

RAPORT STIINTIFIC FINAL

Denumirea proiectului: Imbunatatirea proprietatilor paracrine ale fibroblastelor prin agregare tridimensională pentru terapia ranilor cronice

Cod proiect: PN-III-P1-1.1-TE-2021-1344

Numar contract: 149/2022

Perioada de raportare: 9.06.2022 – 7.09.2024

Scopul acestui proiect a fost de a determina daca fibroblastele pot fi o sursa alternativa in terapia de regenerare fara celule, prin imbunatatirea proprietatilor lor paracrine prin declansarea nemozei indusa in cultura tridimensionala. Pentru a atinge acest scop, am avut mai multe obiective: (1) evaluarea proprietatilor secretomului recoltat de la sferoizii derivati din fibroblaste asupra procesului de vindecare a ranilor in vitro, (2) evaluarea modificarii proprietatilor pro-angiogene induse de procesul de agregare a fibroblastelor, (3) evaluarea proprietatilor anti-inflamatorii induse de procesul de agregare si (4) validarea efectelor observate pe model murin de rani excizionale. Un obiectiv aparte l-a constituit Managementul si Diseminarea rezultatelor proiectului.

Proiectul s-a desfasurat in 3 mari etape:

Etapa 1: Evaluarea in vitro a proprietatilor de vindecare a ranilor a secretomului recoltat de la sferoizi derivati din fibroblaste;

Etapa 2: Determinarea proprietatilor pro-angiogene si anti-inflamatoare induse in fibroblaste de procesul de agregare;

Etapa 3: Validarea efectelor benefice in vindecarea ranilor a secretomului recoltat de la sferoizi derivati din fibroblaste pe model animal de rana excizionala.

In urma analizei rezultatelor obtinute in proiect, s-au demonstrat urmatoarele:

In prima etapa a fost selectat secretomul recoltat de la fibroblaste crescute in sferoizi derivati din 25.000 de celule, care a prezentat un potential crescut de a contribui la vindecarea ranilor cutanate, prin sustinerea urmatoarelor procese celulare: inducerea proliferarii si a migrarii keratinocitelor si a fibroblastelor dermale umane, inducerea formarii matricei extracelulare prin stimularea sintezei unor proteine componente ale acesteia precum colagenul de tip I si biglicanul, si prin inhibarea expresiei genice a metaloproteinazelor matriceale si prin stimularea chemoatractiei keratinocitelor.

In cadrul celei de-a doua etape, s-a demonstrat ca sistemul de cultura tridimensionala a indus modificari in compozitia secretomului fibroblastelor dermale, rezultatele in vitro aratand o imbunatatire a capacitatii fibroblastelor dermale umane de a sustine vindecarea ranilor cutanate, accelerand procesul de re-epitelizare a rani. Dintre rezultatele notabile obtinute in Etapa 2 mentionam:

- Prin agregare 3D a fost indusa/crescuta secretia unor factori pro-angiogeni, precum CXCL16, DPPIV, Endostatina, FGF7, HGF, IL-8, MCP-1, PIGF, Prolactina si VEGF. Consideram ca o

importanta deosebita o au: cresterea nivelului de VEGF si inducerea de novo a secretiei de IL-8, ambele fiind cunoscute molecule pro-angiogene.

- Rezultatele obtinute *in vitro*, dar si *in vivo* sugereaza ca modalitatile prin care mediul conditionat obtinut de la fibroblaste crescute in sistem 3D, dar si 2D, promoveaza procesul de angiogeneza, asigurand sustinerea migrarii celulare si chemoatractia. Inducerea maturarii vaselor de sange a fost sustinuta doar de modelul 3D;

- In modelul nostru experimental *in vitro* nu s-a observat o actiune pro sau anti-inflamatoare a mediului conditionat obtinut de la agregatele 3D, insa modificarile observate in profilul citokinelor inainte si dupa agregare sugereaza ca acesta ar putea avea un rol in modularea procesului inflamator, prin cocktailul de molecule cu rol atat de sustinere, cat si de inhibare a acestuia;

- A fost demonstrata implicarea procesului de neoplazie in determinarea secretiei de citokine si factori de crestere a fibroblastelor crescute in sistem 3D.

In cadrul celei de-a treia etape, rezultatele obtinute *in vitro* au fost validate pe un model murin de rana excizionala, care a recapitulat fazele vindecarii pielii umane, inclusiv dezvoltarea unui tesut de granulat, demonstrand ca poate fi folosit pentru o evaluare preclinica a unui posibil tratament.

Utilizand acest model, s-au observat urmatoarele:

- mediul conditionat obtinut de la fibroblaste crescute in sistem 3D a indus o inchidere a ranii mai rapida la 7 zile, comparativ cu controlul tratat cu DMEM si controlul mediul conditionat obtinut de la fibroblastele crescute in sistem 2D;

- S-a observat o maturare a vaselor de sange in cazul animalelor tratate cu mediul conditionat obtinut de la fibroblaste crescute in sistem 3D; acest lucru se coroboreaza cu rezultatele de evaluare a angiogenezei pe pat de Matrigel, raportat in etapa anterioara;

- S-a evidentiat o re-epitelizare mai rapida a tesutului lezat in cazul animalelor tratate cu mediul conditionat obtinut de la fibroblaste crescute in sistem 3D, acest rezultat fiind, de asemenea, in deplina concordanta cu rezultatele *in vitro* pe culturi de celule obtinute in etapele anterioare;

- S-a observat o remodelare mai rapida si mai intensa in cazul animalelor tratate cu mediul conditionat obtinut de la fibroblaste crescute in sistem 3D (Figura 1), sugerand o vindecare profunda a ranii mai rapida comparativ cu celelalte conditii, in concordanta cu rezultatele care aratau ca acest mediu induce o sinteza crescuta a colagenului de tip I in fibroblastele dermale cultivate in sistem clasic;

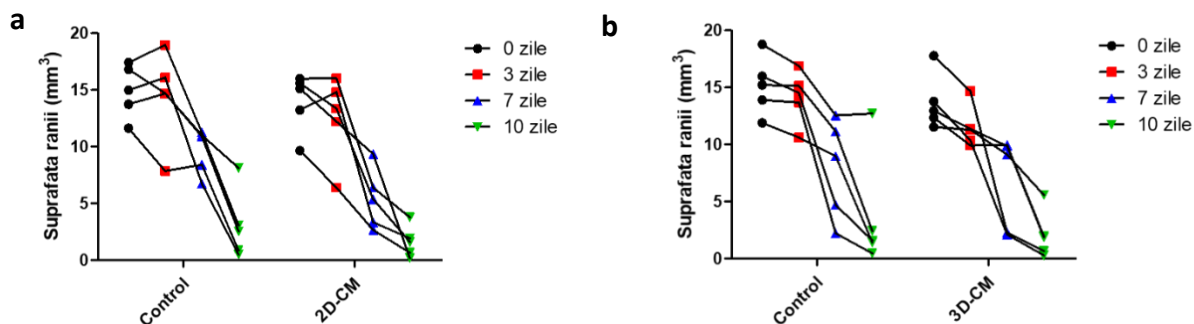


Figura 1. Evolutia in timp a ranii pentru animalele tratate cu mediu conditionat recoltat de la fibroblaste crescute in sistem 2D, respectiv 3D.

- Rezultatele sugereza un proces inflamator scazut la 7 zile la nivelul leziunii, in cazul animalelor tratate cu 3D-CM.

In **concluzie**, putem spune ca procesul de agregare a imbunatatit capacitatea fibroblastelor dermale umane de a sustine vindecarea ranilor cutanate intr-un model de rana pe model murin, accelerand procesul de re-epitelizare a ranii. Astfel, in cadrul acestui proiect, realizarea integrala a activitatilor propuse a dus la demonstrarea ipotezei, sustinand ideea ca fibroblastele ar putea constitui o sursa alternativa pentru terapia regenerativa fara celule, care utilizeaza produsii eliberati de acestea.

Diseminare

Articole ISI publicate/in curs de publicare (membrii echipei proiectului sunt subliniati):

1. Iacomi DM, Rosca AM, Tutuianu R, Neagu TP, Pruna V, Simionescu M, Titorencu I. Generation of an immortalized human adipose-derived mesenchymal stromal cell line suitable for wound healing therapy. Int J Mol Sci. 2022 Aug 10;23(16):8925. (IF = 6.208).
2. Tudoroiu EE, Albu Kaya MG, Titorencu I, Dinu-Pîrvu CE, Marin MM, Rosca AM, Popa L, Anuța V, Antoniac A, Chelaru C, Kaya DA, Prisada RM, Ghica MV. (2023) Design and evaluation of new wound dressings based on collagen-cellulose derivatives, Materials & Design, 236: 112469 (IF = 8.4)
3. Luca I, Albu Kaya MG, Titorencu I, Dinu-Pîrvu CE, Marin MM, Popa L, Rosca AM, Antoniac A, Anuța V, Ghica MV, Physico-chemical characterization and biocompatibility evaluation of some vaginal formulations based on collagen and mucoadhesive polymers, *in revizie*.

Articole ISI in preparare:

1. Dănilă E, Albu Kaya MG, Marin MM, Titorencu I, Rosca AM, Coman AE and Constantinescu RR. Extraction and characterization of fish collagen hydrogel from northern pike (Esox lucius) with potential application in skin wound healing– manuscris in preparare;
2. Ghetu (Iacomi) DM, Tutuianu R, Simionescu M, Titorencu I, Rosca AM. Three-dimensional organization of human dermal fibroblasts enhances their paracrine role in skin wound healing - manuscris in preparare;
3. Ghetu (Iacomi) DM, Tutuianu R, Simionescu M, Titorencu I, Rosca AM. 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 - manuscris in preparare.

Capitol de carte:

1. Rosca AM, Tutuianu R, Ghetu (Iacomi) DM, Titorencu I. (2023). Mesenchymal Stromal Cells for Wound Healing Therapy: From Expectations to Reality. In: Haider, K.H. (eds) Handbook of Stem Cell Applications. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-0846-2_53-1.

Postere:

1. Tutuianu R, Rosca AM, Ghetu (Iacomi) DM, Pruna V, Albu Kaya MG. „Evaluation of mesenchymal cells-derived products as therapeutics for skin regeneration”. Poster prezentat la manifestatia stiintifica “1st NETSKINMODELS Network event” organizata la Bratislava, Slovacia, 14-18 februarie 2023.
2. Tutuianu R, Rosca AM, Ghetu (Iacomi) DM, Titorencu I, Rosca AM. Mediul conditionat derivat de la fibroblaste cultivate in sferoizi promoveaza regenerarea pielii pe un model murin de rana cutanata; Poster prezentat la manifestatia stiintifica Simpozionul ARSAL 2024 „Evaluarea severității și conceptul 3R in proiectele ce folosesc animale în experimentare”, 29 martie 2024, organizat de Asociația Română pentru Știința Animalelor de Laborator, gazduita de Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale "Victor Babeș".

Prezentare orală:

Irina Titorencu. “MSC based therapy for diabetic chronic wounds”. Prezentare in manifestatiei stiintifica “1st NETSKINMODELS Network event” organizata la Bratislava, Slovacia, 14-18 februarie 2023.

Crearea si mentinerea unei pagini web.

A fost realizata si actualizata pagina web a proiectului: http://www.icbp.ro/static/en/en-networking_grants-grants-national_grants/fibrother.html

Pagina web a acestui proiect a fost actualizata cu informatiile la zi si se va reveni la aceasta pe masura ce vor aparea alte rezultate obtinute ca urmare a desfasurarii acestui proiect, inclusiv dupa terminarea proiectului.

Director Proiect,
(Nume, Prenume, Semnatura)

Rosca Ana-Maria

