

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ
DEPARTAMENTUL X - CHIRURGIE II
DISCIPLINA DE MICROCHIRURGIE, CHIRURGIE VASCULARĂ
ȘI METODOLOGIA CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE**

HURMUZ V. MIHAI



TEZĂ DE DOCTORAT

**Studiu privind recoltarea și explorarea proprietăților
celulelor mezenchimale în timpul procesului de
bioimprimare a unei structuri meniscale umane**

Coordonator științific

PROF. UNIV. DR. MIHAI IONAC

**Timișoara
2024**

CUPRINS

CUPRINS

PARTEA GENERALĂ

- I.1 TEHNOLOGIA DE BIOIMPRIMARE
- I.2 BIOINKS
- I.3 CELULE STEM DERIVATE DIN ȚESUTUL ADIPOS (ADSC/ASC)

PARTEA SPECIALĂ

I. CAPITOLUL 1: PROBLEME DE ETICĂ MEDICALĂ

- I.1 CONSIMȚĂMÂNTUL INFORMAT
- I.2 ASPECTE LEGATE DE CONFIDENȚIALITATE
- I.3 PROBLEME ETICE PRIVIND MATERIALELE BIOLOGICE

II. CAPITOLUL 2: MATERIALE ȘI METODE

- II.1 COLECTAREA DE MATERIAL BIOLOGIC
 - II.1.1. RECOLTAREA DESCHISĂ A ȚESUTULUI ADIPOAS AL LUI HOFFA
 - II.1.2 RECOLTAREA ARTROSCOPICĂ A ȚESUTULUI ADIPOAS AL LUI HOFFA
- II.2 PREGĂTIREA MATERIALULUI BIOLOGIC
- II.3 DIFERENȚIEREA ADSC SPRE LINIA CONDROCITELOR
- II.4 SISTEME DE BIOIMPRIMARE
 - II.4.1 PROIECTAREA STRUCTURILOR
 - II.4.2 BIOIMPRIMANTĂ
 - II.4.3 BIOINK
 - II.4.4. PROCESUL DE BIOIMPRIMARE
- II.5 TESTUL DE VIABILITATE ȘI PROLIFERARE CELULARĂ
 - II.5.1 TESTUL DE VIABILITATE CELULARĂ CU AJUTORUL COLORANȚILOR VITALI
 - II.5.2. TESTAREA VIABILITĂȚII CU ANNEXINĂ V/PI
 - II.5.3. TESTAREA PROLIFERĂRII CELULARE
- II.6 IMUNOFENOTIPARE CELULARĂ PRIN CITOMETRIE ÎN FLUX
- II.7 INVESTIGAREA MODIFICĂRIILOR IMUNOFENOTIPICE PRIN IMUNOFLUORESCENȚĂ ȘI IMUNOCITOCHIMIE

III. CAPITOLUL 3: REZULTATE

- III.1 ASPECTE MORFOLOGICE ALE CELULELOR STEM MEZENCHIMALE DERIVATE DIN ȚESUTUL ADIPOS
- III.2 REZULTATELE TESTELOR DE VIABILITATE PENTRU CELULELE STEM MEZENCHIMALE
- III.3 IDENTIFICAREA MARKERILOR IMUNOFENOTIPICI PRIN TEHNICI DE CITOMETRIE ÎN FLUX
- III.4 MARKERI CELULARI EVIDENȚIAȚI PRIN TEHNICI IMUNOCITOCHIMICE
 - III.4.1. EXPRESIA MARKERILOR CELULELOR STEM MEZENCHIMALE
 - III.4.2 EXPRESIA MARKERILOR DE DIFERENȚIERE A CONDROCITELOR
- III.5 REZULTATELE EXPERIMENTELOR DE BIOIMPRIMARE A MENISCURILOR CELULARIZATE
 - III.5.1. BIO-SCRIEREA STRUCTURILOR TISULARE
 - III.5.2 VIABILITATEA CELULARĂ A STRUCTURILOR TISULARE DUPĂ BIOIMPRIMARE
 - III.5.3 TESTAREA REZISTENȚEI MECANICE A STRUCTURILOR TISULARE BIOIMPRIMATE
- III.6 REZULTATE PRIVIND CELULARIZAREA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A MENISCURILOR BIOIMPRIMATE

IV. CAPITOLUL 4: DISCUȚII

- V. CONCLUZII FINALE ȘI PERSPECTIVE VIITOARE

CAPITOLUL 1: PROBLEME DE ETICĂ MEDICALĂ.

Pacienții din cadrul studiului au oferit un consimțământ în cunoștință de cauză în scris, fiind de acord cu detaliile intervenției chirurgicale și ale cercetării, inclusiv durata cercetării, rezultatele așteptate, procedurile, beneficiile, riscurile, protecția datelor, confidențialitatea, participarea voluntară și opțiunile de renunțare. Populațiile vulnerabile au fost excluse din selecția participanților. Datele pacienților au respectat reglementările europene și naționale care reglementează informațiile medicale personale. Au fost stabilite protocoale pentru colectarea, prelucrarea și stocarea datelor, asigurându-se respectarea standardelor legale.

Studiul a urmat proceduri etice meticuloase, începând cu aprobarea din partea Comitetului de etică local și respectarea reglementărilor naționale, europene și internaționale. Țesuturile umane au fost obținute în timpul procedurilor chirurgicale, etichetate și anonimizate în conformitate cu cerințele legale. Transferul probelor a respectat protocoale stricte și norme legale, menținând integritatea studiului.

CAPITOLUL 2: MATERIALE ȘI METODE.

Materialul biologic a fost recoltat de la patru pacienți internați în secția Ortopedie a Spitalului Clinic Militar de Urgență "Dr. Victor Popescu" Timișoara. Doi pacienți au fost supuși unei intervenții chirurgicale artroscopice pentru reconstrucția ligamentului încrucișat anterior, iar doi au fost supuși unei intervenții chirurgicale de înlocuire a genunchiului. Grăsimea Hoffa a fost recoltată în timpul artroplastiei genunchiului. După pregătirea pielii și sub anestezie spinală, s-a făcut o incizie de 15 cm în mijlocul genunchiului. Au fost identificate tendonul cvadricepsului și marginea rotuliană și s-a efectuat o artrotomie. Grăsimea lui Hoffa, situată în spatele tendonului rotulian, a fost extirpată pentru a îmbunătăți accesul la compartimentul extern al genunchiului și pentru a atenua eventualele dureri post-artroplastie ale genunchiului.

Chirurgia artroscopică a necesitat o poziționare precisă a pacientului, cu membrele inferioare suspendate. Sub anestezie spinală, genunchiul a fost accesat prin incizii laterale și mediale. Au fost folosite tehnici specializate, inclusiv recoltarea artroscopică a grăsimii Hoffa, cu ajutorul unor pensete sau al unui aparat de ras motorizat. S-a efectuat o rezeecție parțială a grăsimii Hoffa atunci când a fost necesar pentru reconstrucția ligamentelor, cu ajutorul unor sisteme de colectare aprobate de FDA, cum ar fi Aquavage. Materialul biologic recoltat a fost transferat cu grijă în tuburi Falcon preumplute cu 15 ml de PBS și o soluție de Penicilină-Streptomicină 1%. Aceste tuburi au fost plasate într-un recipient pre-refrigerat și apoi transferate la departamentul de imunologie al Spitalului Clinic Județean de Urgență "Pius Brânzeu" Timișoara pentru analiză, asigurând o tranziție fără probleme de la operație la evaluarea științifică.

În laborator, probele de țesut recoltate au fost manipulate cu meticulozitate în condiții de sterilitate. Acestea au fost plasate în vase Petri sterile de 15 cm (Falcon) și au fost spălate cu o soluție PBS conținând 2% Pen-Strep în medii controlate. Țesuturile au fost apoi disecate și mărunțite cu lame de bisturiu și foarfeci sterile. Au fost pregătite plăci Petri speciale pentru a facilita aderența celulelor mezenchimale, iar țesutul adipos a fost transferat în aceste plăci. Plăcile Petri au fost pregătite cu un mediu de creștere care conține componente specifice celulelor mezenchimale umane (hMSC). Aceste farfurii au fost incubate la 37°C cu 5% CO₂ pentru o creștere optimă a celulelor. Mediul de cultură a fost înlocuit în mod regulat la fiecare 3-5 zile. În ziua 9, fragmentele de țesut au fost aspirate și mediul de cultură a fost schimbat, marcând o fază critică a procesului. La atingerea unei confluențe celulare minime de 80%, s-a efectuat tripsinizarea, urmată de centrifugarea suspensiei celulare. Celulele au fost resuspendate în PBS și au fost numărate cu ajutorul unui hemacytometru. Culturile au fost menținute la o densitate de aproximativ $3\text{-}5 \times 10^4$ celule pe cm^2 și au fost parțial congelate, marcând punctul culminant al acestui proces complex.

Mediul de cultură a fost esențial în diferențierea celulelor în condrocite. Acesta conținea diverse substanțe, inclusiv dexametazonă, acid ascorbic-2 fosfat, piruvat de sodiu, prolină, insulină-transferină-selenium, TGF β 1 și 1% Pen-Strep, care au facilitat diferențierea celulară. Mediul ChondroDiff combinat cu 1% Pen-Strep a fost, de asemenea, utilizat pentru a susține creșterea și diferențierea. După 24 de ore, aderența celulelor la plasticul vasului Petri a marcat o fază semnificativă în cadrul experimentului. Cutia Petri 1 a continuat cu mediul de cultură specific MSC, păstrând identitatea hMSC, în timp ce cutia Petri 2 a fost supusă unui proces de diferențiere specific pentru utilizare ulterioară. Sistemul de bioimprimare a fost o configurație tehnologică cuprinzătoare, incluzând hardware precum bioimprimătoarea, bioincinta și software-ul pentru proiectarea schelelor. Software-ul Cinema 4D a fost utilizat pentru modelarea CAD a unui menisc lateral uman, în baza unor cercetări ample privind dimensiunile meniscului. Fișierul în format stereolitografic (.stl) a fost transferat către software-ul bioimprimantei, asigurând astfel precizia. Modelul s-a bazat pe cercetări empirice, pe analiza prin rezonanță magnetică și pe validarea în raport cu datele anatomice. Au fost utilizate măsurători medii, cum ar fi circumferința, lățimea cornului și înălțimea, pentru a asigura precizia anatomică. Această abordare interdisciplinară, ghidată de cercetarea academică și de expertiza medicală, evidențiază complexitatea proiectării schelelor în această aplicație medicală avansată.

Bioimprimatorul INKREDIBLE de la Cellink din Suedia este un model de extrudare pneumatică de înaltă precizie, cu o precizie de 10 micrometri pe axa XY și de 2,5 micrometri pe axa Z. Acesta oferă reticulare cu LED-uri UV, rezoluție a straturilor de 100 micrometri și gestionează o gamă largă de vâscozități ale gelului. Pentru a menține sterilitatea, acesta funcționează în cadrul unui cabinet de siguranță biologică echipat cu un filtru HEPA H14 EN 1822. Bioink Cellink combină celuloza nanofibrilată cu alginatul de sodiu și este reticulat cu ajutorul unui agent pe bază de apă și clorură de calciu. Această cernelă versatilă se adaptează la diferite tipuri de țesuturi și este esențială pentru succesul bioimprimării. Procesul de bioimprimare implică sterilizarea, setarea parametrilor, pregătirea cernelii biologice și imprimarea. Dimensiunea scheletului este scalată la 60% din meniscul uman. Controalele includ structuri celulare și geluri de testare. Condrocitele diferențiate din celule stem derivate din celule adipocite sunt încorporate în menisc, iar testele mecanice evaluează rezistența.

Sistemul xCELLigence RTCA, care utilizează impedanța electrică cu microelectrozi, a fost utilizat pentru analiza celulară în timp real. Acesta evaluează creșterea celulară, citotoxicitatea, proliferarea, diferențierea, aderența, migrația, invazia și interacțiunile ligand-receptor. Acest sistem monitorizează în permanență celulele vii în condiții optime, furnizând date fiabile pe toată durata culturii. Procesul de citometrie în flux a implicat tripsinizarea, centrifugarea, marcarea cu mai mulți anticorpi, o incubare la întuneric de 30 de minute, spălare completă și resuspensie în soluție Cell Wash. Această metodă a permis investigarea detaliată a markerilor și caracteristicilor celulare, demonstrând rigoarea pregătirii celulelor pentru citometria în flux. Pentru imunocitochimie și imunofluorescență, celulele aderente au fost fixate, marcate cu anticorpi primari și incubate. Imunofluorescența a fost realizată la întuneric, utilizând anticorpi secundari fluorescenți și DAPI pentru colorarea nucleelor. Imunocitochimia a implicat anticorpi primari produși de șoareci împotriva markerilor umani specifici. Ambele metode au contribuit la analiza detaliată a caracteristicilor celulare.

CAPITOLUL 3: REZULTATE.

Experimentul a început cu plasarea fragmentelor de țesut în vase Petri, iar în decurs de șase zile, celulele au început să migreze și să adere la suprafața de plastic. În a noua zi, s-a format o rețea complexă, iar în ziua a treisprezecea, prezența celulelor s-a intensificat. Aceste observații au susținut identificarea celulelor stem mezenchimale derivate din țesutul adipos, aruncând lumină asupra modelelor de creștere ale acestora. Testele de viabilitate prin citometrie în flux au evidențiat procentaje de viabilitate celulară variabile în funcție de diferitele

tregeri. Probele 1 și 2 au prezentat o viabilitate redusă și rate mai mari de apoptoză timpurie. Proba 2 a prezentat o apoptoză târzie semnificativă, ceea ce a făcut-o nepotrivită pentru bioimprimare. Probele 3 și 4, cu o viabilitate mai mare și rate de apoptoză mai scăzute, au apărut ca fiind candidații ideali pentru studii ulterioare de bioimprimare. Aceste constatări subliniază importanța selectării materialului celular optim pentru încercările de bioimprimare. Monitorizarea continuă a indicilor celulari a relevat o perioadă de stabilizare la aproximativ patru ore după implantare, urmată de creștere și diviziune în intervalul de 4-24 de ore. Compararea dintre celulele stem derivate din adipocite (ADSC) și celulele stem mezenchimale din măduva osoasă (BM-MSC) a demonstrat timpi de dublare similari, evidențiind dinamica celulară universală. Aceste rezultate contribuie la înțelegerea proliferației celulelor stem și oferă o referință pentru cercetătorii care lucrează cu diverse tipuri de celule.

Tehnicile de citometrie în flux joacă un rol esențial în identificarea și caracterizarea precisă a populațiilor de celule, un aspect crucial al cercetărilor noastre recente asupra celulelor stem mezenchimale (MSC). În mod specific, analizele noastre au cuprins MSC derivate din țesutul adipos Hoffa (ADSC) și celule orientate spre linia condrocitelor. Această abordare metodologică a implicat evaluarea atât a markerilor pozitivi (CD90, CD73, CD29, CD44, CD105 și CD117), cât și a celor negativi (CD106, CD34, CD146, alfa-SMA, E-cadherin și CD95). Examinarea expresiei acestor markeri în cadrul populațiilor de celule din patru probe distincte a evidențiat diferențe notabile, care indică variabilitatea interindividuală. Această variație evidențiază atributele unice ale fiecărei probe și subliniază diversitatea complexă din cadrul MSC, chiar și atunci când provin din surse de țesut aparent uniforme. Variabilitatea interindividuală nu este unică în cazul celulelor stem derivate din țesutul adipos Hoffa; ea este observată și în cazul celulelor stem mezenchimale provenite din măduva osoasă hematogenă. Aceste observații subliniază faptul că celulele stem, indiferent de originea lor, posedă profiluri de expresie distincte care le pot influența semnificativ comportamentul și potențialul terapeutic. În ciuda variabilității interindividuale, rezultatele noastre afirmă că markerii caracteristici celulelor stem sunt prezenți în mod constant, deși în proporții variabile. Acest lucru subliniază faptul că, deși nivelurile de expresie ale unor markeri specifici pot diferi între probe, atributele fundamentale care definesc celulele stem persistă. Astfel, variabilitatea în expresia markerilor adaugă complexitate la înțelegerea noastră a acestor celule, mai degrabă decât să le nege identitatea inerentă de celule stem.

Cercetările noastre au aprofundat caracteristicile unice ale celulelor stem derivate din țesutul adipos Hoffa (ASC/ADSC), utilizând diferite tehnici analitice. În primul rând, ne-am concentrat asupra markerilor pozitivi CD90, CD29 și CD105, indicatori principali ai potențialului celulelor stem. În mod surprinzător, acești markeri au prezentat o expresie consistentă în diferite probe, sugerând caracteristici uniforme ale celulelor stem, în ciuda variațiilor în ceea ce privește sursele de țesut. În schimb, CD26 și CD44, legate de activarea celulară și capacitatea de adeziune, au prezentat o variabilitate individuală semnificativă, subliniind natura complexă a ASC/ADSC. În contextul markerilor condrocitelor, analiza noastră a evidențiat o consecvență remarcabilă în ceea ce privește expresia CD90, CD44, CD29 și TGF-beta în diverse probe. Mai mult, acești markeri au prezentat modele similare în comparație cu celulele stem mezenchimale, ceea ce implică roluri fundamentale comune. Această uniformitate ne îmbunătățește înțelegerea condrocitelor și a MSC-urilor, în special în aplicațiile de inginerie tisulară și de medicină regenerativă. De asemenea, am utilizat imunocitochimia pentru a detecta proteine specifice în cadrul celulelor ASC/ADSC izolate. Colorația pozitivă pentru CD105 și Vimentin a afirmat prezența acestora și a contribuit la înțelegerea identității celulelor. În schimb, absența VEGF, Ki67, CD117 și citokeratină a dezvăluit caracteristici distincte, delimitând și mai mult profilul celular. Aceste constatări ne îmbogățesc în mod colectiv înțelegerea ASC/ADSC, facilitând cercetările viitoare și aplicațiile terapeutice prin sublinierea importanței recunoașterii variabilității individuale a proprietăților celulare.

Studiul nostru a implicat bioimprimarea meniscurilor celularizate, o etapă crucială în ingineria tisulară, asigurând o distribuție uniformă a celulelor în structurile imprimate. Această

uniformitate este esențială pentru a reproduce integritatea și funcția meniscului natural. Mai mult, am reușit să menținem cu succes caracteristici de mărime și formă constante în toate meniscurile imprimare, reflectând cu precizie meniscurile umane extirpate chirurgical. Pentru a obține măsurători precise, am folosit un calibru digital de înaltă precizie cu o marjă de eroare de $\pm 0,015$ mm. Măsurătorile noastre au cuprins diverse dimensiuni, inclusiv circumferința medie ($93,2 \text{ mm} \pm 2,1 \text{ mm}$) și măsurători specifice pentru diferite regiuni anatomice, reflectând geometria și funcționalitatea complexă a meniscului. Am efectuat, de asemenea, o analiză a viabilității celulelor la două zile după imprimare, care a arătat că majoritatea celulelor (aproximativ 40 de milioane din 50 de milioane) au rămas în interiorul țesutului imprimat și au fost viabile. În ciuda unor pierderi de celule, acest rezultat semnifică un proces de bioimprimare de succes, cu implicații promițătoare pentru viitoarele aplicații terapeutice. În ceea ce privește rezistența mecanică, testele de compresie au indicat că meniscurile noastre bioimprimare au prezentat proprietăți mecanice unice în comparație cu țesutul nativ. Deși au fost observate diferențe, explorarea suplimentară a probelor îmbogățite și neîmbogățite cu celule a evidențiat rolul celulelor, în special al matricei extracelulare secretate de acestea, în modularea comportamentului mecanic.

CAPITOLUL 4: DISCUȚII.

În ceea ce privește ingineria tisulară, se întrevide la orizont potențialul de a revoluționa biomedicina regenerativă și de a rezolva problema lipsei de organe donate. Cu peste 100.000 de pacienți care au nevoie de transplanturi, ingineria tisulară oferă o soluție promițătoare la această problemă urgentă de sănătate publică. Cu toate acestea, crearea de organe funcționale din celulele proprii ale unui pacient este un proces complex care implică diverși factori fiziologici, culturi de celule, stabilirea rețelei vasculare, inervație și interacțiunea cu țesuturile adiacente. Imprimarea tridimensională în domeniul medical oferă o gamă versatilă de aplicații, de la modele anatomice pentru planificarea preoperatorie până la implanturi personalizate, proteze și chiar instrumente de depistare a medicamentelor. Platformele in vitro care utilizează interacțiuni multidimensionale și multicelulare permit soluții medicale specifice pacientului. Cu toate acestea, deși aceste tehnologii sunt foarte promițătoare, ele prezintă, de asemenea, provocări, cum ar fi obținerea unei celularizări ridicate și a unei viabilități celulare post-bioimprimare, care necesită investigații suplimentare.

Analiza morfologică a celulelor stem mezenchimale derivate din țesut adipos (ADSC) este esențială pentru aplicarea lor în medicina regenerativă și în ingineria tisulară. Aceste celule au demonstrat caracteristici promițătoare, inclusiv potențialul de proliferare și morfologia asemănătoare cu cea a fibroblastelor, ceea ce le face valoroase pentru expansiunea in vitro și potențiala utilizare în terapiile pe bază de celule. Cercetările viitoare ar trebui să exploreze relația dintre caracteristicile donatorilor și proprietățile ADSC și să extindă diversitatea eşantioanelor pentru a spori generalizabilitatea rezultatelor. Înțelegerea acestor aspecte celulare este crucială pentru optimizarea ADSC-urilor în ingineria tisulară și medicina regenerativă, promițând rezultate îmbunătățite pentru pacienții care au nevoie de tratamente avansate...

CAPITOLUL 5: CONCLUZII.

În concluzie, această lucrare de doctorat a atins etape importante cu implicații profunde pentru medicina regenerativă și tehnologia de bioimprimare 3D. Izolarea și caracterizarea cu succes a celulelor stem mezenchimale de tip ADSC din țesutul adipos Hoffa, împreună cu viabilitatea și modelele lor distincte de proliferare, reprezintă o sursă promițătoare pentru abordarea patologiilor osteoarticulare. Capacitatea demonstrată a acestor celule de a se diferenția în condrocite reprezintă un pas înainte esențial în aplicațiile de reparare a cartilajului. Această lucrare nu numai că lărgeste domeniul de aplicare al terapiilor cu celule

stem, dar contribuie, de asemenea, la înțelegerea unor surse de celule unice pentru ingineria tisulară.

În plus, crearea unui menisc lateral uman cu ajutorul software-ului Cinema 4D și a imprimantei 3D Inkredible marchează o realizare de pionierat în România și reprezintă un progres tehnologic semnificativ. Deși meniscurile bioimprimare au prezentat o rezistență mecanică mai mică în comparație cu omologii naturali, această descoperire oferă o bază pentru viitoarele îmbunătățiri ale sintezei matricei extracelulare și ale rezistenței mecanice. Au fost explorate diverse metode, inclusiv utilizarea condrocitelor prediferențiate, care au dezvăluit importanța prediferențierii în obținerea unei celularizări superioare și a unor markeri specifici ai condrocitelor.

Acest studiu cuprinzător nu numai că ne face să avansăm în cunoașterea noilor surse de celule stem și a structurilor complexe de țesuturi 3D, dar evidențiază, de asemenea, provocările și oportunitățile tehnologiei de bioimprimare. Cercetările ulterioare vor fi esențiale pentru a aborda aspecte precum creșterea celularizării și îmbunătățirea viabilității celulelor după bioimprimare. În cele din urmă, rezultatele acestei lucrări de doctorat ne aduc mai aproape de transpunerea acestor descoperiri în aplicații clinice pentru bolile osteoarticulare, oferind speranță și noi posibilități pentru pacienții care au nevoie de tratamente eficiente.