



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **14.11.2013**

(41) Data publicării cererii:
29.05.2015 BOPI nr. **5/2015**

(71) Solicitant:
• **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

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

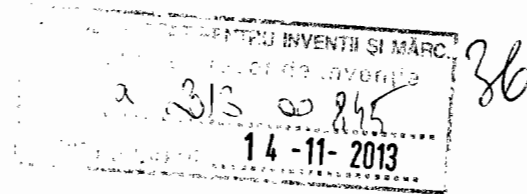
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu *ex vivo* de grefare a celulelor stem în secțiuni viabile de țesut cardiac. Procedeu conform invenției constă în realizarea unui contact direct între celule stem umane și o secțiune de țesut cardiac uman, timp de 24 h, într-un volum minim de mediu de cultură, într-un godeu obținut prin perforarea fundului unei plăci de cultură și fixarea unei lamele pe fața exterioară a plăcii, astfel încât godeul să prezinte o adâncime egală cu grosimea fundului plăcii, și o suprafață cu dimensiuni similare cu cea a secțiunii

tisulare, acoperirea godeului cu o lamelă de sticlă pe perioada cultivării, pentru prevenirea evaporării și asigurarea unei atmosfere umede în vecinătatea godeului, 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.

Revendicări: 3
Figuri: 5





DESCRIEREA INVENTIEI

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

Infarctul de miocard reprezintă una dintre principalele cauze de dizabilitate și moarte în întreaga lume. El se produce ca urmare a blocării fluxului coronarian, ceea ce împiedică alimentarea țesutului miocardului cu sânge, purtător de oxigen și nutrienți. Consecința este ischemia miocardică, care duce la distrugerea vaselor de sânge și a celulelor musculare cardiace (cardiomiocite, CMC), urmată de formarea unui țesut cicatrizant și instalarea insuficienței cardiace.

Terapia farmacologică clasică aplicată în prezent la pacienții cu infarct de miocard include numeroase medicamente, dintre care unele au efect doar asupra simptomelor, în timp ce altele îmbunătățesc supraviețuirea. Din păcate, însă, nici un medicament nu este capabil să producă înlocuirea țesutului cicatrizant din miocard cu țesut contractil funcțional și să restabilească vascularizația miocardică. Din această cauză, până relativ recent, deteriorarea țesutului cardiac și instalarea insuficienței cardiace au fost considerate procese ireversibile.

Din perspectiva celulelor stem și a potențialului lor de diferențiere, transplantul celular poate duce la îmbunătățirea funcțională a miocardului infarctizat, prin înlocuirea celulelor moarte și refacerea structurilor vasculare afectate de ischemie. Astfel, o serie de studii realizate pe modele animale au arătat că transplantul de celule stem sau progenitoare are un efect protector asupra miocardului afectat de ischemie, reducând mărimea infarctului și îmbunătățind funcția cardiacă (Gersh și colab., 2009, Mitsos și colab., 2012). Datorită rezultatelor promițătoare ale studiilor preclinice, terapia cu celule stem și progenitoare adulte a fost introdusă și în clinică. Din păcate însă, îmbunătățirile observate în mai multe trialuri clinice au fost de scurtă durată, natura tranzientă a efectelor benefice obținute fiind pusă pe baza faptului ca celulele transplantate sunt foarte slab reținute în inima infarctizată și că marea lor majoritate mor după transplantare (Kang și colab., 2008; Wei și colab., 2010).

Aceste rezultate au impus reconsiderarea observațiilor din domeniul transplantului de celule stem și necesitatea dezvoltării de noi strategii care să maximizeze supraviețuirea, grefarea și diferențierea celulelor stem după transplantare în țesuturile afectate. Cu toate acestea, complexitatea micromediului local, ce conține numeroase celule inflamatorii, citokine și componente matriciale, îngreunează identificarea factorilor responsabili de

anumite modificări comportamentale ale celulelor stem și progenitoare și, astfel, face dificil de anticipat răspunsul celulelor stem după transplantare. Din acest motiv, au fost dezvoltate diverse modele experimentale in vivo și in vitro care simplifică studiul interacțiilor dintre celulele stem și factorii locali cu care celulele interacționează după transplantare. Dintre aceste modele, modelele in vivo sunt de importanță critică pentru transferul cunoștințelor în domeniul clinic și pentru analiza eficienței celulelor stem în terapia bolilor cardiace.

Exemple de modele in vivo pentru astfel de studii sunt modelele animale de transplant celular pe inimi afectate de infarct, indus prin ligaturarea tranzientă sau permanentă a arterei coronare stângi la animalele de laborator (Preda și Burlacu, 2010). 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.

Spre deosebire de modelele in vivo, modelele experimentale in vitro sunt mult mai simple de realizat și permit investigarea efectelor unui factor individual asupra unui tip celular. Aceste modele in vitro 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 in vitro nu este întotdeauna relevant pentru situația in vivo, datorită absenței altor factori locali care pot influența comportamentul unei celule stem sau progenitoare într-o anumită situație patologică.

Ca alternativă la modelele in vitro 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 ex vivo cu păstrarea viabilității celulare.

Procedeul propus în această aplicație utilizează secțiuni de țesut miocardic uman, ceea ce crește semnificația rezultatelor obținute pentru terapia clinică a bolilor cardiace. Interacțiunea ex vivo 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 preclinic 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.

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 ex vivo 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 și colab., 2011), fie injectarea in situ 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 marcă determină un randament scăzut al integrării celulelor stem în țesutul miocardic, ca urmare a aderenței lor la substratul plăcii de cultivare. În plus, această metodă nu poate fi utilizată cu secțiuni de țesut cardiac adult, ci numai cu secțiuni de țesut cardiac fetal și neonatal, secțiuni care aderă la substratul de cultivare și dau naștere la explant tisular. În modelul de cameră dublă descris de Habeler și colab în 2009, celulele 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 partea inferioară a sistemului, ajunge la secțiunea de miocard prin capilaritate, asigurând astfel și umiditatea necesară.

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 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 de cultură specific pentru celulele stem asigură supraviețuirea acestora în prezența țesutului cardiac.

În procedeul propus în această aplicație, suspensia celulară este adăugată de-asupra secțiunii tisulare, în volumul minim necesar pentru umplerea godeului, acesta variind în 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 cocultivare (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 printre celulele țesutului miocardic), cât și in vitro (după separarea lor de celelalte tipuri celulare prin tehnici imunologice, pe baza markerilor specifici pentru celulele stem) pentru diferite studii, printre care de viabilitate, grefare, semnalizare, diferențiere, angiogeneză.

Procedeu 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 tisular și complexitatea interacțiilor care au loc între celulele transplantate și micromediul cardiac. Astfel, celulele stem transplantate într-un miocard adult ischemic interacționează nu 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 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 ce permite studiul transplantului de celule stem în miocardul ischemic.

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 transplant celular in vivo. Studiile de transplant in vivo pe modele animale sunt costisitoare, deoarece 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 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 astfel sacrificarea unui număr excesiv de animale pentru experimente preliminare de transplant celular și, în plus, se obține o relevanță mai mare pentru boala cardiacă umană.

Spre deosebire de secțiunile de țesut cardiac fetal și neonatal, secțiunile de țesut cardiac adult nu aderă la suprafața plăcuței de cultivare, ceea ce face imposibilă asigurarea contactului dintre celule și țesut pentru aderarea și/sau integrarea celulelor din cocultură pe suprafața sau în profunzimea țesutului. Prin utilizarea procedeuului de cocultivare propus în aceasta 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 cocultivarea cu o lamelă.

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 cele ce urmează, se dă un exemplu concret de realizare a invenției în legătură cu figurile 1-5. Pentru exemplificare, s-au utilizat celule endoteliale progenitoare (CEP) izolate din sânge din cordon ombilical uman și secțiuni atriale umane de 300 μm (Figura 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 Cândea”.

Prezentarea pe scurt a figurilor:

Figura 1. a. Microscopie optică ilustrând (a) aspectul unci secțiuni de țesut atrial adult uman cu grosime de 300 μm , obținută cu ajutorul vibratomului; (b) structura histologică, evidențiată prin colorare tricromă Masson, a țesutului atrial adult uman, imediat după recoltare (stânga) și după 24 ore de cultivare în mediu EGM-2 (dreapta).

Figura 2. Reprezentarea schematică a componentelor care trebuie adăugate pentru realizarea sistemului de cocultivare (stânga) și imaginea sistemului de cocultivare după asamblarea tuturor componentelor.

Figura 3. Imagine de microscopie confocală ilustrând o cultură de CEP umane după 24 de ore de la marcarea cu Vybrant (stânga). Pentru evidențierea celulelor, este redată imaginea corespunzătoare a celulelor în contrast de fază.

Figura 4. a) Imagini ale semnalului fluorescent dat de secțiunile de țesut după 24 ore de cocultivare cu cantități diferite de CEP marcate cu Vybrant (10.000, 20.000, 50.000 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. Fotografierea 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^2/sr .

Figura 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 μm) 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.

Etapile parcurse pentru asamblarea sistemului de cocultivare CEP-țesut cardiac sunt următoarele (figura 2):

1. O placa 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 μm (reprezentată de grosimea fundului godeului) și diametru de 5 mm. Plăcuța astfel modificată și capacul ei sunt re-sterilizate individual, prin menținerea lor, cu interiorul în sus, într-o nișă cu lumină ultraviolet, timp de 20 minute. La final, plăcuța este acoperită cu capacul și învelită în folie de aluminiu sterilă pentru păstrare.

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 îndepărtarea din animal, în 4% agaroză preparată în soluție Tyrode, utilizând un protocol adaptat după un protocol descris în literatură pe inimi de soarece (Halbach și colab., 2007). Secțiunile obținute la vibrato (figura 1) sunt introduse în soluție Tyrode rece și utilizate imediat pentru experimentele de cocultivare.

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 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 mediu 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 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.

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 cocultivare. 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 experimentale, în care secțiuni de țesut cardiac sunt incubate cu 10.000, 20.000 și, respectiv, 50.000 celule per secțiune. La final, suspensia este acoperită cu o lamelă sterilă rotundă, cu diametru de 12 mm, pentru a preveni evaporarea. De asemenea, pentru asigurarea unei umidități optime, în șanțul din exteriorul godeului este introdus un volum de 3 ml apă sterilă. După care sistemul este introdus într-un incubator de 37°C, cu atmosferă cu 5% CO_2 și umiditate de 98% pentru 24 ore de co-cultivare.

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

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

Grefarea celulelor în țesutul cardiac uman a fost analizată la finalul perioadei de cocultivare prin testarea comparativă a procedurii de cocultivare descrise în prezenta invenție și a unei proceduri clasice de cocultivare, în care celulele și secțiunea tisulară sunt puse în contact direct într-un godeu de placă de 96 godeuri (de la firma Nunc), într-un volum de 100 μ l, volumul optim recomandat de producător. Înainte de cocultivare, celulele au fost marcate fluorescent cu Vybrant (soluție de marcarea celulară comercializată de firma Molecular Probes). Pentru testarea eficienței de grefare, au fost utilizate 10.000, 20.000, respectiv 50.000 celule per secțiune de țesut, celule care au fost repartizate în 15 μ l (pentru sistemul de cocultivare utilizat în procedeul propus spre brevetare) și, respectiv, în 100 μ l (în placa de 96 godeuri).

Rezultatele au arătat ca co-cultivarea CEP cu țesutul cardiac prin procedeul descris 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 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 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 (figura 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 50.000 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 μ m), putând distinge între celulele adsorbite la suprafața secțiunii de țesut cardiac și celulele grefate în interiorul țesutului. Analiza tridimensională a evidențiat incorporarea CEP în țesutul cardiac, acestea fiind identificate la o adâncime de 20 μ m de suprafața tisulară (figura 5). Rezultatele demonstrează faptul că cocultivarea celule-țesut pentru 24 ore prin procedeul

descriș 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 descrișă 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, Müller-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 H, 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.

REVENDICĂRI

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 ore 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 lamcle 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.

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.

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 viabilitatii, grefarii și în studii de semnalizare, diferențiere sau angiogeneză.

FIGURI



Figura 1

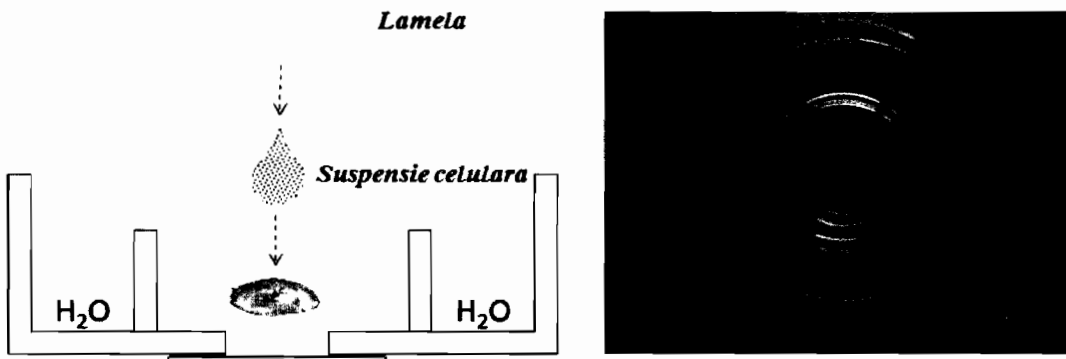


Figura 2

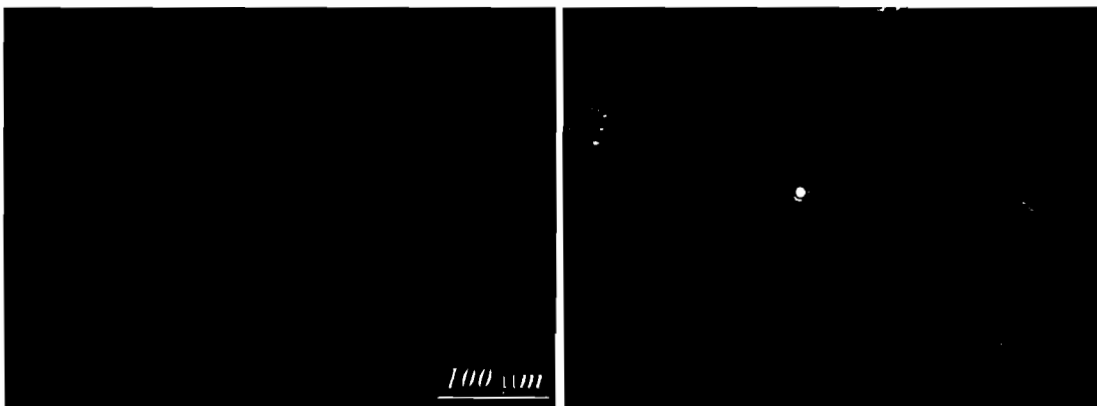


Figura 3

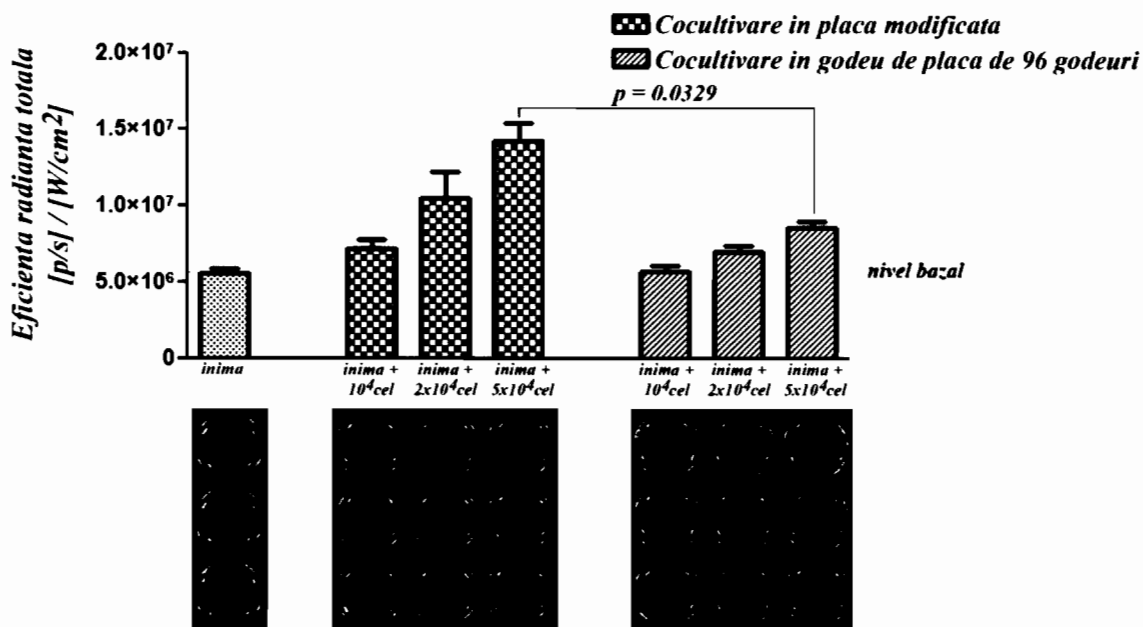


Figura 4

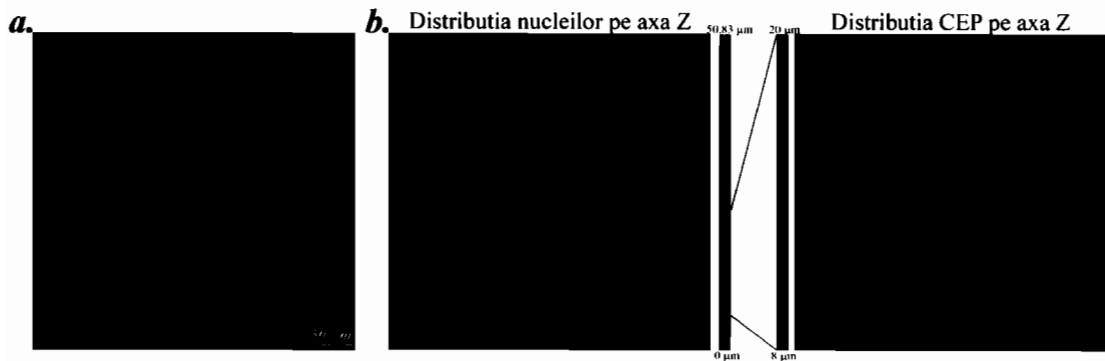


Figura 5