

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "VICTOR
BABEȘ" TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL III – ȘTIINȚE FUNCȚIONALE

BĂRBULESCU GRETA-IONELA



TEZĂ DE DOCTORAT

BIOTEHNOLOGII INOVATOARE PENTRU
OBȚINEREA ȚESUTULUI CARDIAC PE UN MODEL
ANIMAL

REZUMAT

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. VIRGIL PĂUNESCU

Timișoara
2023

CUPRINS

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE.....	VI
LISTĂ TABELE ȘI FIGURI.....	VII
LISTĂ ABREVIERI.....	IX
MULȚUMIRI.....	XII
INTRODUCERE.....	XIII
PARTEA GENERALĂ – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	1
1. Materiale cheie pentru bioingineria țesutului cardiac.....	1
1.1. Matrici de origine naturală.....	3
1.1.1. Matricea extracelulară decelularizată (dECM) derivată din țesut nativ.....	3
1.1.2. dECM derivată din cultură celulară.....	5
1.2. Surse celulare.....	6
1.3. Semnale.....	9
2. Metode de decelularizare a matricei extracelulare.....	11
2.1. Decelularizarea bazată pe tratament chimic.....	12
2.2. Decelularizarea enzimatică.....	15
2.3. Decelularizarea fizică.....	17
2.4. Combinarea metodelor chimice, enzimatice și fizice.....	24
3. Evaluarea critică și optimizarea matricei cardiace decelularizate.....	26
3.1. Compoziția și funcția matricei cardiace decelularizate.....	26
3.2. Cuantificarea decelularizării complete.....	29
3.3. Postprocesarea matricei extracelulare: reticulare, sterilizare, dezinfectare și modificare.....	31
3.4. Validarea preclinică.....	34
PARTEA SPECIALĂ – CONTRIBUȚII PERSONALE.....	37
1. Materiale și metode.....	37
1.1. Animale.....	37
1.1.1. Protocolul anestezic-chirurgical.....	37
1.1.2. Canularea inimii.....	39
1.2. Decelularizarea întregii inimi prin perfuzie coronariană utilizând un dispozitiv experimental Langendorff modificat.....	41
1.2.1. Comportamentul în câmp electric al SDS.....	41
1.2.2. Designul experimental al dispozitivului de decelularizare.....	42
1.2.3. Protocolul de implementare al dispozitivului.....	45
1.3. Măsurarea spectrofotometrică a concentrației de ADN și proteine totale din soluția de decelularizare.....	47
1.4. Sistemul de monitorizare al procesului de decelularizare.....	50
1.4.1. Colectarea datelor și evaluarea spectrometrică.....	52
1.4.2. Antrenarea și testarea rețelelor neuronale artificiale (ANN).....	53
1.5. Caracterizarea matricei extracelulare.....	56

1.5.1. Evaluarea macroscopică.....	56
1.5.2. Analiza prin microscopie optică (OM).....	56
1.5.3. Analiza prin microscopie electronică de scanare (SEM).....	61
1.6. Cultura celulară a celulelor stem mezenchimale umane (hMSCs)	62
1.6.1. Tripsinizare.....	63
1.6.2. Numărarea celulelor.....	64
1.6.3. Evaluarea caracteristicilor morfologice și imunofenotipice ale hMSCs.....	65
1.6.3.1. Microscopia electronică de scanare (SEM).....	65
1.6.3.2. Microscopia electronică de transmisie (TEM).....	65
1.6.3.3. Imunocitochimie (ICC).....	66
1.6.3.4. Citometria de flux (FC).....	67
1.7. Recelularizarea matricei decelularizate folosind hMSCs.....	69
2. Rezultate.....	72
2.1. Obținerea de matrici cardiace acelulare utilizând decelularizarea prin perfuzie.....	72
2.1.1. Compararea protocoalelor de decelularizare.....	72
2.1.2. Evaluarea permeabilității arterelor coronare.....	76
2.2. Cuantificarea ADN-ului și a proteinelor.....	77
2.3. Optimizarea decelularizării inimii de șobolan utilizând un model de rețea neuronală convoluțională cu învățare profundă (DCNN).....	81
2.4. Evaluarea îndepărtării materialului celular și păstrarea integrității arhitecturii ECM.....	83
2.4.1. Analiza macroscopică.....	83
2.4.2. Evaluarea histologică și prin microscopie electronică.....	84
2.5. Caracterizare in vitro a hMSCs.....	90
2.5.1. Analiza morfologică a hMSCs.....	90
2.5.2. Analiza imunofenotipică a hMSCs.....	93
2.5.2.1. Imunocitochimie (ICC).....	93
2.5.2.2. Citometria de flux (FC).....	95
2.6. Obținerea unei inimi bioartificiale de șobolan.....	100
3. Discuții.....	103
3.1. Dezvoltarea unui protocol eficient de decelularizare a inimilor de șobolan bazat pe perfuzie.....	104
3.2. Un cadru interdisciplinar pentru caracterizarea ECM.....	108
3.3. Ingineria țesutului cardiac muscular.....	110
CONCLUZII.....	113
1. Contribuții personale.....	114
2. Direcții viitoare de cercetare.....	115
REFERINȚE.....	116
ANEXE.....	I

CUVINTE CHEIE: decelularizare cardiacă, matrice extracelulară decelularizată (dECM), celule stem mezenchimale (MSCs), recelularizare, rețele neuronale convoluționale cu învățare profundă (DCNN);

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE

1. **Barbulescu GI**, Bojin FM, Ordodi VL, Goje ID, Barbulescu AS, Paunescu V. Decellularized Extracellular Matrix Scaffolds for Cardiovascular Tissue Engineering: Current Techniques and Challenges. *IJMS*. 2022 Oct 27;23(21):13040. (**Impact Factor = 6.208**)
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36361824/>
<https://doi.org/10.3390/ijms232113040>
2. **Barbulescu GI**, Buica TP, Goje ID, Bojin FM, Ordodi VL, Olteanu GE, et al. Optimization of Complete Rat Heart Decellularization Using Artificial Neural Networks. *Micromachines*. 2022 Jan 2;13(1):79. (**Impact Factor = 3.523**)
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35056244/>
<https://doi.org/10.3390/mi13010079>
3. **Barbulescu GI**, Bojin FM, Ordodi VL, Goje ID, Buica TP, Gavriluc OI, et al. Innovative Biotechnology for Generation of Cardiac Tissue. *Applied Sciences*. 2021 Jun 17;11(12):5603. (**Impact Factor = 2.838**)
<https://doi.org/10.3390/app11125603>
4. **Barbulescu GI**, Bojin F, Ordodi V, Anghel S, Gavriluc O, Paunescu V. Human Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Cardiomyocytes for Cardiac Applications. *Fiziologia – Physiology*, 2019 vol. 29, 1(97):5-12.
http://revista_fiziologia.umft.ro/archives/Fiziologia_Physiology_No.1_2019.pdf
5. Bonciog D, Matiu-lovan L, **Barbulescu G**, Burian C, Goje D, Buica P, et al. Modified Langendorff Device for Rat Heart Decellularization. *Fiziologia – Physiology*, 2019, vol. 29, 2(98):17-20.
http://revista_fiziologia.umft.ro/archives/Fiziologia_Physiology_No.2_2019.pdf

INTRODUCERE

Tratamentul definitiv pentru insuficiența cardiacă în stadiul terminal este transplantul cardiac. Pacienții cu această afecțiune au o calitate scăzută a vieții și necesită internări și intervenții repetate. Există limite fundamentale ale transplantului de inimă pentru care oamenii de știință caută în mod constant soluții. În primul rând, deficitul cronic de donatori de organe este o piedică semnificativă. În fiecare an, numărul pacienților așteptând un transplant de inimă crește mai rapid decât numărul de donatori eligibili. Această circumstanță regretabilă a fost observată în Statele Unite și în Europa. În al doilea rând, necesitatea imunosupresiei pe termen lung după transplant și menținerea unui echilibru între respingere și infecție afectează semnificativ rata de supraviețuire pe termen lung.

Pentru a aborda aceste obstacole, cercetătorii din domeniul bioingineriei cardiovasculare au inițiat dezvoltarea de soluții inovatoare. Unii se concentrează pe extinderea disponibilității organelor, în timp ce alții își propun să reducă reacția imunologică față de inimile donatorului. Aceste idei complementare au inspirat dezvoltarea de substituenți biologici capabili să restaureze, să îmbunătățească sau să păstreze funcția țesutului. Scopul este de a crea o structură suport capabilă să imite caracteristicile unui miocard nativ și să promoveze supraviețuirea țesutului și dezvoltarea celulelor cardiovasculare.

Crearea unei inimi bioartificiale funcționale este un proces extrem de complex și reprezintă o zonă de cercetare medicală de ultimă generație cu potențialul de a revoluționa tratamentul bolilor de inimă. Primul pas implică decelularizarea organului pentru a genera o matrice extracelulară (ECM) tridimensională. În prezent, ingineria țesuturilor oferă o varietate de strategii de decelularizare bazate pe procese fizice, biologice și chimice. Recelularizarea reprezintă tehnica de repopulare a scheletului acelușar cu celule specifice organului pentru a recrea funcția acestuia. Aceasta este a doua fază în dezvoltarea unei inimi bioartificiale. Tehnologia celulelor stem a câștigat tot mai multă atenție datorită capacității celulelor multipotente de auto-regenerare și producție de cardiomiocite (CMs).

OBIECTIVELE CERCETĂRII

Obiectivele propuse în prezentul studiu de cercetare sunt următoarele:

1. Analiza critică a datelor din literatura de specialitate, cu accent pe tehnici actuale și provocări în decelularizarea cardiacă.
2. Dezvoltarea, proiectarea și implementarea unui dispozitiv experimental pentru decelularizarea inimii de șobolan:
 - Dispozitiv modificat controlat prin presiune, bazat pe principiul Langendorff;
 - Dispozitiv experimental Langendorff modificat în prezența unui câmp electric rectangular alternativ care permite decelularizarea mai rapidă a inimilor de șobolan, reducând timpul de expunere a țesutului la detergent, care s-a dovedit a fi agresiv față de matricea extracelulară;

3. Dezvoltarea unei aplicații software bazate pe un model de rețea neuronală convoluțională cu învățare profundă (DCNN), antrenată să distingă între diferite stadii de decelularizare, stabilind momentul precis al finalizării procesului.
4. Evaluarea modelului experimental de decelularizare utilizând următoarele metode:
 - Testarea dispozitivului experimental și procesarea matematică a datelor obținute prin determinări fizico-chimice;
 - Descrierea decelularizării complete utilizând analiza histologică și de microscopie electronică;
5. Dezvoltarea setărilor experimentale pentru generarea unei inimi de șobolan bioartificiale:
 - Evaluarea *in vitro* a caracteristicilor morfologice și imunofenotipice ale celulelor stem mezenchimale umane (hMSC), ca posibile celule pentru procedura de recelularizare;
 - Diferențierea *ex vivo* a hMSC în cardiomiocite (CMs) utilizând 5-azacitidină pentru recelularizarea inimii de șobolan;
 - Evaluarea macroscopică și microscopică *in vitro* a inimii de șobolan recelularizate;

PARTEA GENERALĂ

Ingineria unei inimi reprezintă o călătorie incredibilă cu obiectivul dificil de a furniza un substitut de organ biocompatibil pentru pacienții cu insuficiență cardiacă în stadiul terminal. Provocarea a început în 2008, când Ott și colab. au fost pionierii primei încercări de a dezvolta o inimă bioartificială.

Primul pas în proces implică decelularizarea unui organ animal sau uman, rezultând în crearea unei matrici extracelulare (ECM) tridimensionale (3D) obținute în mod natural. Diverse tehnici fizice, biologice și chimice au fost utilizate pentru decelularizarea țesuturilor, cu grade variabile de succes. Detergenții ionici, cum ar fi dodecilsulfatul de sodiu (SDS), sunt cei mai eficienți în îndepărtarea materialului celular, fiind un component esențial al majorității protocoalelor de decelularizare. Cu toate acestea, decelularizarea poate cauza deteriorarea ECM prin înlăturarea componentelor critice pentru adeziunea, creșterea și migrarea celulară. Deoarece degradarea ECM este un proces chimic, reducerea timpului de decelularizare va lăsa matricea acelulară cu un procent mai mare de molecule intacte necesare pentru recelularizare.

Al doilea pas în dezvoltarea unei inimi bioartificiale este recelularizarea, adică repopularea unui schelet acelular cu celule specifice organului pentru a recrea funcția acestuia. Tehnologia cu celule stem a câștigat o atenție tot mai mare datorită celulelor multipotente capabile să genereze cardiomiocite. Mai multe studii au dovedit că celulele stem embrionare, celulele stem mezenchimale umane (hMSCs) și celulele stem pluripotente induse (iPSCs) induc cardiomiogeneză. În special, MSCs sunt celule stem multipotente găsite

în țesuturile adulte, cu capacități excelente de diferențiere, fiind utilizate în tratamentul bolilor cardiace.

Cu toate acestea, recelularizarea eficientă a matricilor extracelulare decelularizate nu a fost încă realizată. Strategiile actuale de recelularizare pentru scheletul cardiac sunt limitate de supraviețuirea celulară slabă pe termen lung, distribuția inomogenă a celulelor și alegerea corectă a celulelor pentru generarea funcției inimii.

PARTEA SPECIALĂ – CONTRIBUȚII PERSONALE

1. MATERIALE ȘI METODE

1.1. Animale

Studiul a fost realizat în conformitate cu recomandările ARRIVE și a fost aprobat de către Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Victor Babeș" din Timișoara (Nr. 10/16.02.2021). Experimentele au respectat cerințele reglementare pentru studiul animalelor de laborator și au fost efectuate într-o unitate acreditată.

1.2. Decelularizarea întregii inimi prin perfuzie coronariană utilizând un dispozitiv experimental Langendorff modificat

Acest studiu a folosit douăzeci de șobolani adulți de sex masculin, rasa Sprague-Dawley, cu o greutate cuprinsă între 250-350 g (12-16 săptămâni) pentru generarea inimilor decelularizate. După explantare, inimile ($n=20$) au fost decelularizate folosind un dispozitiv experimental Langendorff modificat. Dispozitivul experimental respectă principiul descris de Langendorff. Soluția de decelularizare este aspirată din camera de decelularizare de către pompa peristaltică și reintrodusă în inimă prin intermediul canulei. Presiunea de perfuzie a inimii este presiunea pe ramura de descărcare a pompei peristaltice și este monitorizată de transductorul de presiune. Funcționarea pompei peristaltice este controlată de sistemul de automatizare. Leșirea acestui sistem ajunge la un amplificator de putere și, prin intermediul unui releu cu stare solidă, controlează funcționarea pompei peristaltice. Zece inimi au fost decelularizate în absența câmpului electric (protocolul 1 - grupul de control), iar celelalte zece în prezența unui câmp electric rectangular alternativ (protocolul 2 - grupul cu câmp electric). Inimile au fost perfuzate cu SDS 1% în apă deionizată timp de 16 ore, la aproximativ 80 mmHg. O pompă peristaltică a fost folosită pentru perfuzia inimii, recirculând soluția de decelularizare pe toată durata experimentului. Inima a fost complet acoperită cu soluție în interiorul recipientului de sticlă, constituind celula electrochimică. Doi electrozi din oțel inoxidabil de tip placă (suprafața fiecărui electrod fiind aproximativ 14 cm^2) au fost plasați pe recipient pentru a genera câmpul electric necesar decelularizării. Cei doi electrozi au fost accesibili din exteriorul celulei electrochimice. Pentru generarea câmpului electric alternativ, a fost utilizat un generator de funcții, programat pentru a produce un semnal

electric rectangular, cu o frecvență constantă (20 kHz) și amplitudine (100 mA), corespunzătoare unei densități de curent de 7.14 mA/cm².

1.3. Măsurarea spectrofotometrică a concentrației de ADN și proteine totale din soluția de decelularizare

Studiul de față propune o metodă de analiză cinetică a eliberării de ADN și proteine din inimă în timpul decelularizării, pentru a compara rezultatele celor două protocoale (protocolul 1 - grupul de control și protocolul 2 - grupul cu câmp electric). Ipoteza de lucru afirmă că atunci când concentrația de ADN și proteine devine constantă, nu mai sunt eliberate molecule în soluția de decelularizare, iar procesul poate fi considerat finalizat.

În timpul procedurilor experimentale de decelularizare, s-au prelevat mostre din soluția de decelularizare la intervale de timp presetate conform protocolului pentru măsurarea spectrofotometrică a concentrației de ADN și proteine totale, folosind spectrofotometrul NanoDrop ND-1000. Mostrele (10 μ l fiecare) au fost colectate folosind o micropipetă automată direct din rezervorul de decelularizare la fiecare 30 de minute. S-a presupus o creștere aproape liniară a ADN-ului și proteinelor, urmată de un platou pe măsură ce celulele sunt îndepărtate treptat, finalizând procesul. Cele două protocoale de decelularizare au putut fi comparate în funcție de timpul necesar pentru decelularizarea completă. Prin urmare, este dorită accelerarea procesului de decelularizare pentru a reduce timpul de expunere a inimii la SDS, cunoscând acțiunea potențial dăunătoare asupra ECM. Toate inimile au fost cântărite înainte de procesul de decelularizare, fără diferențe semnificative între cele două grupuri. Greutatea medie a inimilor de șobolan după disecție a fost de 1.28 ± 0.12 grame.

1.4. Sistemul de monitorizare al procesului de decelularizare

Fiecare sesiune de decelularizare a trebuit supervizată datorită colectării mostrelor la intervale de timp prestabilite pentru analiza spectrofotometrică. Ca răspuns, am încercat să utilizăm inteligența artificială pentru software-ul de învățare a recunoașterii imaginilor pentru a stabili momentul exact în care inima șobolanului este decelularizată. A fost dezvoltat un sistem de monitorizare pentru a demonstra o corelație puternică între datele colectate prin prelevarea periodică a soluției de decelularizare și starea inimii, care poate fi vizualizată cu ajutorul unui spectrometru bazat pe OpenCV. Sistemul de monitorizare cuprinde următoarele elemente: modul Desktop, modul Arduino, motor pas cu pas, cameră web, bază de date și foldere de sesiuni.

Imaginile sunt salvate în același folder iar în baza de date avem asocierea cu metricile corespunzătoare pentru fiecare imagine. Serviciul de spectrometru a procesat fiecare imagine, obținând o metrică a spectrometrului prin extragerea pixelilor inimii. Valoarea medie a fost calculată pentru fiecare ciclu datorită numărului mare de imagini colectate. Aceste metrici au fost stocate în baza de date împreună cu datele legate de sesiune. S-a stabilit că atunci când aspectul vizual al inimii încetează să se schimbe, metrica atinge un platou, ceea ce înseamnă că inima este decelularizată și procesul este complet. Timpul de

decelularizare obținut a fost, de asemenea, normalizat la greutatea unitară a fiecărei inimi implicate în experiment.

Serviciul de clasificare a fost construit cu un model DCNN antrenat pentru a clasifica gradul de finalizare al imaginilor colectate în timpul procesului de decelularizare. O sesiune de decelularizare conține până la 50,000 de imagini colectate cu rezoluție de 1,280×720 pixeli. Cu toate acestea, zona inimii a fost decupată, eliminând pixelii inutili și redimensionând imaginea la rezoluția de 200×200 pixeli pentru a reduce resursele necesare pentru antrenarea unui model pe un astfel de set de date.

După proiectarea metricii spectrometrului și detectarea platoului său, am împărțit setul de date al imaginilor în 11 colecții (segmente egale ale părților sesiunii). Ultima colecție conținea imagini de la sfârșitul sesiunii, unde metrica spectrometrului a atins platoul.

Modelul DCNN a fost antrenat pe 72,417 de imagini utilizând augmentarea imaginii pentru a ajuta la generalizarea antrenamentului cu acest set de date. Validarea a fost realizată pe 9,061 de imagini care nu au fost folosite în timpul antrenamentului. Testarea a fost efectuată utilizând 9,060 de imagini pe care modelul nu le-a întâlnit niciodată în timpul antrenamentului și validării. Acest proces a rezultat într-un model cu o acuratețe de 95%.

Metrica de clasificare a fost calculată făcând media tuturor rezultatelor clasificării de la fiecare pas al unui cerc complet al unei ferestre rulante mobile. Teoria noastră a fost că fiecare metrică ar trebui să înceapă la 0% și să se termine la 100% în cazul decelularizării complete. Această metrică a afișat o bară de progres în vizualizarea sesiunii de înregistrare pentru a ne permite aflarea momentului finalizării procesului de decelularizare.

1.5. Caracterizarea matricei extracelulare

În acest studiu, decelularizarea a fost considerată completă atunci când nu a mai existat nicio urmă de țesut miocardic rămas. De obicei, scheletele de inimă decelularizate sunt evaluate utilizând o combinație de tehnici macroscopice și microscopice. Inimile decelularizate au fost fixate în soluție tamponată de formaldehidă 4%, incluse în parafină și secționate. Au fost analizate trei regiuni: apical, mediu și bazal. După rehidratare, secțiunile au fost colorate mai întâi cu hematoxină și eosină (H&E). Pentru a valida eficacitatea protocolului de decelularizare și integritatea scheletului rezidual, au fost utilizate, de asemenea, tehnici de colorare cu tricrom Masson, impregnare argentică și orceină pentru vizualizarea țesutului conjunctiv. Microscopia electronică de scanare (SEM) a fost utilizată pentru caracterizarea modificărilor morfologice după decelularizare.

1.6. Cultura celulară a celulelor stem mezenchimale umane (hMSCs)

Celulele stem mezenchimale umane (hMSCs) au fost achiziționate de la Lonza (Basel, Elveția) și au fost cultivate la o densitate celulară de 10,000 de celule/cm². Celulele au fost crescute în mediul de cultură α -MEM conținând 10% ser fetal de vițel (FCS) și soluție de penicilină/streptomicină (Pen/Strep 10,000

UI/ml). MSC-urile umane au proliferat ca celule aderente în flacoane de cultură T75 până la o confluență celulară de 80-90%, moment în care celulele au fost detașate de suprafață folosind o soluție de tripsină/EDTA. După numărare, celulele au fost plasate la aceeași densitate celulară în flacoane de cultură adecvate pentru extinderea ulterioară sau alte investigații. Pentru analiza morfologică a hMSCs, s-au utilizat două tehnici de vizualizare cu rezoluție înaltă: microscopie electronică de scanare (SEM) și microscopie electronică de transmisie (TEM). Prin utilizarea imunocitochimiei (ICC), hMSCs cultivate au fost colorate pentru markeri caracteristici de suprafață și intracelulari, dezvăluind expresia moleculelor implicate în funcțiile celulare. De asemenea, s-a efectuat citometrie de flux pentru a valida prezența markerilor caracteristici ai hMSCs.

1.7. Recelularizarea matricei decelularizate folosind hMSCs

Scheletele extracelulare cardiace (n=8), obținute prin decelularizare din grupul de control (n=4) și din grupul de câmp electric (n=4), au fost utilizate pentru bioingineria inimii de șobolan. Inițial, inimile decelularizate au fost perfuzate cu soluție salină tampon (PBS) timp de 72 de ore.

Diferențierea hMSCs în cardiomiocite (CMs) a fost realizată *ex vivo* utilizând 5-azacitidină (5-aza), observându-i influența asupra cardiomiogenezei.

Protocolul a livrat hMSCs ($\sim 5\text{-}7 \times 10^9$ celule) direct cu $10 \mu\text{M}$ de 5-azacitidină suspendată în mediu de diferențiere. Aproximativ jumătate din aceste celule au fost livrate prin infuzie timp de 24 de ore prin aorta patentă pentru însămânțarea celulară. Cealaltă jumătate a fost livrată prin 4 injecții de câte 200 μl fiecare în grosimea peretelui ventricular al inimii decelularizate. Ulterior, mediul a fost schimbat la fiecare 24 de ore cu mediu de cultură standard pentru MSCs. Inimile (n=8) au fost menținute timp de trei săptămâni într-un incubator de cultură tisulară cu 5% CO_2 și carbogen umidificat (5% CO_2 și 95% O_2) adăugat în rezervorul de mediu. La sfârșitul experimentelor, am descris matricea extracelulară cardiacă recelularizată utilizând colorarea cu hematoxilină și eozină.

2. REZULTATE

2.1. Obținerea de matrici cardiace aceluare utilizând decelularizarea prin perfuzie

Dcelularizarea a fost considerată finalizată atunci când nu a mai existat nicio urmă de țesut miocardic rămas. Analiza macroscopică a matricei extracelulare după procesul de decelularizare a arătat o geometrie tridimensională intactă, cu menținerea arhitecturii atriale, ventriculare și valvulare. Fotografiile realizate în timpul decelularizării au sugerat o decelularizare mai eficientă și mai rapidă în grupul de câmp electric (~ 480 de minute) în comparație cu grupul de control (~ 840 de minute).

După decelularizare, integritatea arborelui vascular coronarian a fost verificată prin injectarea unei soluții de albastru de tripan printr-un cateter conectat. Întregul proces a fost înregistrat, iar intrarea soluției albastre în

sistemul coronarian a fost vizualizată, fără evidențierea problemelor legate de calibrul vaselor.

2.2. Cuantificarea ADN-ului și a proteinelor

Concentrația de ADN și proteine în soluția de decelularizare a fost calculată utilizând spectrofotometria de absorbție ultravioletă. În ambele protocoale de decelularizare, metoda grafică a determinat momentul în care analiții (acizii nucleici sau proteine) au atins o valoare constantă, adică "platoul curbei de concentrație", demonstrând ipoteza de lucru expusă în capitolul anterior, conform căreia atunci când concentrația de ADN și proteine devine constantă, nu mai sunt eliberate molecule în soluția de decelularizare, confirmând finalizarea decelularizării.

S-au observat corelații bune între valorile medii ale concentrației de ADN/proteine și timpul procedurii în grupul de control ($r=0.93$; $p<0.0001$; CI95% [0.872-0.968], și $r=0.92$; $p<0.0001$; CI95% [0.853-0.962], respectiv). Similar, când grupul de câmp electric a fost analizat, s-au găsit următoarele corelații între valorile medii ale concentrației de ADN/proteine și timpul procedurii: $r=0.88$; $p<0.0001$; CI95% [0.783-0.943], și $r=0.90$; $p<0.0001$; CI95% [0.821-0.954], respectiv.

Pe baza informațiilor furnizate utilizând metoda spectrofotometrică, se poate concluziona că utilizarea dispozitivului experimental Langendorff în prezența unui câmp electric rectangular alternativ reduce timpul de decelularizare cu aproximativ 40%. Acest protocol reprezintă o abordare promițătoare pentru accelerarea decelularizării, conducând în final la o metodă mai rapidă și mai eficientă pentru obținerea de matrici acelulare în aplicațiile de inginerie tisulară.

2.3. Optimizarea decelularizării inimii de șobolan utilizând un model de rețea neuronală convoluțională cu învățare profundă (DCNN)

Studiul prezent a dezvoltat un serviciu de clasificare utilizând un model DCNN antrenat pentru a clasifica gradul de finalizare al imaginilor colectate în timpul decelularizării. Modelul a fost antrenat pe matricea extracelulară a inimii de la șobolani masculi ($n=10$) obținută folosind protocolul 2 de decelularizare (perfuzie coronariană cu SDS 1% în prezența unui câmp electric rectangular alternativ). Sistemul a asigurat achiziționarea, procesarea și analiza inimii de șobolan în timpul decelularizării. Datele experimentale au permis stabilirea momentului exact în care organul a devenit translucid, încheind astfel procesul. Prin corelarea graficelor spectrofotometrice cu metricile produse de spectrometru și serviciile de clasificare, am putut afirma că modelul a optimizat procesul de decelularizare, oferind o estimare a progresului. Ca măsură de performanță, metricile sistemului de clasificare pentru inimile de aproximativ aceeași vârstă și greutate au fost: precision=0.95, recall=0.95, scor F1=0.95 și accuracy=0.95.

În concluzie, am dezvoltat și validat o aplicație software asistată de inteligență artificială pentru a determina prin clasificare când inima este complet

decelularizată și, în timpul procesului, pentru a oferi o estimare a progresului. Corelația dintre spectrofotometrie și metricile generate de spectrometru și serviciile de clasificare a confirmat teoria noastră. Acest studiu demonstrează, pentru prima dată, relația dintre eliminarea celulelor în timpul decelularizării prin perfuzie și cele două metrici produse de un spectrometru bazat pe OpenCV și un model de clasificare bazat pe DCNN. Aceasta reprezintă o evaluare nouă a eficienței decelularizării utilizând o tehnică non-invazivă. De asemenea, în locul colectării probelor din soluția de decelularizare, spectrometrul și clasificatorul pot estima starea decelularizării în timp real, optimizând astfel vechiul proces. Această cercetare ar putea duce la un nou standard pentru decelularizarea inimii, încurajând astfel progrese semnificative în medicina regenerativă.

2.4. Evaluarea îndepărtării materialului celular și păstrarea integrității arhitecturii ECM

Evaluarea îndepărtării materialului celular și păstrarea integrității arhitecturii matricei extracelulare s-a realizat prin analiză macroscopică de bază, evaluare histologică și microscopie electronică. Inima de șobolan decelularizată a devenit translucidă, cu toate componentele celulare eliminate în timpul decelularizării. Scheletul acelular a menținut forma și dimensiunea generală, cu toate caracteristicile anatomice majore intacte. Eficiența decelularizării a fost validată prin mai multe metode de colorare diferite. Ca prim pas, metoda simplă de colorare cu hematoxilină și eozină (H&E) a demonstrat îndepărtarea celulelor, păstrând în același timp matricea extracelulară tridimensională. Păstrarea fibrelor de collagen și eliminarea conținutului nuclear din inimile decelularizate a fost evidențiată utilizând colorația tricromă Masson. Colorația cu orceină și impregnarea argentică au vizualizat fibrele elastice, respectiv fibrele reticulare. Microscopia electronică de scanare a scheletului cardiac tridimensional a consolidat rezultatele microscopiei optice, arătând fibre de collagen, fără componente celulare rămase. Evaluarea conținutului inimii decelularizate utilizând microscopia nu a arătat diferențe semnificative între inimile generate de cele două protocoale de decelularizare.

2.5. Caracterizare in vitro a hMSCs

Studiul de față a efectuat o caracterizare detaliată *in vitro* a hMSCs folosind SEM și TEM ca tehnici de vizualizare cu rezoluție înaltă. Rezultatele au arătat celule intens metabolic active, cu organite structurale bine dezvoltate, creând premise pentru o ulterioară diferențiere către CMs. De asemenea, am efectuat o analiză imunofenotipică, colorând hMSCs pentru markeri caracteristici de suprafață și intracelulari după cum urmează: CD105 - exprimat la nivelul suprafeței la 100% dintre hMSC, CD117 - exprimat la nivelul suprafeței la 90% dintre hMSCs, vimentin - exprimat la nivelul suprafeței la 100% dintre hMSCs, Ki67 - exprimat la nivel nuclear la 60% dintre hMSCs. Evaluarea prin citometrie de flux a arătat exprimarea markerilor caracteristici hMSCs: CD90, CD44, CD29, CD73 și CD105. Acești markeri au o expresie constantă pe parcursul mai multor pasaje celulare (P1-P4), în timp ce alți markeri scad sau își

pierd expresia, pe măsură ce celulele suferă proliferare și expansiune *in vitro* (CD31, CD117, CD95). Cu toate acestea, acest model de expresie de la P1 la P4 indică pierderea unor funcții ale hMSCs, necesare pentru experimentele de medicină regenerativă și sugerează utilizarea acestora în pasajele incipiente pentru rezultate îmbunătățite în regenerarea diferitelor țesuturi.

2.6. Obținerea unei inimi bioartificiale de șobolan

Această cercetare extinsă a realizat, de asemenea, recelularizarea *ex vivo* a inimilor de șobolan decelularizate (n=8) utilizând hMSCs diferențiate în CMs folosind 5-azacitidină ($\sim 5-7 \times 10^9$ celule). Dintr-o perspectivă macroscopică, atât atriile, cât și ventriculii inimii recelularizate au prezentat pereți cardiaci bine definiți. Vasele de sânge erau vizibile prin grosimea inimii. La baza masei ventriculare s-a putut vizualiza o concentrație de benzi fibroase, care ar putea fi cito-scheletul fibros al inimii. Diferite regiuni ale inimilor recelularizate au fost colorate cu hematoxină și eozină pentru a confirma prezența unui număr mare de celule diseminate în scheletul cardiac. Țesutul examinat a conținut celule asemănătoare cardiomiocitelor (CLCs) aranjate în mod liber, cu ramificații vizibile, striatii încrucișate și nuclee vizibile. Chiar dacă arhitectura histologică era atipică, se putea observa totuși o organizare structurală. Pe materialul examinat, aproximativ 20% din matrice era compusă din celule cu nuclee vizibile, intercalate cu zone acelulare și zone de densitate celulară ridicată.

CONCLUZII

- Dispozitivul experimental modificat cu control al presiunii permite decelularizarea completă a inimilor de șobolan perfuzate cu o soluție surfactantă de 1 % dodecilsulfat de sodiu (SDS).
- Aplicarea unui câmp electric alternativ rectangular (20 kHz) în sistemul de decelularizare Langendorff crește semnificativ eficiența procesului (timpul de decelularizare este redus cu aproximativ 40% în comparație cu grupul de control). Alegerea agentului de decelularizare adecvat, cu un timp scurt de expunere, este decisivă pentru generarea de schelete biologic active. Rezultatul acestui studiu reprezintă o etapă importantă în bioingineria de organe folosind un model de matrice pe animale mici.
- Aplicația software asistată de inteligență artificială creată în cadrul acestei teze este o metodă non-invazivă și non-distructivă de evaluare prin clasificare a decelularizării. Corelând graficele de la spectrofotometrie (concentrația de ADN/proteine în soluția de decelularizare) cu metricile generate de spectrometru și serviciile de clasificare, modelul a optimizat procesul de decelularizare furnizând o estimare a progresului.

- Decelularizarea prin perfuzie a inimilor de șobolan cu 1% SDS a rezultat într-o matrice 3D fără material celular xenogen vizibil. Procesul a fost validat prin analiză histologică extinsă și SEM, confirmând îndepărtarea completă a resturilor celulare și conservarea ECM nativ.
- MSCs umane reprezintă celule candidat promițătoare pentru procedurile de recelularizare. Evaluarea *in vitro* a caracteristicilor morfologice și imunofenotipice ale hMSCs a oferit o bază pentru utilizarea lor ulterioară. Diferențierea *ex vivo* a hMSCs în CMs folosind 5-azacitidină a demonstrat capacitatea lor de a adopta o linie cardiacă. În același timp, evaluarea *in vitro* a inimii de șobolan recelularizate a validat integrarea cu succes a CMs derivate din hMSCs în matricea cardiacă.

CONTRIBUȚII PERSONALE

- Perfecționarea meticuloasă a protocolului anestezic-chirurgical și a tehnicii de canulare a inimii pentru decelularizarea întregului organ;
- Dezvoltarea unui design experimental și a unui protocol de implementare pentru decelularizarea întregii inimi prin perfuzia coronariană utilizând un dispozitiv Langendorff modificat;
- Evaluarea cu succes a eficienței decelularizării utilizând spectrofotometria ca tehnică non-invazivă, dar și prin analiza histologică și o tehnică de vizualizare cu rezoluție înaltă (SEM);
- Participarea la crearea unui algoritm de rețea neuronală convoluțională cu învățare profundă (DCNN) pentru a prezice progresia și punctul final al decelularizării ca metodă non-distructivă de evaluare a ECM cardiac;
- Pregătirea celulelor stem mezenchimale umane pentru recelularizarea matricei cardiace; analiza morfologică *in vitro* (SEM și TEM) și imunofenotipică (imunocitochimie și citometrie de flux); generarea de imagini și grafice caracteristice și interpretarea rezultatelor;
- Optimizarea protocoalelor de recelularizare prin infuzia retrogradă a suspensiei de celule și injecția intraventriculară în inima de șobolan decelularizată;
- Analiza *ex vivo* a eficienței recelularizării prin colorarea H&E.

DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE

Deși această lucrare de doctorat include un proces riguros și complex de cercetare, există direcții viitoare de cercetare pe care dorim să le urmărim:

- Implementarea unei caracterizări mai cuprinzătoare a inimii decelularizate prin cuantificarea SDS rezidual, analiza IHC a principalelor proteine ECM, proteomica pe bază de spectrometrie de masă și performanța biomecanică (de exemplu, microscopie cu forță atomică, teste mecanice uniaxiale sau biaxiale);
- Utilizarea altor tipuri de celule (de exemplu, celule stem pluripotente umane induse) pentru recelularizare, ceea ce ar putea duce la o proporție mai mare de populații celulare în matrice;
- Studiul în profunzime a editării genomului, cum ar fi platforma CRISPR, care s-a dovedit a fi un instrument puternic pentru manipularea celulelor stem umane pluripotente induse derivate de la pacienți, permițând generarea de celule corectate autologe eligibile pentru transplantul de țesut uman;
- Îmbunătățirea diferențierii cardiomiocitelor, urmată de testarea electrică și mecanică a inimii bioartificiale;

Ca o concluzie finală, o perspectivă viitoare de cercetare este conectarea domeniilor tehnice, cum ar fi IT și ingineria, cu medicina. Împreună, acestea pot duce la progrese semnificative în domeniul ingineriei țesuturilor.