Rapana venosa* shells using hydrothermal synthesis followed by 3D printing. *J. Mater. Sci.* **2019**; 54, 13901–13913. <https://doi.org/10.1007/s10853-019-03872-3>. (factor de impact- 3,5; Q1)
2. Rosca AM, Mitroi DN, Cismasiu V, Badea R, Necula-Petrareanu G, Preda MB, Niculite C, **Tutuianu R**, Szedlaczek S, Burlacu A. Collagen regulates the ability of endothelial progenitor cells to protect hypoxic myocardium through a mechanism involving miR-377/VE-PTP axis. *J Cell Mol Med.* 2018 Oct;22(10):4700-4708. doi: 10.1111/jcmm.13712. (factor de impact- 4,6; Q1)
3. Odent Grigorescu G, Rosca AM, Preda MB, **Tutuianu R**, Simionescu M, Burlacu A. Synergic effects of VEGF-A and SDF-1 on the angiogenic properties of endothelial progenitor cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017 Nov;11(11):3241-3252. doi: 10.1002/term.2233. (factor de impact- 4,6; Q2)
4. Gradinaru S, Popescu LM, Piticescu RM, Zurac S, Ciuluvica R, Burlacu A, **Tutuianu R**, Valsan SN, Motoc AM, Voinea LM. Repair of the Orbital Wall Fractures in Rabbit Animal Model Using Nanostructured Hydroxyapatite-Based Implant. *Nanomaterials (Basel)*. **2016** Jan 7;6(1):11. doi: 10.3390/nano6010011. (factor de impact- 3,5; Q2)
5. Preda MB, Rosca AM, **Tutuianu R**, Burlacu A. Pre-stimulation with FGF-2 increases in vitro functional coupling of mesenchymal stem cells with cardiac cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **2015** Aug 21;464(2):667-73. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.055. (factor de impact- 2,3; Q2)
6. Odent Grigorescu G, Preda MB, Radu E, Rosca AM, **Tutuianu R**, Mitroi DN, Simionescu M, Burlacu A. Combinatorial approach for improving the outcome of angiogenic therapy in ischemic tissues. *Biomaterials.* **2015** Aug;60:72-81. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.05.002. (factor de impact- 9,5; Q1)

RECENZII PUBLICATE ÎN REVISTE INDEXATE ISI

1. Roșca AM, **Tutuianu R**, Titorencu ID. Mesenchymal stromal cells derived exosomes as tools for chronic wound healing therapy. *Rom J Morphol Embryol.* 2018;59(3):655-662. PMID: 30534802. (factor de impact- 1,38; Q4)

2. Rosca AM, Rayia DM, **Tutuianu R**. Emerging Role of Stem Cells - Derived Exosomes as Valuable Tools for Cardiovascular Therapy. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2017;12(2):134-138. doi: 10.2174/1574888X10666151026115320. PMID: 26496883. (factor de impact- 2,16; Q2)

COLABORATOR LA UN CAPITOL ÎNTR-O MONOGRAFIE PUBLICATĂ ÎN STRĂINĂTATE

Rosca AM, **Tutuianu R**, Titorencu I. 2020. Advances in skin regeneration and reconstruction in *Frontiers in Stem Cell and Regenerative Medicine Research: vol. 9*, (ed. Atta-ur-Rahman & Shazia Anjum), Bentham Science Publishers, pp. 143-187, ISBN (online): 978-68108-762-7.

COMUNICĂRI PREZENTATE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚICE INTERNAȚIONALE

1. **Tutuianu R**, Rosca AM, Grumezescu AM, Stoica AE, Titorencu I. *In vitro assessment of the effects of silver based nanoparticles on human skin cells involved in the wound healing progress*, 6th Nano Boston Conference, 7-9 decembrie 2020, eveniment virtual, e-poster.
2. **Tutuianu R**, Rosca AM, Grumezescu AM, Stoica AE, Titorencu I. *Silver-based nanoparticles preserve the properties of keratinocytes and dermal fibroblast and can be safely used for skin wound healing*, The 37th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 11th National Congress with International Participation, 20-23 iunie 2018, Constanța, România, Book of abstracts p.131 (poster)- premiul II sesiune postere
3. **Tutuianu R**, Rosca AM, Pruna V, Simionescu M, Titorencu I. *The potential of mesenchymal stromal cell secretome for enhancing the skin cells colonization of 3D collagen scaffolds*, The 36th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 10th National Congress with International Participation, 6-9 iunie 2018, Craiova, România, Book of abstracts p.37 (prezentare orală)
4. **Tutuianu R**, Rosca AM, Pruna V, Albu Kaya MG, Zamfirescu D, Titorencu I, Simionescu M. *Mesenchymal stem cells released factors sustain the population of collagen–alginate scaffolds with human skin cells for dermal reconstruction*, The 35th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology and the 9th National Congress with International Participation, 7-11 iunie 2017, Iași, România, Book of abstracts p. 17 (prezentare orală)-premiul III la Minisimpozionul Doctoranzilor
5. **Tutuianu R**, Popescu M, Preda MB, Simionescu M, Piticescu R, Bulacu A. *Poly(ethylenimine)-coated iron oxide nanoparticles increase the efficiency of intracellular delivery of biologically active factors incorporated either during or after synthesis*, Conferință EMBO “The molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair”, 17-21 septembrie 2016, Paestum, Italia, Book of abstracts p. 135 (poster)

BREVETE

- Depus spre aprobare OSIM: Simionescu M, Rosca AM, Titorencu ID, Iacomî MD, Tutuianu R, Pruna V, Lasca I, Chercherita IA, Neagu PT, Mogoanta L, Mogosanu GD, Pirici ND, Streba CT, Birca AC, Burdusel AC, Stoica AE, Grumezescu AL, Chircov C. HIDROGELURI POLIMERICE COMPOZITE CU PROPRIETĂȚI ANTIBACTERIENE ȘI CICATRIZANTE ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTORA, A/00370 din 25.06.2021
- Aprobat OSIM: Albu MG, Lascar I, Stancu IC, Titorencu I, Zamfirescu DG, Marin S, Lungu A, Nitipir C, Tutuianu R, Simionescu M. SUPORTURI POROASE STRATIFICATE, PENTRU TRATAMENT PERSONALIZAT AL RĂNILOR DIFICILE, ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTORA, RO-BOPI 3/2019, Nr. 133133.

SPECIALIZĂRI ȘI CURSURI EFECTUATE

1. Stagiu de pregătire privind izolarea și caracterizarea exosomilor, coordonat de dr. Magdalena Lorenowicz, 31 iulie-18 august 2018, MSC Biology Group, University Medical Center Utrecht, Olanda
2. Curs internațional “Techniques to validate the isolation of ADSC and their differentiation evaluation”, The 2nd CONGRESS of ISRMS (International Society of Regenerative Medicine and Surgery), 14-16 iunie 2017, București, România.

BURSE OBȚINUTE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL ȘI FINANȚAREA CERCETĂRILOR

Bursă de doctorat- Academia Română (SCOSAAR): 2014-2017

COLABORATOR ÎN GRANTURI NAȚIONALE– 6:

1. PROSKIN- Mesenchymal stromal cells contribution to the reepithelialization process of biomimetic skin cultures by differentiation and paracrine factors, PNIII TE 3/2018;
2. NANOLIFE-Bioactive Nanostructures for Innovative Therapeutic Strategies, PN III PCCDI 45/2018;
3. Zettaskin- Rational design and synthesis of bioactive smart scaffolds for the personalized treatment of acute and chronic wounds, PN II PCCA 201/2014
4. Osseopromote- Multifunctional coatings for load bearing implants made of a novel titanium-based alloy, PN II PCCA 212/2014
5. ComTIsM- Ischemic tissue engineering by combinatorial transplant: piecing together the puzzle to gain mutual benefits for graft survival and host tissue repair, PN II TE 83/2014;
6. THERION- Preclinical model of cell therapy employing protein tyrosine phosphatase-microRNA interplay to optimize neovascularization, PN II PCCA 79/2012.