

Generarea, preconditionarea *in vitro* și testarea *in vivo* de înlocuitori valvulari biologici derivați din matricea extracelulară

Doctorand: **Dr. Ionela Movileanu**

Conducător de doctorat: **Prof. Univ. Dr. Klara Brînzaniuc**

Premisele studiului efectuat:

Având la bază proporția valvulopatiilor atât în cadrul grupei pediatrice cât și în cadrul vârstei adulte cu o speranță de viață în continuă creștere și binecunoscutele dezavantaje ale actualilor substituenți valvulari – necesitatea de anticoagulare permanentă în cazul protezelor mecanice respectiv numărul mare de reînlocuiri valvulare a celor biologice datorită proceselor de degenerare, este necesară conceperea următoarei generații de substituenți valvulari. Utilizând fundamente de medicină regenerativă și tehnologii de inginerie tisulară, studiul nostru are la bază un scenariu translațional de generare, preconditionare și testare a unui nou tip de proteză valvulară cardiacă utilizând suporturi temporare - scaffold-uri (valve cardiace decelularizate), care au fost repopulate cu celule specifice valvelor cardiace (diferențiate din celule stem autologe derivate din țesut adipos), iar structurile noi obținute au fost preconditionate *in vitro* (într-un bioreactor dedicat valvelor cardiace) și în final implantate în animal de experiență de origine ovină, fiind ulterior urmărite echocardiografic timp de șase luni.

Obiective:

Studiul 1: a avut ca obiectiv obținerea de suporturi temporare celulare, scaffold-uri derivate din matricea extracelulară. S-au utilizat și comparat două proceduri de îndepărtare a celulelor (dcelularizare) de la nivelul valvelor pulmonare de origine porcine. Procedura utilizată inițial a pus în evidență rezultate insuficiente cu resturi de material nucleic la nivelul matricei. În noul protocol s-a dorit îmbunătățirea rezultatelor prin adăugarea unui gradient presional. Cele două protocoale au fost analizate din punct de vedere al controlului calității – sterilitate, histologie și extracție de ADN.

Studiul 2: a fost dedicat celulelor stem derivate din țesut adipos de origine ovină, încercând identificarea unei soluții de preservare a lor și extindere a utilizării acestora în timp. De asemenea în cadrul acestui studiu s-a realizat diferențierea celulelor stem către linii celulare specifice valvelor cardiace (celule endoteliale și fibroblaști).

Studiul 3: prezintă activitatea de repopulare celulară a scaffold-urilor *in vitro* la nivel endoluminal, intersițial și adventiceal cu preconditionarea ulterioară a acestora într-un bioreactor dedicat valvelor cardiace. Valva nou obținută a fost implantată prin chirurgie pe cord deschis în circulație extracorporeală în poziție ortotopică pulmonară în model ovin de animal de experiență și testate *in vivo* pentru o perioadă de șase luni. Funcționalitatea și

performanțele valvelor au fost urmărite și documentate prin echocardiografie transesofagiană, epicardică și transtoracică iar explantele au fost analizate prin histologie clasică și imunohistochimie.

Studiul 4: reprezintă o prezentare de caz a unui pacient cu proteză mecanică în poziție aortică care asociază o patologie hematologică la mai mult de 20 de ani de la implant, iar aceasta asociată cu statusul anticoagulant al pacientului au conferit premisele unei condiții neurochirurgicale culminând cu final fatal.

Concluzii:

Studiul 1: Utilizarea agenților fizici în procedura de decelularizare – gradientul de presiune realizează o îndepărtare îmbunătățită a celulelor, asigurând o matrice extracelulară acelulară. Controlul de calitate a relevat în cazul valvelor decelularizat prin perfuzie absența nucleilor celulari la analiza histologică a componentelor valvelor respectiv nivele nedectabile de AND la procedurile de extracție.

Studiul 2: Celulele stem derivate din țesut adiops de origine ovină reprezintă o sursă de celule stem important în cercetare. Prezervarea acestora pe perioade îndelungate se poate realiza cu soluție de 10% DMSO. Diferențierea acestora către linia fibroblastică se efectuează utilizând factori de creștere iar către linia edotelială este fezabilă utilizând stimuli chimici și fizici (forțe de frecare). Expunerea la stimuli mecanici se realizează în incubator, utilizând un sistem de rotare manufacturat care nu modifică mediul din incubator.

Studiul 3: Procedurile de însămânțare pe scaffold-uri a relevat celule viabile însă repoplarea s-a realizat pe areale, existând zone valvulare fără celule. Utilizarea bioreactorului a pus în evidență valve funcționale iar utilizarea acestuia nu a avut un impact negativ asupra intergității valvelor. Procedurile de implantare chirurgicală în model animal au fost cu succes dar urmărirea echocardiografică a fost una dificilă datorită ferestrelor suboptimale. Analiza valvelor explantate a pus în evidență celule cu distribuție omogenă, fiind identificate mai ales la nivelul cuspelor.

Studiul 4: protezele valvulare cardiace de tip mecanic deși asigură pacienților valvulari un grad de calitate al vieții mult îmbunătățit și o speranță de viață crescută necesită terapie anticoagulantă care expune pacientul la o serie de riscuri cum ar fi tromboza sau sângerarea. În momentul în care acestora li se suprapun și alte condiții patologice de ordin hematologic, potențialul letal al acestora crește, clinicianul aflându-se în fața unor balanțe decizionale dificil de echilibrat.