



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00845**

(22) Data de depozit: **14/11/2013**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/09/2019** BOPI nr. **9/2019**

(41) Data publicării cererii:  
**29/05/2015** BOPI nr. **5/2015**

(73) Titular:  
• **INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI  
PATOLOGIE CELULARĂ  
"NICOLAE SIMIONESCU" BUCUREȘTI,  
STR. B.P. HAȘDEU NR. 8, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **BURLACU ALEXANDRINA,  
STR.SOLD. NICULAE SEBE NR.6, BL.L35,  
AP.37, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **MITROI DANIEL NICOLAE, ALE.LĂCENI  
NR.11, BL.PM83, SC.1, ET.8, AP.51,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **PREDA MIHAI BOGDAN,  
STR.SOLD. NICULAE SEBE NR.6, BL.L35,  
AP.37, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **PLEȘU MARILENA,  
160 RUE DE FRANCE, NICE, FR;**  
• **ROȘCA ANA-MARIA,  
STR.DUMBRAVA NOUĂ NR.31, BL.P47,  
SC.3, ET.2, AP.71, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **GRIGORESCU GABRIELA,  
STR.ARMENEASCĂ NR.19, AP.2,  
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **POPA MIREL ADRIAN, STR.GULIMANI  
NR.6, SAT RIMESTI, HOREZU, VL, RO;**  
• **COROTCHI MARIA CRISTINA,  
ALEEA PLOPILOR NR.24, BL.24, SC.2,  
ET.4, AP.38, TÂRGU JIU, GJ, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**LUPU M., KHALIL M., ANDREI E.,  
IORDACHE F., PFANNKUCHE K.,  
NEEF K., GEORGESCU A., BUZILA C.,  
BROCKMEIER K., MANIU H.,  
HESCHELER J., "INTEGRATION  
PROPERTIES OF WHARTON'S  
JELLY-DERIVED NOVEL MESENCHYMAL  
STEM CELLS INTO VENTRICULAR  
SLICES OF MURINE HERTS",  
CELL PHYSIOL BIOCHEM., 2011;  
BERNARD J. GERSH, ROBERT D. SIMARI,  
ATTA BEHFAR, CARMEN M. TERZIC AND  
ANDRE TERZIC, "CARDIAC CELL REPAIR  
THERAPY: A CLINICAL PERSPECTIVE",  
MAYO CLIN PROC., 2009**

(54) **PROCEDEU EX VIVO DE GREFARE A CELULELOR STEM  
ÎN SECȚIUNI VIABILE DE ȚESUT CARDIAC UMAN**



# RO 130211 B1

1 Prezenta invenție se referă la un procedeu *ex vivo* de grefare a celulelor stem în sec-  
2 țuni viabile de țesut cardiac uman. Procedeu implică cocultivarea celulelor pe o secțiune de  
3 țesut cardiac uman într-un volum minim de interacție, astfel încât să se asigure menținerea  
4 celulelor în contact direct cu țesutul, și poate fi utilizat ca un model pre-clinic de transplant  
5 celular *in vitro*, pentru studiul modificărilor celulelor stem după transplantare într-un miocard  
6 ischemic.

7 Infarctul de miocard reprezintă una dintre principalele cauze de dizabilitate și moarte  
8 din întreaga lume. Acesta se produce ca urmare a blocării fluxului coronarian, ceea ce  
9 împiedică alimentarea țesutului miocardului cu sânge, purtător de oxigen și nutrienți. Con-  
10 secința este ischemia miocardică, care duce la distrugerea vaselor de sânge și a celulelor  
11 musculare cardiace (cardiomiocite, CMC), urmată de formarea unui țesut cicatrizant și insta-  
12 larea insuficienței cardiace.

13 Terapia farmacologică clasică aplicată în prezent la pacienții cu infarct de miocard  
14 include numeroase medicamente, dintre care unele au efect doar asupra simptomelor, în  
15 timp ce altele îmbunătățesc supraviețuirea. Din păcate, însă, niciun medicament nu este  
16 capabil să producă înlocuirea țesutului cicatrizant din miocard cu țesut contracției funcțional  
17 și să restabilească vascularizația miocardică. Din această cauză, până relativ recent, deterio-  
18 rarea țesutului cardiac și instalarea insuficienței cardiace au fost considerate procese  
19 ireversibile.

20 Din perspectiva celulelor stem și a potențialului lor de diferențiere, transplantul celular  
21 poate duce la îmbunătățirea funcțională a miocardului infarctizat, prin înlocuirea celulelor  
22 moarte și refacerea structurilor vasculare afectate de ischemie. Astfel, o serie de studii reali-  
23 zate pe modele animale au arătat că transplantul de celule stem sau progenitoare are un  
24 efect protector asupra miocardului afectat de ischemie, reducând mărimea infarctului și  
25 îmbunătățind funcția cardiacă (**Gersh B. J., Simari R. D., Behfar A., Terzic C. M., Terzic  
26 A., Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective. Mayo Clin Proc 2009; 84: 876-  
27 892**). Datorită rezultatelor promițătoare ale studiilor preclinice, terapia cu celule stem și  
28 progenitoare adulte a fost introdusă și în clinică. Din păcate însă, îmbunătățirile observate  
29 în mai multe trialuri clinice au fost de scurtă durată, natura tranzientă a efectelor benefice  
30 obținute fiind pusă pe baza faptului că celulele transplantate sunt foarte slab reținute în inima  
31 infarctizată și că marea lor majoritate mor după transplantare (**Kang S., Yang Y.J., Li C. J.,  
32 Gao R. L., Effects of intracoronary autologous bone marrow cells on left ventricular  
33 function in acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis for  
34 randomized controlled trials. Coronary artery disease 2008; 19: 327-335**).

35 Aceste rezultate au impus reconsiderarea observațiilor din domeniul transplantului  
36 de celule stem și necesitatea dezvoltării de noi strategii care să maximizeze supraviețuirea,  
37 grefarea și diferențierea celulelor stem după transplantare în țesuturile afectate. Cu toate  
38 acestea, complexitatea micromediului local, ce conține numeroase celule inflamatorii, cito-  
39 kine și componente matriceale, îngreunează identificarea factorilor responsabili de anumite  
40 modificări comportamentale ale celulelor stem și progenitoare, și, astfel, face dificil de anti-  
41 cipat răspunsul celulelor stem după transplantare. Din acest motiv, au fost dezvoltate diverse  
42 modele experimentale *in vivo* și *in vitro* care simplifică studiul interacțiilor dintre celulele stem  
43 și factorii locali cu care celulele interacționează după transplantare. Dintre aceste modele,  
44 modelele *in vivo* sunt de importanță critică pentru transferul cunoștințelor în domeniul clinic  
45 și pentru analiza eficienței celulelor stem în terapia bolilor cardiace.

46 Exemple de modele *in vivo* pentru astfel de studii sunt modelele animale de trans-  
47 plant celular pe inimi afectate de infarct, indus prin ligaturarea tranzientă sau permanentă a  
48 arterei coronare stângi la animalele de laborator (**Preda M. B., Burlacu A., Electrocardio-  
49 graphy as a tool for validating myocardial ischemia-reperfusion procedures in mice,**

<b>Comp Med 2010: 60: 443-447</b> ). Deși relevante din punct de vedere experimental, dezavantajele majore ale modelelor animale sunt date de diferențele specifice speciei, costurile ridicate, dificultatea realizării și de necesitatea sacrificării unui număr mare de animale. Datorită acestor restricții, în ultimii ani se caută metode alternative, care evită sacrificarea unui număr excesiv de animale, dar care totodată pot da răspunsuri cu privire la modificările celulelor stem și progenitoare după interacțiunea cu diverse țesuturi.	1
Problema pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui procedeu <i>ex vivo</i> de grefare a celulelor stem într-o secțiune viabilă de țesut cardiac uman.	3
Procedeul <i>ex vivo</i> de grefare a celulelor stem conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că celulele se pun pentru 24 h în contact direct cu țesutul, în mediu optim pentru cultivarea celulelor stem, într-un godeu cu volum minim, obținut prin perforarea fundului unei plăci de cultivare și fixarea unei lamele pe fața exterioară a plăcii, astfel încât să se delimiteze o adâncime egală cu grosimea fundului plăcii și o suprafață cu dimensiuni similare cu cea a secțiunii tisulare.	5
Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:	7
- modelele experimentale <i>in vitro</i> sunt mult mai simplu de realizat și permit investigarea efectelor unui factor individual asupra unui tip celular.	9
- modelele <i>in vitro</i> utilizează în special culturile de celule și interacțiile celule-celule, analizând comportamentul unui tip celular ca răspuns la stimulii exercitați de celălalt tip celular sau sub acțiunea unui factor biologic activ relevant pentru o boală studiată. Cu toate acestea, răspunsul celulelor <i>in vitro</i> nu este întotdeauna relevant pentru situația <i>in vivo</i> , datorită absenței altor factori locali care pot influența comportamentul unei celule stem sau progenitoare într-o anumită situație patologică.	11
Ca alternativă la modelele <i>in vitro</i> de interacție între două tipuri celulare, procedeul descris în această invenție, de grefare a celulelor stem într-o secțiune de miocard adult uman, permite interacția celulelor cu componentele celulare și matriceale ale țesutului cardiac, reproducând la un nivel simplificat transplantul de celule stem/progenitoare la om. Avantajul secțiunilor tisulare este acela că furnizează o structură funcțională în context anatomic, ce poate fi menținută <i>ex vivo</i> cu păstrarea viabilității celulare.	13
Procedeul propus în această aplicație utilizează secțiuni de țesut miocardic uman, ceea ce crește semnificația rezultatelor obținute pentru terapia clinică a bolilor cardiace. Interacțiunea <i>ex vivo</i> a celulelor stem umane cu o secțiune de țesut cardiac uman viabil permite studiul viabilității, grefării, proliferării și diferențierii celulelor stem, precum și studiul formării de noi vase capilare în profunzimea țesutului cardiac, putând reprezenta un model pre-clinic de transplant de celule stem. Acest procedeu poate fi folosit și pentru studiul interacțiunii dintre alte tipuri de celule (de exemplu celule inflamatorii sau celule tumorale) cu diverse structuri tisulare umane.	15
Din cunoștințele noastre, aceasta este prima raportare de cocultură de celule stem cu secțiuni de țesut cardiac uman. Modelele raportate anterior în literatură pentru studiul <i>ex vivo</i> al transplantului celular în miocard se referă strict la secțiuni de miocard murin și utilizează fie introducerea directă a secțiunii tisulare în placa de cultură conținând suspensia de celule stem (Lupu M., Khalil M., Andrei E., Iordache F., Pfannkuche K., Neef K., Georgescu A., Buzila C., Brockmeier K., Maniu H., Hescheler J., <b>Integration properties of Wharton's jelly-derived novel mesenchymal stem cells into ventricular slices of murine hearts. Cell Physiol Biochem 2011;28:63-76</b> ), fie injectarea <i>in situ</i> a celulelor într-o secțiune de miocard și cultivarea secțiunii tisulare în sistem de cameră dublă (Habeler et al., 2009). Cocultivarea celulelor stem cu țesutul cardiac prin contactul lor direct într-o placă de cultură cu suprafață mare determină un randament scăzut al integrării celulelor stem în	17
	19
	21
	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

# RO 130211 B1

1 țesutul miocardic, ca urmare a aderenței acestora la substratul plăcii de cultivare. În plus,  
această metodă nu poate fi utilizată cu secțiuni de țesut cardiac adult, ci numai cu secțiuni  
3 de țesut cardiac fetal și neonatal, secțiuni ce aderă la substratul de cultivare și dau naștere  
la explant tisular. În modelul de cameră dublă descris de Habeler și colab. în 2009, celulele  
5 sunt injectate într-o secțiune de țesut cu grosimea de 1 mm care este ulterior poziționată în  
partea superioară a sistemului de cocultură, în timp ce mediul de cultură, aflat exclusiv în  
7 partea inferioară a sistemului, ajunge la secțiunea de miocard prin capilaritate, asigurând  
astfel și umiditatea necesară.

9 Spre deosebire de modelele raportate anterior, procedeul descris în această invenție  
se bazează pe contactul direct al celulelor aflate într-un volum minim de mediu de cultură cu  
11 secțiunea tisulară prin utilizarea unui godeu realizat pe fundul unei plăci de cultură, a cărui  
suprafață are dimensiuni similare cu suprafața secțiunii tisulare. În plus, utilizarea unui mediu  
13 de cultură specific pentru celulele stem asigură supraviețuirea acestora în prezența țesutului  
cardiac.

15 În procedeul propus în această aplicație, suspensia celulară este adăugată deasupra  
secțiunii tisulare, în volumul minim necesar pentru umplerea godeului, acesta variind în  
17 funcție de suprafața secțiunii de țesut. Evaporarea este prevenită prin acoperirea godeului  
cu o lamelă de cultivare și prin menținerea unei atmosfere umede. După o perioadă de cocul-  
19 tivare (care poate varia în funcție de studii), celulele grefate pot fi analizate atât *in situ* (dacă  
au fost anterior marcate cu molecule reporter ce permit identificarea celulelor transplantate  
21 printre celulele țesutului miocardic), cât și *in vitro* (după separarea lor de celelalte tipuri celu-  
lare prin tehnici imunologice, pe baza markerilor specifici pentru celulele stem) pentru diferite  
23 studii, printre care de viabilitate, grefare, semnalizare, diferențiere, angiogeneză.

25 Procedeul propus în această invenție permite studiul modificărilor suferite de celulele  
stem/progenitoare după transplantarea în țesutul miocardic, pentru care utilizarea modelelor  
de cocultivare celule-celule nu ar duce la răspunsuri reale, deoarece nu redau contextul  
27 tisular și complexitatea interacțiilor care au loc între celulele transplantate și micromediul car-  
diac. Astfel, celulele stem transplantate într-un miocard adult ischemic interacționează nu  
29 numai cu cardiomiocitele, dar și cu alte tipuri celulare prezente în miocardul ischemic (celule  
endoteliale, celule musculare netede, fibroblaști, celule inflamatoare), cu diverse citokine sau  
31 cu componente matriceale din miocardul ischemic. Cocultivarea celule-țesut permite aceste  
tipuri de interacții, iar secțiunea de miocard adult *ex vivo* este prin definiție ischemică, ceea  
33 ce permite studiul transplantului de celule stem în miocardul ischemic.

35 Utilizarea acestui procedeu de cocultivare *ex vivo* permite interacții celulare între  
celulele stem/progenitoare și micromediul cardiac, similare cu cele care au loc după un trans-  
plant celular *in vivo*. Studiile de transplant *in vivo* pe modele animale sunt costisitoare, deoa-  
37 rece necesită folosirea a câte unui animal pentru fiecare condiție experimentală testată.  
Deoarece dintr-o probă de țesut cardiac uman pot fi obținute multiple secțiuni transversale  
39 cu grosime de 300 μm, folosirea acestui procedeu de cocultivare *ex vivo* permite studiul mai  
multor condiții experimentale de transplant celular în cadrul unui singur experiment. Se evită  
41 astfel sacrificarea unui număr excesiv de animale pentru experimente preliminare de trans-  
plant celular și, în plus, se obține o relevanță mai mare pentru boala cardiacă umană.

43 Spre deosebire de secțiunile de țesut cardiac fetal și neonatal, secțiunile de țesut car-  
diac adult nu aderă la suprafața plăcuței de cultivare, ceea ce face imposibilă asigurarea  
45 contactului dintre celule și țesut pentru aderența și/sau integrarea celulelor din cocultură pe  
suprafața sau în profunzimea țesutului. Prin utilizarea procedeuului de cocultivare propus în  
47 aceasă invenție, se limitează posibilitatea de plutire a secțiunii de țesut cardiac adult în  
mediu prin utilizarea unui volum minim de lichid și prin acoperirea godeului în care are loc  
49 cocultivarea cu o lamelă.

# RO 130211 B1

Diametrul godeului variază în funcție de suprafața secțiunii tisulare. Prin alegerea unui diametru similar cu diametrul secțiunii de țesut, se asigură că suspensia de celule rămâne într-un volum minim și în imediata vecinătate a țesutului, ceea ce crește șansa integrării celulelor în țesut. De asemenea, lamela superioară previne evaporarea lichidului și asigură menținerea unui contact intim între suspensia celulară și țesut.

În continuare, se dă un exemplu concret de realizare a invenției în legătură cu fig. 1...5, care prezintă:

- fig. 1, microscopie optică ilustrând (a) aspectul unei secțiuni de țesut atrial adult uman cu grosime de 300  $\mu\text{m}$ , obținută cu ajutorul vibratomului; (b) structura histologică, evidențiată prin colorare tricromă Masson, a țesutului atrial adult uman, imediat după recoltare (stânga) și după 24 h de cultivare în mediu EGM-2 (dreapta);

- fig. 2, reprezentarea schematică a componentelor care trebuie adăugate pentru realizarea sistemului de cocultivare (stânga) și imaginea sistemului de cocultivare după asamblarea tuturor componentelor.

- fig. 3, imagine de microscopie confocală ilustrând o cultură de CEP umane după 24 h de la marcarea cu Vybrant (stânga). Pentru evidențierea celulelor, este redată imaginea corespunzătoare a celulelor în contrast de fază;

- fig. 4, imagini ale semnalului fluorescent dat de secțiunile de țesut după 24 h de cocultivare cu cantități diferite de CEP marcate cu Vybrant (10000, 20000, 50000 celule pe fiecare secțiune), prin procedura de cocultivare propusă în această invenție (cocultivare în placa modificată) și printr-o procedură clasică de cocultivare în godeu de placă de 96 godeuri. Fotografieră secțiunilor de țesut s-a realizat cu ajutorul unui sistem de imagistică IVIS Spectrum (de la firma PerkinElmer). Fiecare condiție a fost realizată în triplicat, în 4 experimente individuale. Drept control, s-au utilizat secțiuni de inimă cultivate în EGM-2 în absența CEP. Histograma ilustrează cuantificarea semnalului fluorescent din secțiunile de țesut cardiac, obținută prin definirea manuală a regiunilor de interes și analizare cu programul Living Image 4.3.1. Semnalul fluorescent este înregistrat ca fotoni/secundă/cm<sup>2</sup>/sr;

- fig. 5, (a) imagine de microscopie confocală ilustrând prezența celulelor marcate cu Vybrant în profunzimea țesutului cardiac, (b) reprezentarea imaginii confocale pe axa Z (pe o grosime de 50,83  $\mu\text{m}$ ) codificată pe culori. Atât nucleii (stânga), cât și celulele marcate cu Vybrant (dreapta) sunt redată în culori diferite, în funcție de poziția lor pe axa Z.

## Exemplu

Pentru exemplificare, s-au utilizat celule endoteliale progenitoare (CEP) izolate din sânge din cordon ombilical uman și secțiuni atriale umane de 300  $\mu\text{m}$  (fig. 1) obținute în timpul intervențiilor chirurgicale. Unitățile de sânge din cordon ombilical au fost obținute de la Clinica de Obstetrică-Ginecologie a Spitalului Clinic Dr. Ioan Cantacuzino, de la nașteri la termen, cu consimțământul informat al mamei și printr-o procedură autorizată de Comitetul de Etică al Universității de Medicină și Farmacie "Carol Davila". Biopsiile cardiace au fost recoltate cu respectarea normelor naționale și internaționale, în conformitate cu legislația actuală a Uniunii Europene și prin proceduri autorizate de Direcțiunea și de Comitetul de Bioetică al Centrului Clinic de Urgență de Boli Cardiovasculare "Prof. Vasile Cârdea".

Etapele parcurse pentru asamblarea sistemului de cocultivare CEP-țesut cardiac sunt următoarele (fig. 2):

1. O placă de cultură cu un godeu, comercializată de firma BD Falcon este găurită în centrul godeului pentru a obține un orificiu circular cu diametrul de 5 mm. În exteriorul plăcii, în dreptul orificiului, este lipită o lamelă de sticlă, pentru delimitarea unui godeu cu adâncimea de 800  $\mu\text{m}$  (reprezentată de grosimea rundului godeului) și diametru de 5 mm. Plăcuța astfel modificată și capacul ei sunt resterilizate individual, prin menținerea lor, cu interiorul în sus, într-o nișă cu lumină ultraviolet, timp de 20 min. La final, plăcuța este acoperită cu capacul și învelită în folie de aluminiu sterilă pentru păstrare.

# RO 130211 B1

1           2. Secțiunile de țesut cardiac, cu o grosime de 300 μm, se obțin prin secționarea la  
vibratom a unei probe de atriu uman. Pentru secționare, inima este înglobată, imediat după  
3           îndepărtarea din animal, în 4% agaroză preparată în soluție Tyrode, utilizând un protocol  
adaptat după un protocol descris în literatură pe inimi de șoarece (Halbach și colab., 2007).  
5           Secțiunile obținute la vibrato (fig. 1) sunt introduse în soluție Tyrode rece și utilizate imediat  
pentru experimentele de cocultivare.

7           3. CEP aflate în cultură în proliferare exponențială sunt tratate cu tripsină 0,125%  
pentru detașarea lor de substrat și incubate cu o soluție de marcarea celulară Vybrant (de la  
9           firma Molecular Probes), pentru a facilita detectarea lor în miocard la sfârșitul perioadei de  
cocultivare. După marcarea, celulele sunt spălate prin centrifugare și re-suspendate în mediul  
11          de cultură EGM-2 (comercializat de firma Lonza), pentru a fi utilizate în cocultură. Pentru a  
testa capacitatea de grefare a celulelor în mușchiul cardiac, au fost testate în acest exemplu  
13          trei densități celulare diferite:  $0,66 \times 10^6$ ,  $1,32 \times 10^6$ , sau  $3,3 \times 10^6$  celule/ml, fiecare condiție  
fiind analizată în triplicat.

15          4. Pentru cocultivarea CEP cu țesutul cardiac, câte o secțiune de țesut cardiac este  
îndepărtată din soluția Tyrode și depusă pe fundul unui godeu creat în sistemul de cocul-  
17          tivare. Secțiunea este acoperită cu 15 μl suspensie de CEP care, în funcție de densitatea  
celulară, conține un număr diferit de CEP. În acest exemplu, sunt testate 3 condiții experi-  
19          mentale, în care secțiuni de țesut cardiac sunt incubate cu 10000, 20000 și, respectiv, 50000  
celule per secțiune. La final, suspensia este acoperită cu o lamelă sterilă rotundă, cu dia-  
21          metru de 12 mm, pentru a preveni evaporarea. De asemenea, pentru asigurarea unei umi-  
dități optime, în șanțul din exteriorul godeului este introdus un volum de 3 ml apă sterilă,  
23          după care sistemul este introdus într-un incubator de 37°C, cu atmosferă cu 5% CO<sub>2</sub> și umi-  
ditate de 98% pentru 24 h de cocultivare.

25          5. La finalul incubării, secțiunea de țesut este îndepărtată din sistemul de cocultivare,  
spălată în tampon fosfat salin pentru îndepărtarea celulelor neadherente, și analizată pentru  
27          grefarea celulelor în țesutul cardiac.

Viabilitatea secțiunii de țesut cardiac a fost analizată atât înainte, cât și după 24 h de  
29          cultivare în mediu de cultură EGM-2. Colorația histologică Masson a țesutului proaspăt recol-  
tat a arătat prezența celulelor miocardice, specifice musculaturii cardiace, și a unei cantități  
31          importante de colagen, caracteristice unei cardiomiopatii avansate. Cultivarea pentru 24 h  
a țesutului cardiac a indus modificări specifice ischemiei tisulare, caracterizate prin contrac-  
33          tarea celulelor cardiace și creșterea conținutului de țesut fibros (fig. 1b).

Grefarea celulelor în țesutul cardiac uman a fost analizată la finalul perioadei de  
35          cocultivare prin testarea comparativă a procedurii de cocultivare descrise în prezenta inven-  
ție și a unei proceduri clasice de cocultivare, în care celulele și secțiunea tisulară sunt puse  
37          în contact direct într-un godeu de placă de 96 godeuri (de la firma Nune), într-un volum de  
100 μl, volumul optim recomandat de producător. Înainte de cocultivare, celulele au fost mar-  
39          cate fluorescent cu Vybrant (soluție de marcarea celulară comercializată de firma Molecular  
Probes). Pentru testarea eficienței de grefare, au fost utilizate 10000, 20000, respectiv 50000  
41          celule per secțiune de țesut, celule care au fost repartizate în 15 μl (pentru sistemul de  
cocultivare utilizat în procedeul propus spre brevetare) și, respectiv, în 100 μl (în placa de  
43          96 godeuri).

Rezultatele au arătat că această cocultivare a CEP cu țesutul cardiac prin procedeul  
45          descriș în această invenție duce la grefarea CEP în profunzimea țesutului cardiac. Astfel,  
analiza cu sistemul de imagistică IVIS Spectrum (de la firma Perkin Elmer) a demonstrat o  
47          fluorescență crescută a secțiunilor de miocard cocultivate cu CEP în sistemul de cocultivare,  
comparativ cu secțiunile de țesut cardiac incubate în mediu EGM-2 în absența CEP și cu

# RO 130211 B1

secțiunile de țesut cocultivate cu CEP în plăci de 96 godeuri. Mai mult, fluorescența secțiunilor a fost direct proporțională cu numărul de CEP fluorescente utilizate pentru cocultivare (fig. 4). Acest rezultat indică faptul că cocultivarea CEP în contact direct cu țesutul cardiac prin procedeul descris în această invenție, duce la aderarea CEP de țesutul miocardic adult, cu o eficiență mai mare decât cea obținută prin procedeul clasic de cocultivare celule-țesut.

Pentru a determina localizarea CEP în țesutul cardiac după cocultivarea în sistemul descris în această invenție, secțiunile de țesut incubate cu 50000 CEP au fost fixate în 4% PFA la finalul perioadei de cocultivare și analizate prin microscopie confocală pe XYZ. Aceste studii permit evidențierea celulelor pe întreaga grosime a preparatului (300 μm), putând distinge între celulele adsorbite la suprafața secțiunii de țesut cardiac și celulele grefate în interiorul țesutului. Analiza tridimensională a evidențiat încorporarea CEP în țesutul cardiac, acestea fiind identificate la o adâncime de 20 μm de suprafața tisulară (fig. 5). Rezultatele demonstrează faptul că cocultivarea celule-țesut pentru 24 h prin procedeul descris în această invenție permite grefarea celulelor în profunzimea țesutului cardiac și nu doar adsorbția CEP la suprafața de contact. Prin grefare în țesutul cardiac, celulele intră în contact cu toate elementele celulare și matriceale prezente în miocard, ceea ce face ca procedura de cocultivare descrisă în această invenție să poată fi utilizată ca un model pre-clinic de transplant celular, cu aplicabilitate în diverse studii legate de modificările celulelor stem/progenitoare după transplantare.

## Bibliografie

- Gersh BJ, Simari RD, Behfar A, Terzic CM, Terzic A. Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective. *Mayo Clin Proc* 2009; 84: 876-892.
- Halbach M, Pillekamp F, Brockmeier K, Hescheler J, Miiller-Ehmsen J, Reppel M. Ventricular slices of adult mouse hearts- a new multicellular *in vitro* model for electrophysiological studies. *Cell Physiol Biochem* 2006; 18: 1-8.
- Kang S, Yang YJ, Li CJ, Gao RL. Effects of intracoronary autologous bone marrow cells on left ventricular function in acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis for randomized controlled trials. *Coronary artery disease* 2008; 19: 327-335.
- Lupu M, Khalil M, Andrei E, Iordache F, Pfannkuche K, Neef K, Georgescu A, Buzila C, Brockmeier K, Maniu II, Hescheler J. Integration properties of Wharton's jelly-derived novel mesenchymal stem cells into ventricular slices of murine hearts. *Cell Physiol Biochem* 2011;28:63-76.
- Mitsos S, Katsanos K, Koletsis E, Kagadis GC, Anastasiou N, Diamantopoulos A, Karnabatidis D, Dougenis D. Therapeutic angiogenesis for myocardial ischemia revisited: Basic biological concepts and focus on latest clinical trials. *Angiogenesis* 2012; 15: 1-22.
- Preda MB, Burlacu A. Electrocardiography as a tool for validating myocardial ischemia-reperfusion procedures in mice. *Comp Med* 2010; 60: 443-447.
- Wei H, Ooi TH, Tan G, Lim SY, Qian L, Wong P, Shim W. Cell delivery and tracking in post-myocardial infarction cardiac stem cell therapy: an introduction for clinical researchers. *Heart failure reviews* 2010; 15: 1-14.

# RO 130211 B1

## Revendicări

1

3

1. Procedeu *ex vivo* de grefare a celulelor stem într-o secțiune viabilă de țesut cardiac uman, **caracterizat prin aceea că** celulele se pun pentru 24 h în contact direct cu țesutul, în mediu optim pentru cultivarea celulelor stem, într-un godeu cu volum minim, obținut prin perforarea fundului unei plăci de cultivare și fixarea unei lamele pe fața exterioară a plăcii, astfel încât să se delimiteze o adâncime egală cu grosimea fundului plăcii și o suprafață cu dimensiuni similare cu cea a secțiunii tisulare.

5

7

9

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** evaporarea lichidului este împiedicată prin acoperirea godeului cu o lamelă de sticlă și asigurarea unei atmosfere umede în vecinătatea godeului.

11

13

3. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** la finalul perioadei de cultivare, celulele încorporate în țesutul cardiac sunt analizate *in situ* sau izolate, pentru evaluarea viabilității, grefării și în studii de semnalizare, diferențiere sau angiogeneză.





Fig. 1

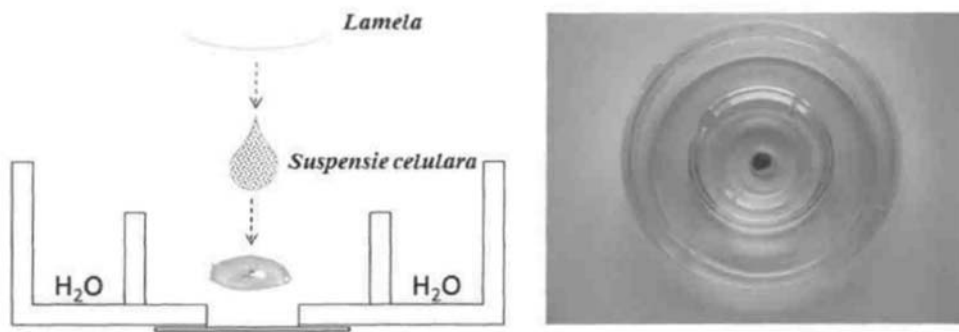


Fig. 2

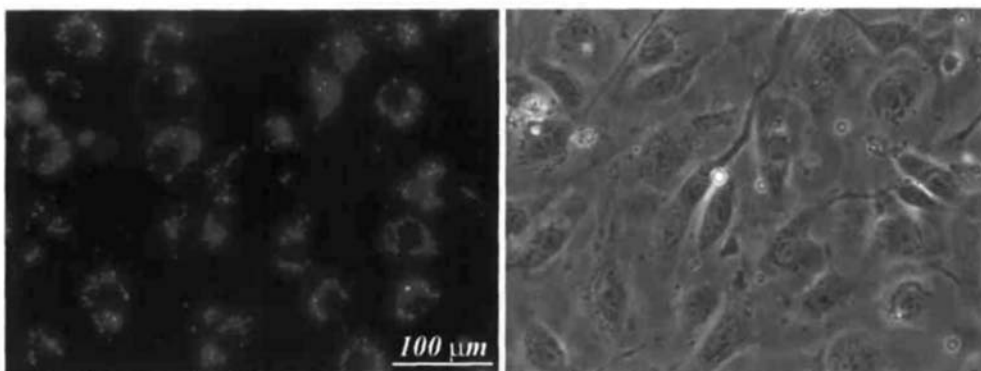


Fig. 3

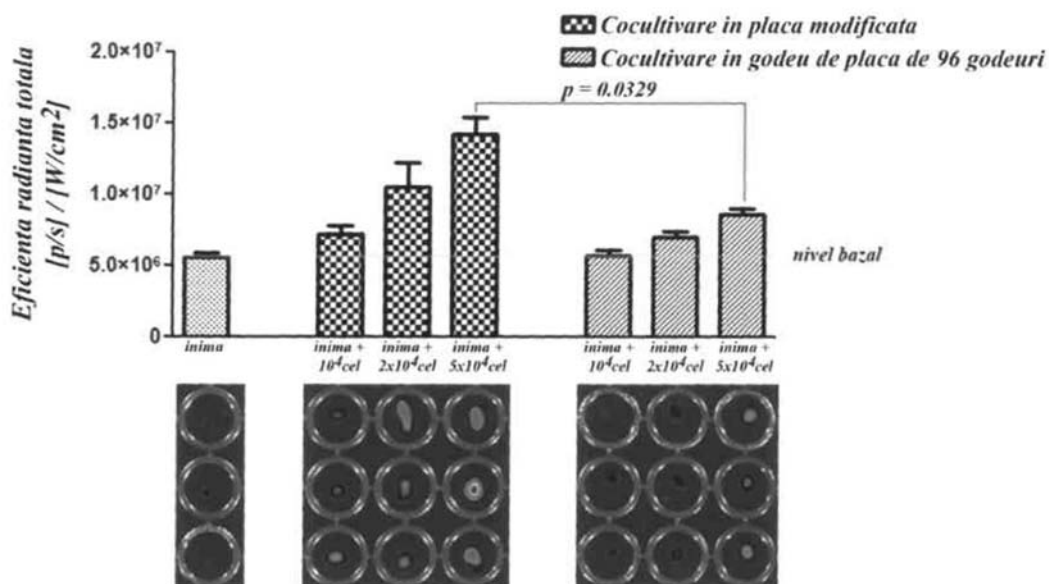


Fig. 4

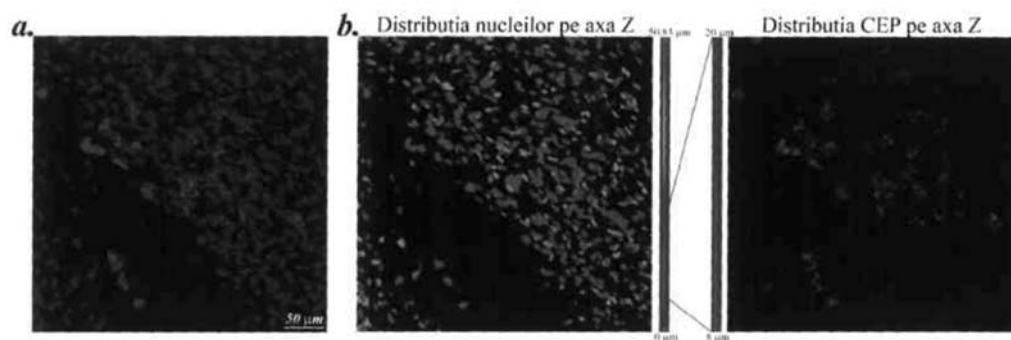


Fig. 5

