

Academia Română  
Institutul de Biochimie

Rezumat al tezei de doctorat:

Interacția compuși biologic activi - celule în  
procesul de regenerare tisulară

Conducător științific,

Dr. Elena Ganea

Doctorand,

Alexandra Gaspar-Pintilieșcu

București

2016

## CUPRINS

INTRODUCERE ȘI SCOPUL TEZEI .....	8
<b>CAPITOLUL 1. MECANISME IMPLICATE ÎN REPARAREA ȘI REGENERAREA LEZIUNILOR PIELII. ROLUL COMPUȘILOR NATURALI ÎN ACEST PROCES .....</b>	<b>12</b>
1.1. Structura și funcțiile pielii .....	12
1.2. Fazele procesului de vindecare .....	13
1.2.1. Hemostaza și faza inflamatorie .....	14
1.2.2. Re-epitelizarea leziunilor și formarea țesutului de granulație .....	15
1.2.3. Remodelarea matricei extracelulare .....	16
1.3. Mediatori implicați în procesul de regenerare .....	19
1.3.1. Factorii de creștere .....	19
1.3.2. Metaloproteinazele .....	21
1.4. Matrici utilizate în vindecarea rănilor .....	23
1.4.1. Matrici pe bază de polimeri naturali și sintetici .....	23
1.4.2. Matrici îmbogățite cu compuși bioactivi din plante. Modularea procesului de vindecare de către polifenoli și polizaharide .....	27
1.4.2.1. Proprietățile antioxidante ale polifenolilor și polizaharidelor .....	29
1.4.2.2. Proprietățile antiinflamatoare ale polifenolilor .....	32
1.4.2.3. Potențialul imunomodulator al polizaharidelor .....	33
1.4.2.4. Activitatea antimicrobiană a polifenolilor și polizaharidelor .....	34
1.4.2.5. Potențialul angiogenic al polifenolilor și polizaharidelor.....	34
1.4.3. Substituenți naturali și artificiali de piele .....	35
<b>CAPITOLUL 2. CELULE STEM ÎN REPARAREA ȘI REGENERAREA ȚESUTULUI DERMAL .....</b>	<b>39</b>
2.1. Celule stem – aspecte generale .....	39
2.2. Tipuri de celule stem .....	39
2.3. Celule stem mezenchimale/stromale (MSC) .....	40
2.4. Mecanismele prin care celulele stem mezenchimale contribuie la vindecarea rănilor .....	44
2.4.1. Acțiunea paracrină a celulelor stem .....	47
2.4.2. Diferențierea și transdiferențierea celulelor stem .....	50
2.5. Modalități de livrare a celulelor stem cultivate <i>ex vivo</i> la nivelul leziunilor .....	53
<b>CAPITOLUL 3. MATERIALE ȘI METODE .....</b>	<b>58</b>
3.1. Materiale .....	58
3.2. Metode de caracterizare a extractelor vegetale de <i>Artemisia absinthium</i> .....	58
3.2.1. Tehnici de extracție .....	58
3.2.2. Determinarea conținutului de compuși biologic activi .....	60
3.2.2.1. Metode spectrofotometrice .....	60
3.2.2.2. Cromatografia de lichide de înalta performanță (HPLC) .....	61
3.2.2.3. Electroforeza capilară .....	61

3.2.3. Metode de determinare a activității antioxidante .....	62
3.2.3.1. Capacitatea de absorbție a radicalului oxigen (ORAC) .....	62
3.2.3.2. Echivalentul Trolox al capacității antioxidante (TEAC) .....	62
3.2.3.3. Capacitatea antioxidantă de reducere a ionului feric (FRAP) .....	63
3.2.3.4. Capacitatea de inhibare a radicalului DPPH .....	63
3.3. Metode microbiologice .....	64
3.4. Metode specifice de caracterizare a biomaterialelor destinate vindecării rănilor .....	65
3.4.1. Obținerea variantelor de biomateriale .....	65
3.4.2. Determinarea porozității .....	65
3.4.3. Determinarea gradului de gonflare .....	65
3.4.4. Analiza gradului de biodegradare .....	66
3.4.5. Evaluarea stabilității biomaterialelor în timp .....	66
3.5. Metodologia de lucru aplicată pe linia celulară de fibroblaste murine (NCTC) .....	66
3.5.1. Cultura celulară și testarea viabilității extractelor de <i>A. absinthium</i> .....	67
3.5.1.2. Microscopia optică .....	67
3.5.1.3. Testul Roșu Neutru .....	67
3.5.1.4. Testul lactat dehidrogenazei (LDH) .....	67
3.5.2. Inducerea stresului oxidativ în cultura celulară și tratamentul cu extract de <i>A. absinthium</i> .....	68
3.5.2.1. Analiza ciclului celular .....	68
3.5.2.2. Evaluarea metaloproteinazelor matriciale(MMP) .....	69
3.5.3. Biocompatibilitatea variantelor de materiale .....	69
3.5.3.1. Testul MTT .....	70
3.6. Metodologia de lucru aplicată pe linia celulară de monocite umane (THP 1) .....	70
3.6.1. Cultura celulară și evaluarea activității antiinflamatoare a extractelor de <i>A. absinthium</i> .....	70
3.6.1.2. Determinarea interleukinelor IL-1 $\beta$ și IL-6 .....	71
3.6.1.3. Analiza producției de oxid nitric (NO) .....	71
3.7. Metodologia de lucru aplicată pe culturi celulare ale pielii (fibroblaste dermale și keratinocite umane) .....	71
3.7.1. Cultivarea celulelor în variantele de biomaterial selectate .....	72
3.7.1.1. Testul MTS .....	72
3.7.1.2. Testul Live/Dead .....	72
3.7.2. Evaluarea sintezei proteinelor matriceale .....	73
3.7.2.1. Dozarea colagenului în culturi de celule .....	73
3.7.2.2. Dozarea fibronectinei .....	73
3.7.3. Evaluarea capacității antioxidante in vitro .....	74
3.7.3.1. Determinarea cantitativă a glutatationului total și a activității catalazei și glutatation-S-transferazei .....	74
3.7.3.2. Determinarea conținutului proteic .....	76
3.8. Metodologia de lucru aplicată pe cultura de celule stem mezenchimale umane .....	76

3.8.1. Izolarea și cultivarea celulelor stem mezenchimale din țesut adipos uman (hASC) .....	76
3.8.2. Imunofenotiparea hASC prin citometrie în flux .....	76
3.8.3. Evaluarea potențialului adipogenic al hASC .....	77
3.8.4. Evaluarea potențialului osteogenic al hASC .....	77
3.8.4.1. Microscopia de fluorescență .....	77
3.8.5. Evaluarea potențialului epidermal al hASC în sistem 2D .....	78
3.8.5.1. Extracția ARN total și reacția de polimerizare în lanț prin revers transcriere (RT-PCR) .....	78
3.8.6. Evaluarea potențialului epidermal al hASC în sistem 3D .....	79
3.8.6.1. Microscopia electronică de transmisie (TEM) .....	80
3.8.6.2. Microscopia electronică de baleiaj (SEM) .....	80
3.8.7. Elaborarea sistemelor de co-cultură .....	80
3.9. Evaluarea activității biologice <i>in vivo</i> a variantei de biomaterial selectat .....	82
3.10. Analiza statistică .....	82

## CAPITOLUL 4. REZULTATE ȘI DISCUȚII .....

4.1. Obținerea și caracterizarea chimică și biochimică a unor extracte de <i>Artemisia absinthium</i> cu potențial antioxidant, antiinflamator, citoprotector și antimicrobian .....	83
4.1.1. Determinarea conținutului de compuși biologic activi din extractele de <i>A. absinthium</i> .....	84
4.1.2. Evaluarea activității antioxidante a extractelor de <i>A. absinthium</i> bogate în polifenoli (Pf) și în polizaharide (Pz) .....	91
4.1.3. Evaluarea citotoxicității extractelor Pf și Pz de <i>A. absinthium</i> .....	93
4.1.4. Evaluarea activității antiinflamatoare a extractelor Pf și Pz de <i>A. absinthium</i> .....	97
4.1.5. Evaluarea capacității antioxidante a extractului Pf de <i>A. absinthium</i> utilizând un model de stres oxidativ indus <i>in vitro</i> .....	100
4.1.5.1. Efectul tratamentului cu extract Pf asupra ciclului celular al fibroblastelor murine .....	104
4.1.5.2. Efectul tratamentului cu extract Pf asupra expresiei/activității MMP.....	106
4.1.6. Evaluarea efectului antimicrobian al extractului Pf de <i>A. absinthium</i> .....	108
4.1.7. Concluzii .....	110
4.2. Demonstrarea utilității și funcționalității unor variante de biomateriale 3D multifuncționale în procesul regenerativ de vindecare a rănilor pe modele experimentale <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i> .....	112
4.2.1. Obținerea și caracterizarea unor variante de biomateriale .....	113
4.2.1.1. Caracterizarea fizico-chimică și ultrastructurală .....	115
4.2.1.2. Evaluarea gradului de biodegradabilitate .....	121
4.2.1.2. Evaluarea stabilității materialelor în timp .....	122
4.2.1.3. Evaluarea citotoxicității <i>in vitro</i> .....	123
4.2.2. Evaluarea activității biologice <i>in vitro</i> a variantelor de biomateriale în sisteme 2D și 3D .....	126
4.2.2.1. Efectul biomaterialelor asupra producției de proteine ale matricii extracelulare în culturi 2D de fibroblaste dermale și keratinocite .....	126

4.2.2.2. <i>Interacția variantelor de biomateriale cu fibroblaste dermale și keratinocite în sistem 3D</i> .....	129
4.2.2.3. <i>Efectul biomaterialelor asupra nivelului de glutatation redus și a activității enzimatică a catalazei și glutatation-S-transferazei</i> .....	135
<b>4.2.3. <i>Evaluarea activității biologice in vivo a variantei de biomaterial selectat</i></b> .....	<b>137</b>
<b>4.2.4 <i>Concluzii</i></b> .....	<b>140</b>
<b>4.3. Izolarea celulelor stem mezenchimale umane din țesut adipos (hASC) și diferențierea lor în celule epidermale. Interacția hASC cu keratinocite umane în sisteme de co-cultură</b> .....	<b>142</b>
<b>4.3.1. <i>Caracterizarea hASC</i></b> .....	<b>143</b>
4.3.1.1. <i>Analiza morfologiei celulare</i> .....	143
4.3.1.2. <i>Determinarea imunofenotipului hASC</i> .....	144
4.3.1.3. <i>Evaluarea potențialului de multidiferențiere in vitro al hASC</i> .....	145
<b>4.3.2. <i>Capacitatea de diferențiere in vitro a hASC în celule epidermale în sisteme 2D și 3D</i></b> .....	<b>147</b>
4.3.2.1. <i>Analiza morfologiei celulare în sistem 2D</i> .....	147
4.3.2.2. <i>Analiza secreției markerilor specifici prin imunofluorescență în sistem 2D</i> .....	148
4.3.2.3. <i>Analiza expresiei markerilor specifici prin RT-PCR în sistem 2D</i> .....	148
4.3.2.4. <i>Investigarea diferențierii hASC în sistem 3D în mediu inductor epidermal prin TEM și SEM</i> .....	150
4.3.2.5. <i>Investigarea expresiei markerilor specifici prin RT-PCR în sistemul 3D</i> .....	154
<b>4.3.3. <i>Interacția celulelor hASC și HaCaT în sisteme de co-cultură</i></b> .....	<b>155</b>
4.3.3.1. <i>Analiza proliferației celulare în sistemul indirect de co-cultură hASC-HaCaT</i> .....	156
4.3.3.2. <i>Analiza interacției celulare în sistemul direct de co-cultură hASC-HaCaT</i> .....	157
<b>4.3.4. <i>Concluzii</i></b> .....	<b>160</b>
<b>CONCLUZII GENERALE</b> .....	<b>162</b>
<b>BIBLIOGRAFIE</b> .....	<b>164</b>
<b>LISTA DE LUCRĂRI</b> .....	<b>195</b>
<b>ABREVIERI</b> .....	<b>197</b>

## **INTRODUCERE ȘI SCOPUL TEZEI**

Pielea reprezintă principala barieră de protecție a organismului împotriva agresiunilor din mediul înconjurător. Radiațiile solare, toxinele, temperaturile extreme, invazia microorganismelor patogene sau traumele mecanice pot afecta integritatea pielii producând leziuni superficiale sau profunde la nivelul acesteia. Vindecarea rapidă a acestor leziuni este esențială pentru restabilirea funcțiilor țesutului afectat și constă într-o cascadă de evenimente celulare, a căror evoluție depinde în special de caracteristicile rănii.

Tratamentul standard în cazul rănilor profunde îl reprezintă transplantul cu grefe de piele autologe, însă accesul pacienților la acest tratament este într-o mare măsură limitat. Domeniul ingineriei tisulare oferă însă alternative promițătoare, prin realizarea unor substituenți echivalenți de piele sau a unor matrici aceluare biocompatibile și resorbabile de tipul pansamentelor, menite să accelereze procesul de vindecare al rănilor. Deși o parte dintre aceste produse se comercializează deja, există o preocupare intensă pentru dezvoltarea altor materiale destinate regenerării tisulare care să compenseze dezavantajele produselor existente.

Cele mai multe materiale folosite în prezent au la bază biopolimeri naturali de tipul colagenului, acidului hialuronic, chitosanului, algiનાților sau elastinei, substanțe naturale care ulterior pot fi asimilate de organism, atunci când noul țesut este regenerat. De cele mai multe ori aceste produse regenerative pot încorpora în compoziția lor antibiotice, peptide, factori de creștere, plasmă îmbogățită cu trombocite (PRP), celulele stem proprii pacientului sau extracte de origine vegetală.

Compușii naturali, izolați din plante au un potențial mare în regenerarea tisulară, însă utilizarea lor conform medicinei tradiționale, necesită validare științifică pentru elucidarea principiilor active și mecanismelor prin care acestea stimulează vindecarea rănilor. Eficiența plantelor în tratamentul rănilor se datorează în special activității antimicrobiene și antioxidante atribuite fitoconstituenților de tipul triterpenelor, alcaloizilor, flavonoidelor, taninurilor, saponinelor sau polizaharidelor, prezenți în extractele vegetale.

Un alt domeniu de interes pentru regenerarea tisulară îl reprezintă cel al terapiilor celulare, unde celulele stem ies în evidență datorită perspectivelor promițătoare de

utilizare la nivel clinic. Celulele stem sunt celule nediferențiate cu o capacitate proliferativă extinsă, cu posibilitatea de auto-reînnoire și de diferențiere în diferite tipuri celulare.

În prezenta teză de doctorat, ne-am propus realizarea unor matrici bioresorbabile pe bază de componente naturale de origine animală și vegetală destinate regenerării pielii lezate, cu rol de pansament și/sau transportor de celule la situsul leziunii tegumentului. În acest scop au fost studiate următoarele aspecte:

➤ Determinarea principalelor clase de compuși biologic activi din extracte vegetale bogate în polifenoli și polizaharide obținute din specia *Artemisia absinthium*.

➤ Evaluarea activităților biologice: antioxidante, antiinflamatoare, citoprotectoare și antimicrobiene a extractelor vegetale obținute.

➤ Elaborarea unor biomateriale poroase 3D pe bază de colagen și agaroză îmbogățite cu extracte polifenolice și polizaharidice izolate din specia *Artemisia absinthium* precum și caracterizarea acestora din punct de vedere ultrastructural, biochimic și biologic.

➤ Demonstrarea funcționalității variantelor de biomateriale ca potențiale pansamente în repararea și regenerarea țesutului dermal utilizând teste asociate procesului de vindecare *in vitro* și *in vivo*.

➤ Obținerea unei culturi de celule stem din țesut adipos uman, cu caracteristici specifice celulelor mezenchimale (MSC).

➤ Elaborarea unui protocol de diferențiere al celulelor stem mezenchimale în celule epidermale în sistem 2D (placa de cultură) și 3D (matrice de colagen îmbogățită cu extract vegetal de *Artemisia absinthium*).

➤ Evaluarea interacției celulelor stem mezenchimale cu keratinocite epidermale umane în sisteme de co-cultură în vederea elaborării unui model experimental *in vitro* menit să reproducă cât mai fidel mediul *in vivo*.

Toate experimentele realizate au urmărit selecția variantelor de structuri tridimensionale optime pentru repararea și regenerarea țesutului dermal lezat, acestea putând funcționa ca pansament pentru răni, dar și ca sistem de cultivare *ex vivo* a celulelor, respectiv transportor celular la nivelul leziunii tegumentului.

Lucrarea este constituită din **4 capitole**, în primele două sunt prezentate cele mai noi date din literatură legate de strategiile abordate în prezent în tratamentul rănilor pielii, iar următoarele două cuprind partea originală a tezei și anume materialele și metodele utilizate în studiul experimental precum și rezultatele și discuțiile aferente.

**Primul capitol** prezintă mecanismele implicate în repararea și regenerarea leziunilor pielii precum și principalii mediatori implicați în acest proces. Sunt sintetizate apoi cele mai noi date din literatura de specialitate referitoare la matricile utilizate în vindecarea rănilor, punându-se accent în special pe cele care au în compoziție compuși de origine vegetală de tipul polifenolilor și polizaharidelor și modalitatea prin care aceștia pot modula repararea sau regenerarea tegumentului lezat.

**Capitolul al doilea** cuprinde aspecte generale ale celulelor stem mezenchimale, fiind prezentate de asemenea mecanismele de acțiune ale acestora în procesul de vindecare cu exemple concrete ale cercetărilor actuale.

În **capitolul al treilea** sunt descrise materialele și metodologia de lucru utilizate în studiul experimental.

## **CAPITOLUL 4. REZULTATE ȘI DISCUȚII**

### **4.1. Obținerea și caracterizarea chimică și biochimică a unor extracte de *Artemisia absinthium* cu potențial antioxidant, antiinflamator, citoprotector și antimicrobian**

Cercetări privind potențialul extractelor de *A. absinthium* în repararea și regenerarea țesutului pielii lezate nu au fost realizate până în prezent astfel că în capitolul de față s-a realizat un studiu fitochimic al unor extracte de *A. absinthium* L. (pelin) bogate în polifenoli și polizaharide, urmărindu-se în același timp și evaluarea activității lor antioxidante, antiinflamatoare, citoprotectoare și antimicrobiene.

S-au stabilit tehnici extractive optime pentru obținerea a două tipuri de extracte vegetale bogate în polifenoli și patru fracții polizaharidice de *A. absinthium*. În urma determinărilor cantitative a principalilor constituenți, au fost selectate două tipuri de extracte, unul bogat în compuși polifenolici (Pf) și altul bogat în polizaharide (Pz). În continuare, cele două extracte Pf și Pz au fost analizate pentru identificarea și dozarea principalilor compuși polifenolici, respectiv monozaharidici. Rezultatele obținute evidențiază că extractul Pf este bogat în quercetină, luteolină, apigenină și acid cafeic în



timp ce extractul Pz conține cantități semnificative de xiloză, glucoză, ramnoză și acid glucuronic. Cele două extracte au fost apoi evaluate din punct de vedere al capacității antioxidante exercitate. Activitatea antioxidantă este parametrul cheie utilizat în caracterizarea diferitelor produse nutriționale, plantelor sau componentelor lor bioactive. Evaluarea comparativă a capacității antioxidante a celor două extracte prin 4 metode complementare (ORAC, TEAC, FRAP, DPPH) a demonstrat că valorile activității antioxidante a extractului Pf sunt mai mari comparativ cu cele ale extractului Pz.

În prezent, testele *in vitro* pe culturi celulare reprezintă punctul de plecare în cercetarea farmacologică a plantelor. Testarea *in vitro* a extractelor Pf și Pz de *A. absinthium* pe o linie celulară stabilizată de fibroblaste (NCTC) a permis selectarea domeniului de concentrații necitotoxice cuprins între 10-500  $\mu\text{g/mL}$ , concentrații utilizate în experimentele ulterioare. Activitatea antiinflamatoare a extractelor vegetale selectate a fost evaluată pe o linie celulară de promonocite umane THP-1, determinându-se cantitativ nivelul de interleukine pro-inflamatoare și producția de oxid nitric. Rezultatele au evidențiat faptul că tratamentul cu extract Pf și Pz aplicat pe celulele THP-1 stimulate cu LPS a indus inhibarea producției de citokine pro-inflamatoare IL-6 și IL-1 $\beta$  eliberate în mediul de cultură, indicând capacitatea imunomodulatoare exercitată la nivel celular de aceste extracte vegetale. De asemenea, concentrațiile de 100 și 300  $\mu\text{g/mL}$  extract Pf, respectiv Pz au inhibat producția de oxid nitric.

În continuare a fost evaluat efectul citoprotector al extractului bogat în polifenoli pe un model experimental *in vitro* de inducere a stresului oxidativ cu peroxid de hidrogen, urmărindu-se influența asupra viabilității, ciclului celular și activității metaloproteinazelor matriciale (MMP). Au fost propuse 2 modele experimentale: în primul, celulele au fost tratate simultan cu peroxidul de hidrogen și diferite concentrații de extract Pf (co-tratament) și în cel de-al doilea, celulele au fost tratate cu diferite concentrații de extract Pf, timp de 24 h și, apoi, au fost expuse peroxidului de hidrogen (pre-tratament). Luând în considerare valorile viabilității celulare determinate prin testul Roșu Neutru și cele ale activității LDH obținute în cadrul celor două modele experimentale, s-a demonstrat că, doar în cazul pre-tratamentului, extractul de pelin a reușit să protejeze celulele fibroblaste de toxicitatea  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sugerând potențialul preventiv al acestuia în tratamentul celulelor afectate de speciile reactive de oxigen (Figura 19, 20).

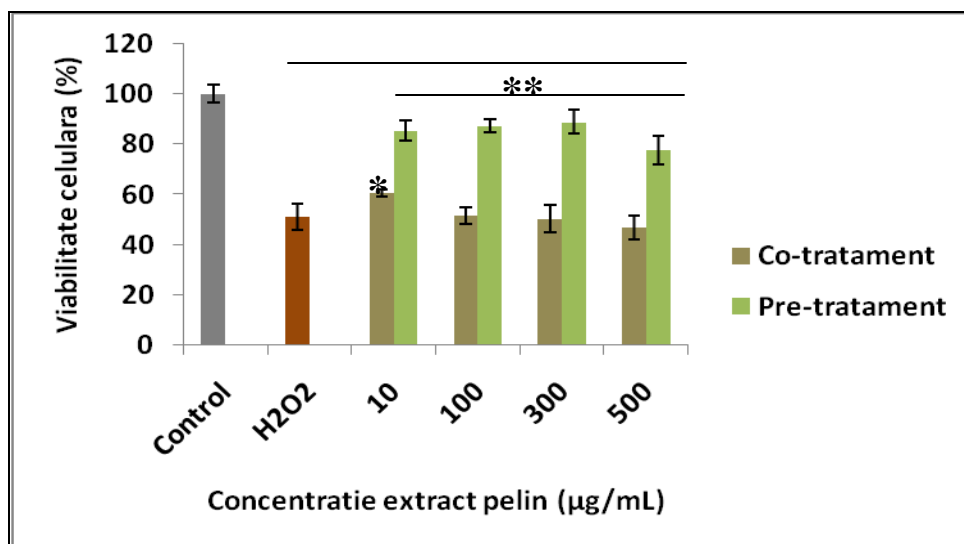


Figura 19. Efectul extractului Pf de *A. absinthium* asupra culturii de fibroblaste stresate după co-tratament și pre-tratament, evaluat prin testul Roșu Neutru. Analiza rezultatelor prin *Student's paired t-test* a prezentat diferențe statistic semnificative ale viabilității celulare, comparativ cu proba control (# $p < 0,01$ ) și proba cu peroxid de hidrogen (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

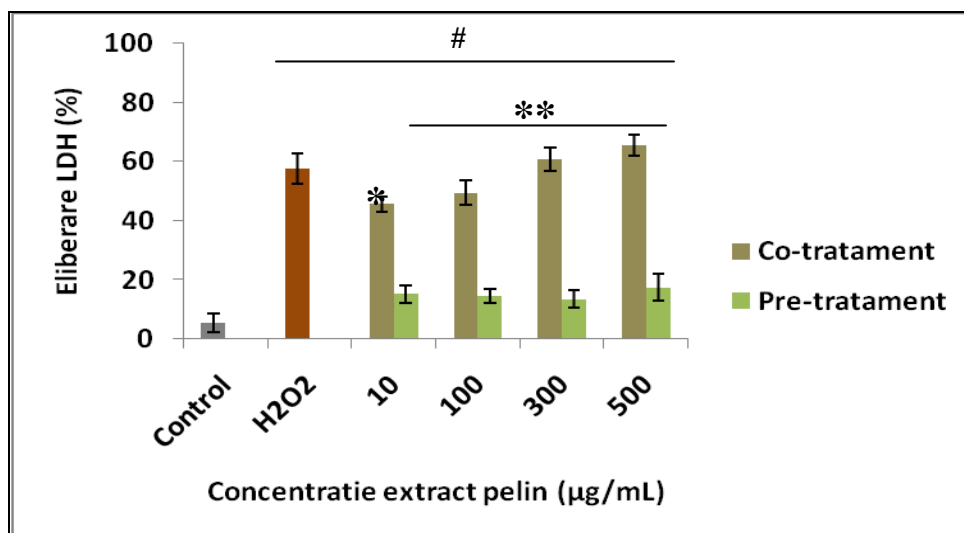
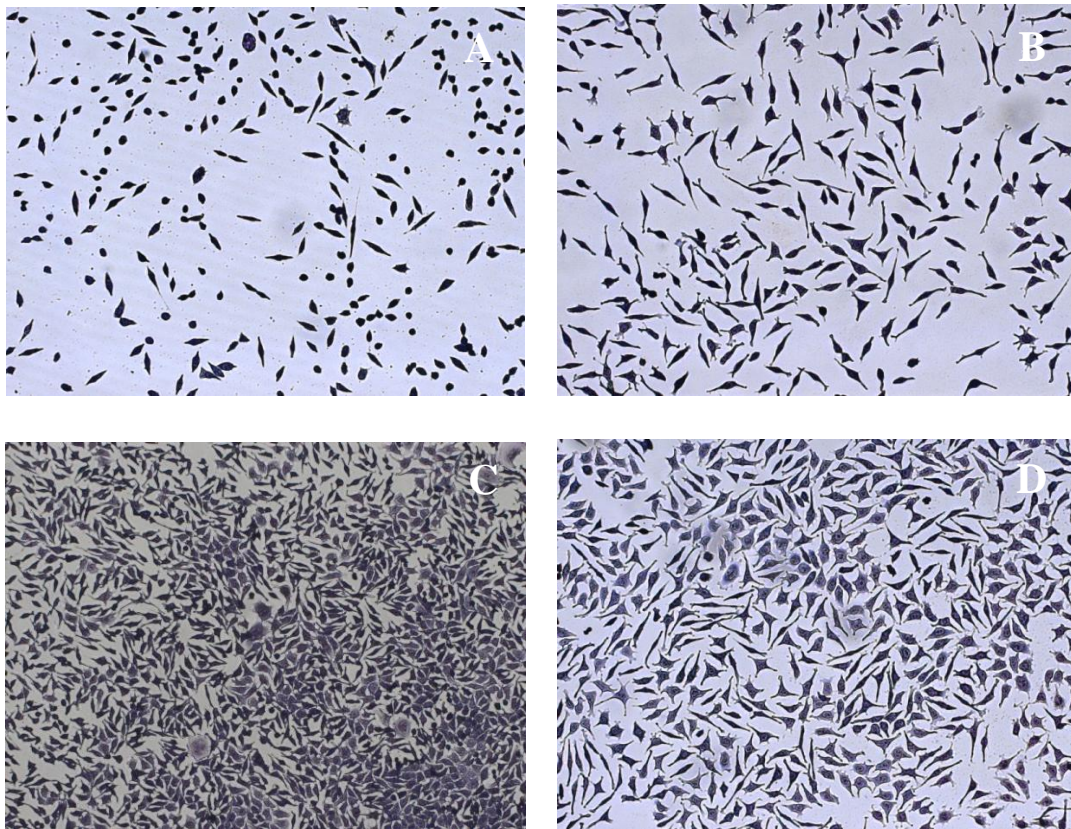


Figura 20. Efectul extractului Pf de *A. absinthium* asupra culturii de fibroblaste stresate după co-tratament și pre-tratament, evaluat prin metoda LDH. Analiza rezultatelor prin *Student's paired t-test* a prezentat diferențe statistic semnificative ale eliberării enzimei LDH comparativ cu proba control (# $p < 0,01$ ) și proba cu peroxid de hidrogen (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

Cele două modele experimentale au fost monitorizate și morfologic cu ajutorul microscopiei optice. Celulele co-tratate cu diferite concentrații de extract de pelin și 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  prezintă o morfologie alterată, cu un aspect degenerat (Figura 21 B), fiind foarte asemănătoare cu cele tratate doar cu  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 21 A) (Crăciunescu și colab., 2012).

În schimb, fibroblastele pre-tratate cu concentrații de extract Pf până în 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  prezintă un aspect morfologic normal, alungit, având o distribuție omogenă în placa de cultură (Figura 21 D), asemănătoare matorului de cultură netratat (Figura 21 C) (Crăciunescu și colab., 2012). Nu s-au evidențiat corpi apoptotici, iar unele celule se află în procesul de diviziune celulară.



**Figura 21. Imagini de microscopie optică care prezintă aspecte morfologice ale fibroblastelor NCTC tratate cu  $\text{H}_2\text{O}_2$  (A), co-tratate cu Pf 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  și  $\text{H}_2\text{O}_2$  (B), netratate (C) și pre-tratate cu Pf 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (D). Colorație Giemsa (10x).**

În cazul pre-tratamentului, rezultatele au arătat menținerea viabilității celulare la valori mai mari de 80%, secreția de LDH sub 10%, distribuția fazelor ciclului celular similară

martorului și inhibarea activității gelatinazelor. Toate aceste date au demonstrat capacitatea antioxidantă a extractului Pf de *A. absinthium* și potențialul acestuia de a fi utilizat în tratamentul rănilor țesutului dermal.

Rezultatele obținute în urma testării activității antimicrobiene a extractului Pf de pelin au indicat că acesta prezintă activitate microbiostatică la concentrația de 13 mg/mL asupra majorității culturilor microbiene aflate în suspensie, inclusiv asupra tulpinii de *Candida albicans*. În schimb, culturile microbiene aderate sub formă de biofilme au fost moderat inhibitate de către extractul de pelin, cele mai susceptibile tulpini fiind cele de *S. aureus* și *B. cereus*.

#### **4.2. Demonstrarea utilității și funcționalității unor variante de biomateriale 3D multifuncționale în procesul regenerativ de vindecare a rănilor pe modele experimentale *in vitro* și *in vivo***

În subcapitolul de față, s-a urmărit obținerea și caracterizarea ultrastructurală, fizică și biochimică a unor noi variante de biomateriale pe bază de colagen și agaroză îmbogățite cu componente vegetale extrase din specia *A. absinthium*, destinate regenerării țesutului dermic lezat. Biocompatibilitatea matricilor colagenice a fost evaluată pe o linie stabilizată de fibroblaste murine, iar efectul acestora asupra sintezei de proteine ale MEC a fost studiat pe culturi de fibroblaste dermale și keratinocite umane. De asemenea, s-a determinat gradul de proliferare al celor două tipuri celulare caracteristice pielii umane, cultivate în sistem 3D, prin injectare în biomaterialele obținute. În plus, variantele de biomateriale au fost testate pe un model experimental de stres oxidativ *in vitro* pe culturi de celule specifice pielii

S-au obținut 6 variante de biomateriale pe bază de colagen și 2 pe bază de agaroză îmbogățite cu extracte vegetale izolate din specia *A. absinthium*, respectiv C2Pf, C5Pf, C10Pf, C20P, C10Pf20Pz, C20Pz, C2Ag și C2Ag10Pf. Acestea au fost condiționate sub formă de structuri poroase 3D și au fost reticulate prin expunere la radiații UV, timp de 4 h (Figura 24).



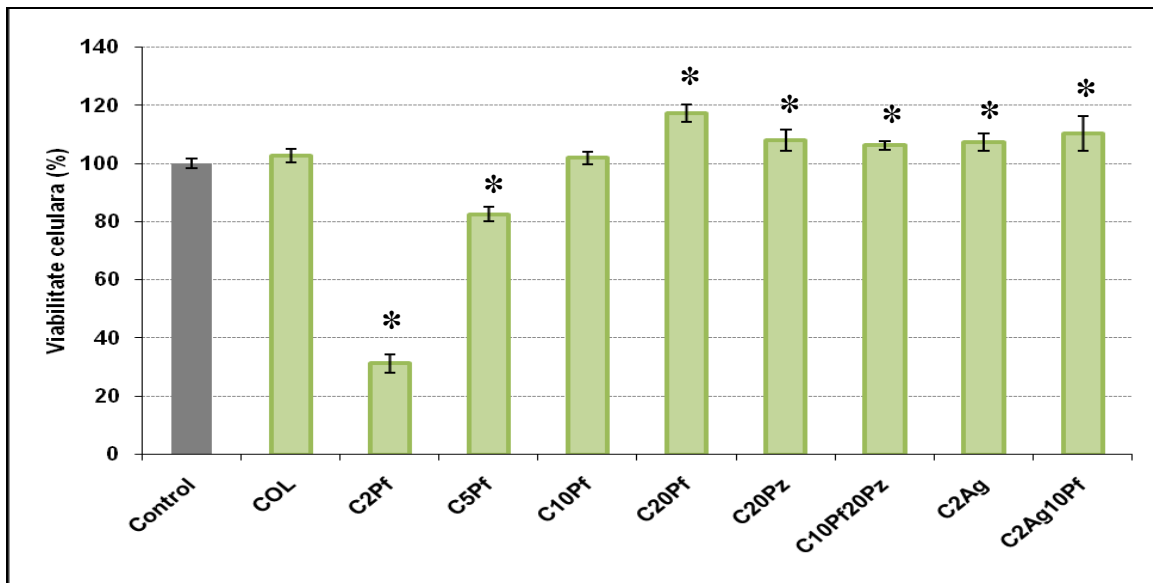
**Figura 24. Material poros pe bază de collagen și extract Pf de *A. absinthium*, vedere laterală (stânga), vedere de sus (dreapta).**

Biomaterialele 3D obținute au fost caracterizate fizico-chimic prin determinarea gradului de gonflare și a porozității, precum și biochimic, prin evaluarea rezistenței matricilor la acțiunea collagenazei. Variantele de probe studiate au prezentat valori ale porozității și dimensiunii porilor mai mici, comparativ cu proba de COL. De asemenea biomaterialele poroase au prezentat dimensiuni variabile ale porilor, în domeniul 50-200  $\mu\text{m}$ , dimensiuni ce facilitează migrarea și aderarea celulelor în interiorul structurii acestora. În schimb evaluarea gradului de gonflare al materialelor a arătat că acesta a fost dependent de cantitatea de compuși activi din extractele vegetale adăugate astfel că toate variantele asociate cu extracte vegetale au prezentat un grad de gonflare mai mare decât cel al COL, având o capacitate mare de absorbție a lichidului.

Stabilitatea materialelor collagenice s-a evaluat în urma incubării acestora cu collagenază bacteriană (izolată din *Clostridium histolyticum*). Rezultatele obținute au indicat faptul că asocierea collagenului cu extractele de *A. absinthium* a determinat creșterea rezistenței biomaterialelor la degradarea enzimatică, îmbunătățind stabilitatea lor în timp. Cele mai puțin susceptibile probe la acțiunea collagenazei au fost cele care au avut în compoziție cantități semnificative de extract Pf, respectiv C2Pf, C5Pf și C10Pf. S-a arătat de asemenea, că eliberarea compușilor biologic activi de către variantele testate a avut loc în decursul a 3 zile, reflectând funcția activă prelungită a acestor materiale.

Evaluarea biocompatibilității materialelor destinate medicinei regenerative reprezintă o etapă fundamentală în stabilirea siguranței și aplicabilității produselor respective. Testele de biocompatibilitate realizate în conformitate cu standardul SR-EN-ISO 10993-5 (destinat evaluării biologice a dispozitivelor medicale) au indicat faptul că variantele de biomateriale obținute C5Pf, C10Pf, C20Pf, C20Pz, C10Pf20Pz, C2Ag și

C2Ag10Pf nu sunt citotoxice, cu excepția variantei C2Pf care s-a dovedit citotoxică în cultura de fibroblaste NCTC (Figura 29).



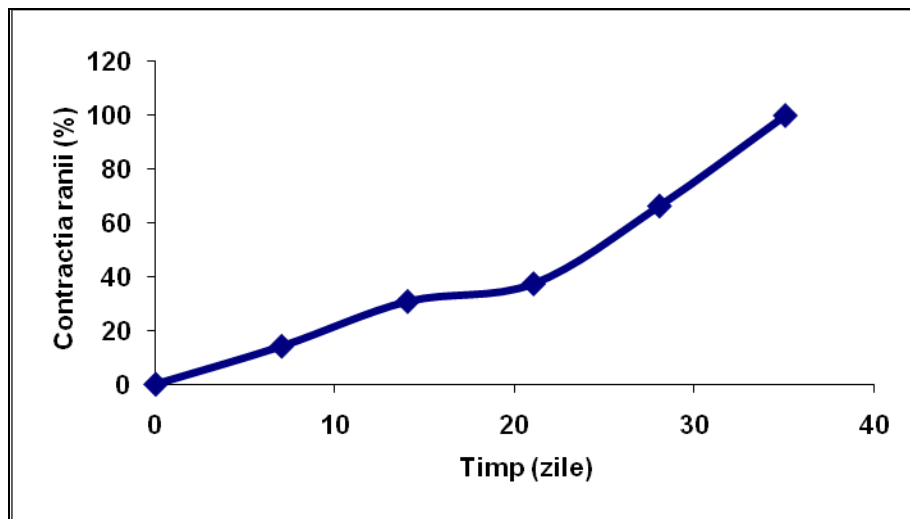
**Figura 29. Viabilitatea fibroblastelor cultivate cu extractul variantelor de materiale, evaluată prin testul MTT. Analiza rezultatelor prin *Student's paired t-test* a prezentat diferențe statistic semnificative (\* $p < 0,05$ ) ale viabilității celulare, comparativ cu proba control.**

Aplicabilitatea materialelor nou obținute în repararea și regenerarea țesutului dermal a fost testată *in vitro* pe culturi de celule ale pielii. Studiul pe culturi 2D de fibroblaste dermale și keratinocite a demonstrat că probele C10Pf și C10Pf20Pz au stimulat sinteza de proteine specifice matricei extracelulare, collagen tip I, collagen tip IV și fibronectină. În cazul injectării celulelor în materialele 3D poroase, fibroblastele dermale și keratinocitele au proliferat intens în variantele C10Pf, C10Pf20Pz și C2Ag10Pf după 5 zile de incubare. Imaginile de microscopie de fluorescență au relevat faptul că celulele au populat toate materialele, păstrându-și morfologia tipică cu prelungiri citoplasmice în cazul fibroblastelor și forma poligonală pentru keratinocite.

În procesul de regenerare tisulară, un rol esențial îl au antioxidanții endogeni, atât cei neenzimatici de tipul glutatationului (GSH), acidului ascorbic sau vitaminei E, cât și cei enzimatici reprezentați de enzime de tipul catalazei (CAT), superoxid dismutazei (SOD), glutation-S-transferazei (GST) sau glutation peroxidazei (GPX). Menținerea unui nivel

ridicat al acestor antioxidanți ar putea accelera procesul de vindecare a leziunilor pielii. În studiul de față, a fost determinat nivelul de GSH total, precum și activitatea enzimatică a CAT și GST secretate de fibroblastele dermale și keratinocitele incubate cu variantele de materiale și expuse ulterior, unui stres oxidativ generat de adăugarea peroxidului de hidrogen. Rezultatele obținute au arătat că variantele de materiale îmbogățite cu extract Pf de *A. absinthium* au arătat că acestea au protejat celulele împotriva stresului oxidativ indus de peroxidul de hidrogen, stimulând antioxidanții endogeni GSH, CAT și GST, probabil prin intermediul fitoconstituenților prezenți în extractul de pelin.

În studiul de față, varianta optimă de material, C10Pf a fost evaluată *in vivo* pe un pacient voluntar prezentând o ulceratie cronică, la nivelul feței posterioare a gambei drepte. Rana pacientului tratată cu pansament pe bază de colagen și pelin, C10Pf a fost examinată, iar contractia răni a fost măsurată la 0, 7, 14, 21, 28, 35 zile de la începerea tratamentului (Figura 38).



**Figura 38. Contractia rănii evaluată în procente pe perioada tratamentului cu varianta C10Pf.**

S-a observat reducerea defectului tegumentar treptat, prin epitelizare marginală din ziua 7, pe tot parcursul tratamentului, până în ziua 35 când leziunea a fost închisă complet. Rezultatele au demonstrat că proba C10Pf a stimulat procesul de vindecare, fără complicații și fără riscuri de infecții microbiene.



### **4.3. Izolarea celulelor stem mezenchimale umane din țesut adipos (hASC) și diferențierea lor în celule epidermale. Interacția hASC cu keratinocite umane în sisteme de co-cultură**

Obiectivul prezentului subcapitol l-a reprezentat izolarea celulelor stem mezenchimale din țesut adipos uman (hASC), caracterizarea acestora din punct de vedere imunofenotipic, evaluarea potențialului adipogenic și osteogenic, precum și diferențierea *in vitro* a acestora în celule epidermale în sistem 2D și 3D. În plus, a fost investigată și interacția dintre hASC și keratinocite umane în sisteme de co-cultură, în vederea evaluării rolului acestor celule în stimularea procesului de vindecare a rănilor pielii.

Analiza morfologiei celulare a arătat că celulele obținute din țesut adipos au aderat la suprafața plăcii de cultură formând colonii și au atins confluența după aproximativ 14 zile de la cultivare, prezentând o morfologie alungită, de tip fibroblast. În continuare, celulele izolate au fost testate prin citometrie în flux pentru evaluarea proprietății acestora de a exprima antigene de suprafață specifice MSC. Rezultatele analizei fenotipului celular au arătat că hASC izolate sunt pozitive pentru markerii CD73, CD90 și CD105 și negative pentru markerul hematopoietic CD34 (Gaspar și colab., 2016).

Toate aceste date au arătat că celulele izolate din țesut adipos au prezentat caracteristicile specifice MSC, aderând la suprafețe din plastic, formând colonii și exprimând markeri de suprafață tipici.

#### *Capacitatea de diferențiere in vitro a hASC în celule epidermale în sisteme 2D și 3D*

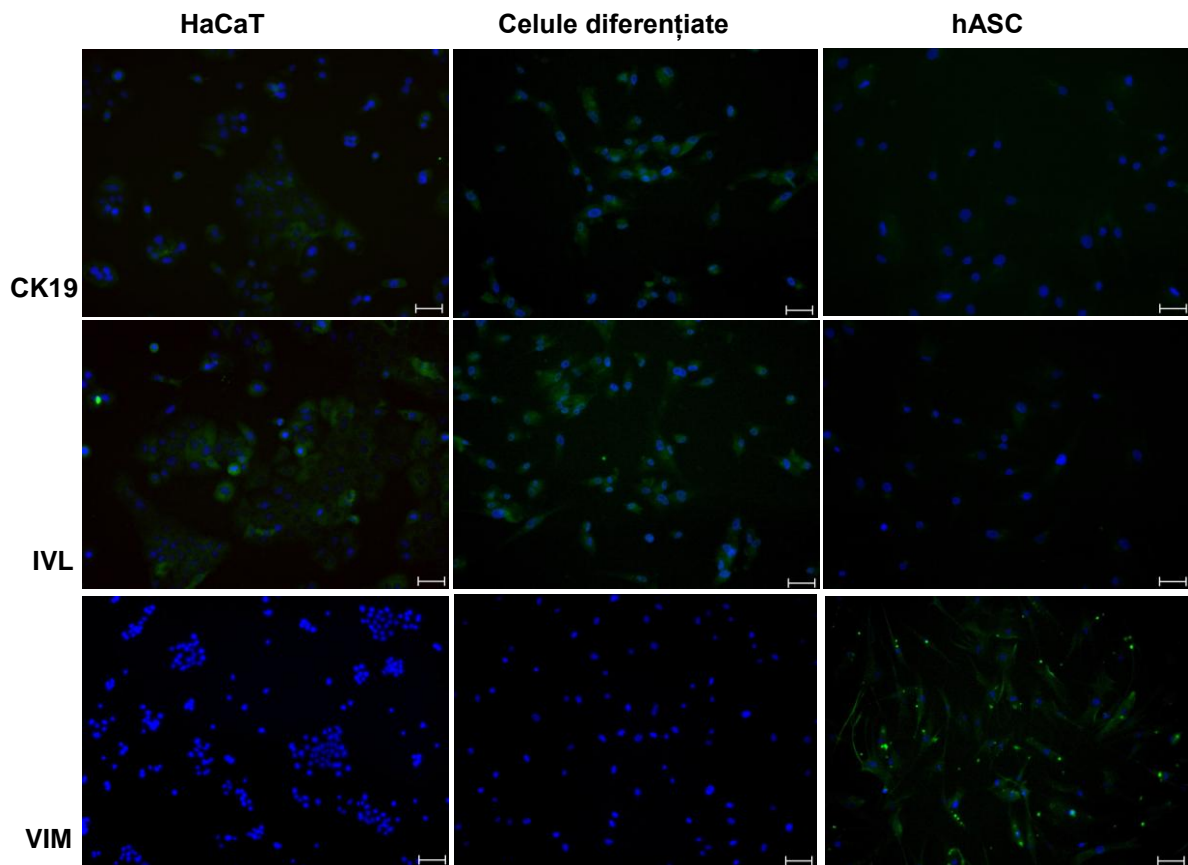
În studiul de față, procesul de diferențiere a hASC în celule epidermale, de tip keratinocite a fost inițiat utilizând un mediu de cultură suplimentat cu un amestec de substanțe stimulative: CaCl<sub>2</sub>, insulină, hidrocortizon, EGF și KGF. În plus, a fost investigată capacitatea de diferențiere a hASC după injectare într-un material 3D poros (variante optimă de material C10Pf) și cultivare în mediul inductor specific.

Expresia proteinelor specifice celulelor epidermale, citokeratina 19 (CK19) și involucrina (IVL) în celulele diferențiate a fost evaluată prin tehnici de imunofluorescență. S-a observat că celulele stem cultivate în mediu de diferențiere epidermală, timp de 21 de zile au fost pozitive pentru cei doi markeri, la fel ca și keratinocitele liniei HaCaT (Figura 44). În schimb, celulele stem cultivate în mediu de cultură normal nu exprimă cei doi markeri (Figura 44). Vimentina, o proteină specifică celulelor cu fenotip mezenchimal, a

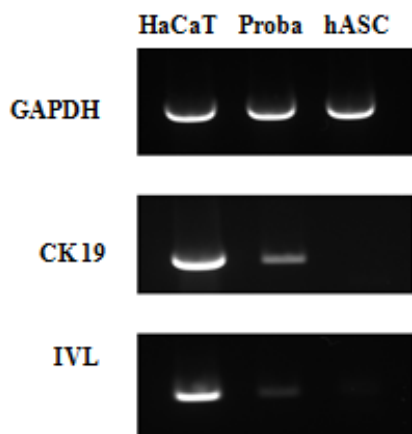


fost identificată doar în celulele stem crescute în mediu de cultură normal (Figura 44). Keratinocitele liniei HaCaT, precum și celulele diferențiate nu au exprimat vimentină (Figura 44), acest lucru indicând faptul ca fenotipul mezenchimal a fost înlocuit cu cel epidermal (Gaspar și colab., 2016).

La nivel de genă, analizele RT-PCR au arătat că celulele stem cultivate în mediu de diferențiere au exprimat cei doi markeri specifici keratinocitelor, CK19 și IVL, spre deosebire de celulele stem crescute în mediu normal în care aceștia nu au fost identificați (Figura 45) (Gaspar și colab., 2016).

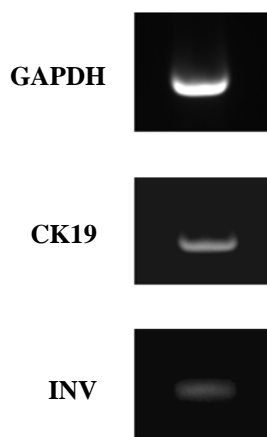


**Figura 44. Detecția markerilor specifici keratinocitelor, CK19 și IVL (bara reprezintă 50  $\mu$ m) și a markerului specific celulelor mezenchimale, VIM (bara reprezintă 100  $\mu$ m), prin imunofluorescență în culturi celulare de HaCaT, hASC și hASC cultivate în mediu de diferențiere epidermală, timp de 21 de zile.**



**Figura 45. Analiza expresiei markerilor CK19 și IVL de către celulele stem cultivate în mediu de diferențiere epidermală, în mediu normal de cultură (hASC) și de către keratinocite HaCaT, evaluată prin RT-PCR.**

Expresia markerilor CK19 și IVL, specifici keratinocitelor a fost analizată prin RT-PCR pentru celulele stem înglobate în sistemul 3D (C10P) și cultivate în mediu de diferențiere epidermală. Cei doi markeri au fost detectați în celulele diferențiate, nivelul expresiei lor fiind diferit (Figura 49). CK19, fiind un marker timpuriu al diferențierii a fost mai pronunțat comparativ cu IVL, care este un marker terminal de expresie.



**Figura 49. Analiza expresiei markerilor CK19 și IVL în celulele stem în sistemul 3D, cultivate în mediu de diferențiere epidermală, evaluată prin RT-PCR.**

După 21 de zile de cultivare, imaginile SEM au evidențiat celule cu o morfologie rotundă, apropiate fenotipului epidermal, cu dimensiuni cuprinse între 10-15  $\mu\text{m}$  și prelungiri citoplasmatică în timp ce imaginile TEM, au prezentat un aspect polimorf, evidențiindu-se celule poligonale, rotunde sau fibroblastice precum și filamente distribuite în citoplasma celulară, o caracteristică specifică keratinocitelor.

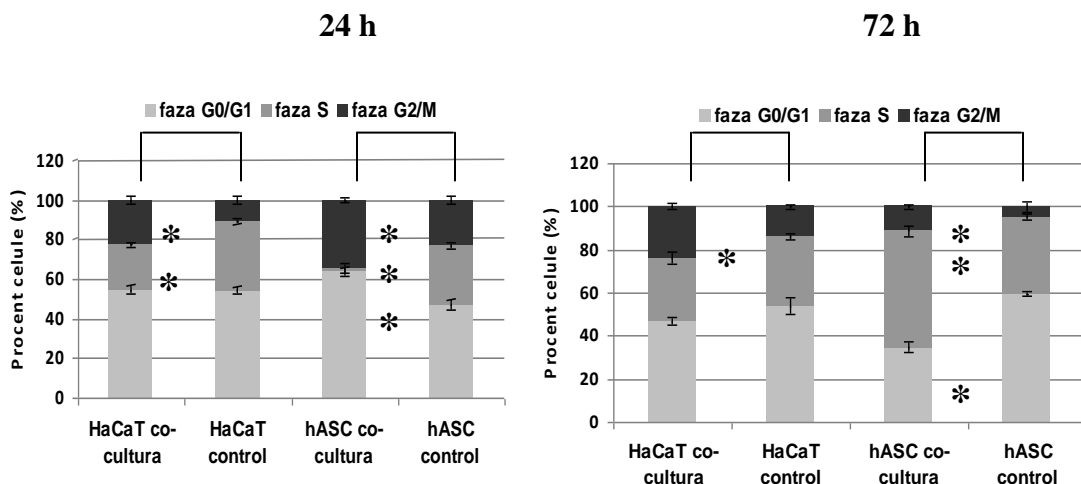
Studiul de față demonstrează că celulele stem izolate din țesut adipos uman incubate în mediu de cultură inductor specific se diferențiază în keratinocite atât în sistem 2D, cât și în sistem 3D. Spre deosebire însă de sistemul 2D, materialul 3D are avantajul ca poate servi și ca transportor de celule la situsul unei eventuale leziuni.

#### *Interacția celulelor hASC și HaCaT în sisteme de co-cultură*

Sistemele de co-cultură încearcă să reproducă cât mai mult nișa celulară existentă la nivelul țesuturilor vii, utilizându-se în special în studiul interacțiunilor celulare, unde se monitorizează dinamica migrării, proliferării, inhibării sau diferențierii celulare. În studiul de față, s-au utilizat două sisteme de co-cultură al celulelor stem hASC cu celulele HaCaT, unul ce utilizează contactul indirect prin intermediul unui sistem Transwell și altul ce folosește contactul direct.

Într-o primă etapă, s-a evaluat proliferarea celulară a celor două populații de celule aflate în fiecare compartiment al sistemului Transwell, folosind testul MTT. Rezultatele au arătat o creștere semnificativă a proliferării celulelor HaCaT co-cultivate cu hASC comparativ cu celulele HaCaT control, la 24, respectiv 72 h de cultivare (Gaspar și colab., 2016). Mai mult, în cazul celulelor stem hASC co-cultivate s-a observat o proliferare celulară foarte intensă, comparativ cu proba control, la 24 h de la începerea experimentului.

În cel de-al doilea experiment s-a utilizat un sistem de co-cultură direct al hASC-HaCaT și s-a investigat distribuția ciclului celular prin citometrie în flux al celor două populații, după 24, respectiv 72 h de co-cultivare. Rezultatele au arătat o dublare a numărului de celule aflate în faza G2/M, atât pentru celulele stem cât și pentru keratinocite, comparativ cu probele control. Acest lucru indică faptul că factorii solubili secretați în mediul de cultură de fiecare tip celular, au avut un efect pozitiv asupra proliferării celulare. Efectul stimulant al celulelor stem asupra proliferării keratinocitelor co-cultivate a fost evidențiat și în cazul sistemului Transwell utilizat.



**Figura 51. Histogramele corespunzătoare conținutului de ADN, rezultate în urma prelucrării în softul de analiză MODFIT™. Analiza rezultatelor prin *Student's paired t-test* a prezentat diferențe statistice semnificative între perechi probă-control (\* $p < 0,05$ ).**

Toate aceste date au demonstrat că interacțiunea *in vitro* dintre celulele stem și keratinocite ar putea stimula procesul de vindecare *in vivo*.

## CONCLUZII GENERALE

Obiectivele propuse în acest studiu au fost îndeplinite în întregime, conducând la următoarele concluzii:

✓ Extractele polifenolice (Pf) și polizaharidice (Pz) de *A. absinthium* utilizate la obținerea biomaterialelor au fost analizate, demonstrându-se prezența unor cantități semnificative de acizi polifenolici și flavonoide (acid cafeic, quercetină, luteolină și apigenină), respectiv acizi uronici și glucide (acid glucuronic, xiloză, glucoză și ramnoză), compuși responsabili cel mai probabil de activitățile antioxidante, antiinflamatoare, citoprotectoare și antimicrobiane. Proprietățile biologice atribuite extractelor vegetale ar putea explica mecanismele prin care acestea acționează în procesul de reparare a leziunilor pielii, indicând în cazul de față potențialul regenerativ al extractului Pf. Până în prezent, nu a fost menționat în literatura de specialitate efectul antiinflamator și citoprotector exercitat de extractele de *A. absinthium in vitro*.

✓ Noile variante de materialele compozite, pe bază de collagen și agaroză, îmbogățite cu extracte de *A. absinthium* au prezentat proprietăți considerabil

îmbunătățite, comparativ cu proba de colagen neasociat, favorizând astfel infiltrarea celulară, posibilitatea de drenare a exudatului răni, precum și stimularea formării de țesut nou, caracteristici importante în funcționarea unui produs destinat vindecării rănilor pielii.

✓ În prezența biomaterialelor a fost stimulat metabolismul fibroblastelor dermale și keratinocitelor, celule cheie implicate în vindecarea leziunilor, fiind favorizată secreția de proteine specifice matricei extracelulare precum și producția de antioxidanți endogeni.

✓ S-a demonstrat capacitatea variantei optime de material colagenic îmbogățit cu extract Pf de a servi ca pansament *in vivo*, dar și ca transportor de celule în cazul injectării hASC în matricea polimerică și incubării în mediu inductor epidermal.

✓ Capacitatea de diferențiere a celulelor stem mezenchimale izolate din țesut adipos în celule epidermale precum și abilitatea lor de a crea un mediu stimulant pentru celulele endogene prin producție de factori bioactivi, sugerează posibilitatea utilizării lor în terapiile celulare destinate reparării și regenerării tegumentului lezat. În datele din literatură nu am identificat nici un studiu care să compare diferențierea hASC în celule epidermale în sistem 2D și 3D. În plus, protocolul de diferențiere a fost utilizat pentru prima dată pe celule de origine umană.

Rezultatele obținute în această lucrare aduc o contribuție importantă la dezvoltarea de noi biomateriale destinate medicinei regenerative și la evaluarea potențialului lor terapeutic pe modele experimentale *in vitro*. De asemenea, au fost extinse metodele de validare a compușilor terapeutici de origine vegetală, încurajând utilizarea lor ca adjuvanți alături de tratamentele medicale consacrate, valorificând în același timp resursele naturale.

## **BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ**

45. Crăciunescu, O., Constantin, D., Gaspar, A., Toma, L., Uțoiu, E., Moldovan, L. (2012). Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts. *Chem Cent J*, 6:97.

85. Gaspar, A., Constantin, D., Seciu, A.-M., Moldovan, L., Crăciunescu, O., Ganea, E. (2016). Human adipose-derived stem cells differentiation into epidermal cells and

interaction with human keratinocytes in co-culture. *Turk J Biol, in press*, DOI: 10.3906/biy-1502-36.

150. Li, H., Fu, X. (2012). Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cutaneous wound repair and regeneration. *Cell Tissue Res*, 348(3), 371-7.

172. Metcalfe, A.D., Ferguson, M.W.J. (2011). Regeneration of mammalian skin. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, DOI: 10.1002/9780470015902.a0001109.pub

208. Piraino, F., Selimović, Š. (2015). A current view of functional biomaterials for wound care, molecular and cellular therapies. *BioMed Res Int*, 2015, 403801, 10 pages.

216. Ratz-Łyko, A., Arct, J., Majewski, S., Pytkowska, K. (2015). Influence of polyphenols on the physiological processes in the skin. *Phytother Res*, 29(4), 509-17.

250. Sorrell, J.M., Caplan, A.I. (2010). Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. *Stem Cell Res Ther*, 1, 30.

270. Wang, J., Hu, S., Nie, S., Yu, Q., Xie, M. (2016). Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 5692852.

## LISTA DE LUCRĂRI

Lista de lucrări publicate în timpul stagiului doctoral:

1. **Gaspar A.**, Constantin D., Seciu A.-M., Moldovan L., Crăciunescu O., Ganea E. (2016). Human adipose-derived stem cells differentiation into epidermal cells and interaction with human keratinocytes in co-culture. *Turkish Journal of Biology, in press*, DOI: 10.3906/biy-1502-36. (**FI = 1.183**)
2. Crăciunescu O., Constantin D., **Gaspar A.**, Toma L., Uțoiu E., Moldovan L. (2012). Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts. *Chemistry Central Journal*, 6:97 doi:10.1186/1752-153X-6-97. (**FI = 1.312**)
3. **Gaspar A.**, Crăciunescu O., Moldovan L., Ganea E. (2012). New composites collagen – polyphenols as potential dressing for wound care. *Romanian Journal of Biochemistry*, 49(2), 173 -181. (**CNCSIS B+**)

4. Moldovan L., **Gaspar A.**, Toma L., Crăciunescu O., Saviuc C. (2011). Comparison of polyphenolic content and antioxidant capacity of five Romanian traditional medicinal plants. *Revista de Chimie*, 62 (3), 299-303. (FI = 0.599)
5. Stanciuc A.M., **Gaspar A.**, Moldovan L., Saviuc C., Popa M., Măruțescu L. (2011). In vitro antimicrobial activity of Romanian medicinal plants hydroalcoholic extracts on planktonic and adhered cells. *Roumanian Archives of Microbiology and Immunology*, 70(1), 11-4. (CNCSIS B+)
6. **Gaspar A.**, Moldovan L., Constantin D., Stanciuc A.M., Sârbu Boeți P.M., Efrimescu I.C. (2011). Collagen-based scaffolds for skin tissue engineering, *Journal of Medicine and Life*, vol IV (2), 172-177. (CNCSIS B+)

Comunicări științifice prezentate sub formă de poster:

1. **Gaspar A.**, Constantin D., Crăciunescu O., Moldovan L., Ganea E., Mesenchymal stem cells cultivated in collagen-based scaffolds for tissue engineering application. Modern Biotechnological Advances fo Human Health – BAHH, May 20-22, 2014, Bucharest, Romania.
2. **Gaspar A.**, Moldovan L., Ganea E., *In vitro* evaluation of composite materials based on collagen and polyphenols. The Annual International Conference of the RSBMB & The Annual International Conference of Postdoctoral Program “Cellular and Molecular Biotechnologies for Medical Applications”, September 13-14, 2012, Bucharest, Romania, rezumat publicat în *Romanian Journal of Biochemistry*, 49, Suppl, 65-66, 2012. (CNCSIS B+)
3. Crăciunescu O., **Gaspar A.**, Moldovan L., Role of polyphenolic compounds on biological activity of collagenous materials. International Congres and Annual Meeting for the Society for Medicinal Plants and Natural Products Research, September 4-9, 2011, Antalya, Turcia, rezumat publicat în *Planta Medica*, 77 (12), 1418-1418, 2011. (FI = 2.153)
4. **Gaspar A.**, Toma L., Crăciunescu O., Moldovan L., Evaluation of *in vitro* antioxidant properties of some medicinal plants growing in Romania. XI<sup>th</sup> Symposium “Medicinal Plants – present and perspectives”, June 9-10, 2011,

Piatra Neamț, Romania, rezumat publicat în *Romanian Biological Sciences*, vol IX (1-4), 27-28, 2011.

De menționat că în rezumat numerotarea figurilor și a indicațiilor bibliografice corespunde celei din teza de doctorat.