

Denumirea proiectului: **Arhitecturi hibride 3D bioinspirate pentru repararea și regenerarea în profunzime a pielii (BioHySkin)**

Cod proiect PN-III-P2-2.1-PED-2021-3003

Contract nr. 613/2022

Etapa II. Obținerea de suporturi 3D hibride modulare și caracterizarea acestora. Optimizarea compoziției și proprietăților. Pregătirea modelului animal și teste preliminare

Scopul etapei II a proiectului l-a constituit realizarea suporturi pe bază de amestecuri polimerice, prelucrate prin reticulare, liofilizare, imprimare/bioimprimare, și evaluarea caracteristicilor fizico-chimice, mecanice și biologice (capacitate de adeziune și proliferare celulară - celule specifice pielii). De asemenea, s-a avut ca obiectiv realizarea designul experimental pentru testele *in vivo* și efectuarea de teste preliminare de implantare la animale de experiență.

Activitățile propuse în cadrul etapei II au fost realizate integral, prin corelarea aspectelor științifice și tehnice pe parcursul perioadei de derulare.

Activitate II.1. Obținerea de suporturi 3D prin reticulare și caracterizarea acestora

Utilizarea hidrogelurilor în ingineria țesuturilor se datorează proprietăților acestora, ca rețele tridimensionale care pot încorpora o cantitate semnificativă de lichide biologice, totodată oferind mediu steril, propice regenerării tisulare. În cadrul etapei s-au testat două tipuri de sisteme: a) gelatină - hialuronat de sodium (HA) și poli(alcool vinilic) – PVA, sisteme reticulate cu Genipin; b) gelatina metacrilată (GelMa) și xantan metacrilat (XGMA) și reticulare fotoindusă.

a) Hidrogeluri din gelatină - hialuronat de sodium (HA) și poli(alcool vinilic) – PVA

În cadrul etapei s-a testat realizarea de combinații cu hialuronat de sodiu (HA) și poli(alcool vinilic) – PVA, iar ca agent de reticulare s-a utilizat Genipin(GNP). Genipinul ($C_{11}H_{14}O_5$) este un glicozid iridoid, un aglicon natural derivat din geniposidă. Genioposida, una dintre glicozidele majore din extractul de fructe de gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis), este hidrolizată la agliconul genipin de către β -d-glucozidaze ce se găsesc în ficat și intestine umane. Hidrogelurile reticulate cu genipin sunt macroporoase, porozitatea și geometria porilor fiind influențată atât de raportul dintre polimeri, cât și de concentrația agentului de reticulare. Toate materialele obținute prezintă capacitate de absorbție a apei și a soluției de PBS, gradul de umflare variind în funcție de concentrația reticulantului. Cele mai ridicate valori ale gradului de umflare s-au înregistrat în cazul hidrogelurilor care conțin toți cei trei polimeri. Datele de degradare *in vitro*, în prezența colagenazei, indică o degradare accentuată a materialelor din gelatină, care au ajuns la un maxim de degradare în doar 7 zile, spre deosebire de materialele care conțin toate cele 3 tipuri de polimeri, acestea degradându-se lent. S-a arătat faptul că 2 factori principali modulează caracteristicile mecanice ale hidrogelurilor hibride analizate: cantitatea de reticulant folosit și concentrația de poli(acid acrilic) care, prin natura lui sintetică, oferă rezistență mecanică hidrogelului și proprietatea de self-healing. Testele de citotoxicitate la care au fost supuse materialele au demonstrat natura non-citotoxică a hidrogelurilor, viabilitatea celulară situându-se la valori de peste 90% pentru multe din compoziții. Analiza morfologiei la 72 de ore de contact cu celule (fibroblaste) a indicat faptul că materialele prezintă auto-fluorescență.

b) Obținerea hidrogelurilor gelatină metacrilată (GelMa) și xantan metacrilat (XGMA)

Hidrogelurile supuse testării au fost realizate pornind de la soluții de gelatină metacrilată (GelMa) și xantan metacrilat (XGMA), ambele de concentrație 2%, care s-au amestecat în diverse rapoarte, s-a adăugat complexul ruteniu-persulfat de sodiu (Ru-SPS) și supuse fotoreticulării (405 nm). Ulterior materialele au fost liofilizate, purificate (spălare cu alcoolul

etic, până la îndepărtarea excesului de Ru-SPS). Caracterizare: structurală, morfologică, cât și din punct de vedere al gradului de umflare a suporturilor și citotoxicitate *in vitro*.

Rezultatele cu privire la analiza structurală a hidrogelurilor confirmă formarea de structuri tridimensionale și reticularea polimerilor. Toate suporturile au o structură poroasă, aspect ce influențează gradul de umflare, degradarea, dar și citocompatibilitatea, proprietăți importante pentru aplicații în ingineria tisulară a țesuturilor moi.

Activitate II.2. Obținerea de suporturi 3D prin bioimprimare și caracterizarea acestora

a) Obținerea prin bioimprimare a suporturilor pe bază de gelatină și alginat de sodium/gumă de xantan reticulate cu riboflavină

Cernelurile obținute după omogenizare (agitare, în absența UV) au fost imprimate utilizând imprimanta Inkredible (Cellink, San Carlos, Statele Unite) prin tehnica extrudării ca mecanism de injectare a cernelurilor. Au fost obținute suporturi tip grilă (1×1cm), având 4 straturi grosime, modelul fiind proiectat în programul CellInk Heartwave. Procesul de extrudare a presupus injectarea cernelurilor printr-o duză metalică 22G (dimensiune de 200μm). Parametrii de imprimare au fost selectați în corelație cu vâscozitatea fiecărui amestec, reticularea realizându-se după imprimarea fiecărui strat, la 365nm. Matricile obținute au fost liofilizate și supuse caracterizării (din punct de vedere structural (spectroscopie FT-IR), capacitatea de absorbție a fluidelor simulate, dar și a compatibilității cu o linie celulară specifică pielii. Suporturile imprimate sunt reticulate, prezintă grade de umflare ridicate (atât în PBS cât și în medii de cultură), nu sunt citotoxice.

b) Obținerea prin bioimprimare a suporturilor pe bază de biopolimeri metacriilați (gelatină și alginat de sodium/gumă de xantan). Pentru realizarea de suporturi 3D prin bioimprimare s-au preparat soluții pe bază de polimeri naturali metacriilați: gelatină (20% g/vol., grad de metacrilare 62%), alginat de sodiu (5% g/vol., grad de metacrilare 13.4 %) și gumă de xantan (1% g/vol., grad de metacrilare 11.2 %). S-au realizat amestecuri la diverse rapoarte între polimeri și supuse imprimării 3D. Compoziția suporturilor influențează dimensiunile porilor și gradul de umflare în soluții tampon și medii de cultură. Suporturile bioimprimate au pori care favorizează difuzia nutrienților și dezvoltarea celulelor. De asemenea, s-a constatat că matricile nu au un efect citotoxic, proprietate care recomandă aceste utilizarea acestor materiale ca suporturi pentru medicina regenerativă, în aplicații care vizează reconstrucția și repararea țesuturilor moi.

Activitate II.3. Corelarea structură – proprietăți - aplicații. Studii de optimizare

a) Studiul influenței naturii și masei moleculare a gelatinei funcționalizate asupra capacității de obținere a cernelurilor pentru imprimare 3D

Realizarea unor cerneluri optime pentru procesele de imprimare 3D a presupus luarea în considerare a factorilor care influențează caracteristicile tehnologice, inclusive natura și masa moleculară a gelatinei funcționalizate. S-au utilizat gelatinele funcționalizate, de tip A (de origine porcină) și B (de origine bovină), guma de xantan metacrilată dar și acid hialuronic, în diverse rapoarte, utilizând mediu de cultură complet DMEM/HAM-F₁₂, ca solvent pentru polimeri. Polimerii modificați permit reacții de fotoreticulare în prezența unui fotoinițiator, formând structuri tridimensionale (3D) prin supunerea suportului imprimat la radiații UV.

Rezultate. Suporturile obținute sunt macroporoase și absorb volume mari de fluide. Referitor la degradarea enzimatică a suporturilor imprimate, cele pe bază de gelatină de tip A se degradează lent, constant, până la un prag atins la 2 săptămâni, față de cea de tip B care au o degradare mai accelerată iar echilibrul de degradare se obține la aproximativ 10 zile. Astfel, este evidentă diferența de masă moleculară a gelatinelor, cele cu gelatină metacrilată de tip A, putând oferi suport mecanic un timp mai îndelungat, până la dispersarea în organism, iar cele de tip B, de exemplu, putând fi folosite pentru o eliberare mai rapidă a unor compuși biologic activi. Natura gelatinelor utilizate nu reflectă mari diferențe în urma testelor de

citocompatibilitate, atât gelatina de origine porcină, tip A, cât și cea de origine bovină, tip B, au caracter cu potențial non-citotoxic. Aceste date de citotoxicitate sunt susținute de imaginile de morfologie celulară care atestă faptul că celulele își mențin forma specifică liniei celulare utilizate. Datorită tuturor proprietăților descrise, se are în vedere continuarea studiilor asupra acestor tipuri de sisteme.

Activitate II.4. Studii privind integrarea suporturilor și caracterizarea ansamblului 3D

Activitatea a avut ca obiectiv analiza posibilității de integrare a unor subansamble în structuri bistratificate. Într-o primă etapă s-au realizat amestecuri între gelatină metacrilată și acid hialuronic, la diferite rapoarte între polimeri, utilizându-se PBS (0.01M, pH 7.2) ca solvent pentru ambii polimeri. S-a observat faptul că o cantitate mai mare de GelMa în amestecul de cerneală conduce la o fidelitate mai bună a matricei după procesul de imprimare 3D. Datele obținute în urma evaluării capacității de retenție a fluidelor simulate confirmă formarea unei structuri compacte, acestea având un maxim de 850%, în cazul suportului cu o cantitate mai mare de GelMa în amestec. De asemenea, testele efectuate asupra cernelurilor încărcate cu celule au evidențiat capacitatea materialelor de a susține proliferarea celulară, fapt demonstrat prin imagini de morfologie celulară efectuate după 3 și respectiv 5 zile după imprimare.

Studii privind sterilizarea structurilor 3D

Analiza posibilităților de sterilizare a luat în considerare natura suportului obținut (imprimat și liofilizat sau bioimprimat cu celule).

În cazul suporturilor reticulate, imprimate și reticulate, urmate de proces de liofilizare, pentru procesul de sterilizare s-a optat pentru sterilizarea cu radiații UV, datorită accesibilității și versatilității procesului. În cazul suporturilor bioimprimate cu celule, s-a recurs la o schimbare a mediului de cultură la intervale scurte de timp (6 ore), pentru a păstra viabilitatea celulară. În plus, mediul de cultura s-a suplimentat cu ser bovin, pentru protecția materialului biologic.

Activitate II.5. Evaluarea toxicității / eficacității suporturilor - teste in vitro. Teste de citocompatibilitate. Evaluarea in vitro în culturi de celule a compozitelor. Studii privind capacitatea suporturilor de a sprijini adeziunea și proliferarea celulelor

Testele suplimentare au fost realizate pe suporturile realizate prin imprimare 3D, în obținerea cărora s-au utilizat cerneluri pe bază de gelatină și alginat de sodiu/ gumă de xantan), materiale caracterizate fizico-chimic în cadrul Activității II.2. Testele de citotoxicitate prin tehnica MTT au indicat faptul că materialele nu sunt citotoxice, viabilitatea celulară înregistrând valori mai mari de 90%. Analiza morfologiei celulare s-a realizat prin două teste de colorare specifică (Calcein AM și DAPI). Pentru demonstrarea viabilității celulare, a fost efectuat testul cu calceină AM, care este un derivat nefluorescent al calceinei permeabil la celule. Grupările acetometoxi (AM) sunt adăugate grupărilor de acid carboxilic de pe calceină, dându-i o hidrofobicitate ridicată, ceea ce face mai ușor să pătrundă în membranele celulare. Doar celulele vii sunt marcate și recunoscute, deoarece celulele moarte nu au activitate esterazică. Acest test este utilizat pentru a evalua vitalitatea celulelor, deoarece intensitatea fluorescenței este legată de activitatea esterazei. Testele de citotoxicitate au indicat faptul că matricile nu au un efect citotoxic, proprietate care recomandă aceste utilizarea acestor materiale ca suporturi pentru medicina regenerativă, în aplicații care vizează reconstrucția și repararea țesuturilor moi.

Activitate II.6. Studii in vitro post-celularizare pentru suporturile 3D

Testele morfologice efectuate asupra celulelor din suporturile imprimate utilizând cerneluri încărcate cu fibroblaste au evidențiat capacitatea materialelor de a susține proliferarea

celulară, fapt demonstrat prin imagini de morfologie celulară efectuate după 3, și respectiv 5 zile după bioimprimare. Atât morfologia celulelor este specifică liniei celulare utilizate, cât și ADN-ul celulelor nu a fost modificat, acestea reacționând cu reactivul DAPI.

Activitate II.7. Analiza critică a rezultatelor in vitro și evaluare statistică

În cadrul proiectului se propun suporturi 3D multistrat care să corespundă din punct de vedere al funcționalității în tratamentul unor leziuni cutanate de profunzime.

Din analiza proprietăților materialelor s-au evidențiat următoarele:

- metoda de obținere a compozitelor este reproductibilă, teste paralele pentru aceleași condiții experimentale conducând la materiale cu valori similare/apropiate ale proprietăților; analiza structurală a materialelor realizate prin reticulare fotoindusă, imprimare + reticulare indică formarea de legături covalente și manifestarea unor interacțiuni între polimeri, fenomene care stabilizează structura tridimensională fosfații de calciu;
- compozitele 3D au proprietăți mecanice dependente de natura polimerilor, gradul de modificare a acestora, se degradează în medii biologice simulate și rețin cantități importante de PBS, stabilitatea fiind mai ridicată pentru compozitele reticulate cu cantități mari de ritculant sau pentru polimerii metacriilați cu grade de funcționalizare ridicată;
- analiza proprietăților mecanice indică valori pentru modulul de elasticitate care favorizează manipularea în timpul intervențiilor chirurgicale și etalarea pe leziuni cutanate;
- teste de citocompatibilitate (culturi celulare) au dovedit caracterul citocompatibil a materialelor.

Activitate II.8. Pregătirea modelului animal și a procedurii de implant pe baza caracteristicilor și funcționalității ansamblurilor

Analiza literaturii de specialitate și corelarea proprietăților fizico-chimice, mecanice, de biodegradare, a impus un design experimental specific pentru testele *in vivo*.

Design experimental.

Tabel 2. Etapele desfășurării experimentului

Momentul examinării	Etape
Ziua 0	Pregătirea inelelor de silicon și formarea loturilor experimentale
Ziua 1	Aplicarea inelelor de silicon, realizarea leziunilor cutanate prin excizie, aplicarea la nivelul leziunii a compuşilor de testat, bandajarea plăgii
Ziua 7	Îndepărtarea bandajelor, colectarea probelor de țesut în vederea efectuării examenului histologic, rebandajare
Ziua 14	Îndepărtarea bandajelor, colectarea probelor de țesut în vederea efectuării examenului histologic, îndepărtarea inelelor de silicon, rebandajare
Ziua 21	Evaluare clinică

Activitate II.9 Teste de implantare pe animale de laborator

Studiul a fost realizat în conformitate cu reglementările naționale și internaționale privind bunăstarea animalelor, identificarea, controlul și eliminarea factorilor care cauzează tulburări fiziologice și de comportament: Directiva EC86/609 UE; Ordonanța Guvernului nr. 37/2002, aprobată prin Legea nr. 471/2002; Legea 205/2004 privind protecția animalelor, modificată și completată prin Legea nr. 9/2008; Ordinul comun al ANSVSA și al Ministerului Internelor și Reformei Administrative nr. 523/2008 pentru aprobarea Normelor metodologice de aplicare a Legii 205/2004 privind protecția animalelor. Avizul intern al Facultății de Medicină Veterinară Iași 396/23.03 2023.

Rezultate: La lotul M (martor pozitiv), s-a înregistrat o scădere constantă a plăgii, aceasta vindecându-se complet după 21 de zile. Aspectul plăgii cicatriceale a fost neregulat ca urmare a procesului de contracție a pielii. În cazul celorlalte două loturi (M1, M2), vindecarea a fost constantă și suprafața regulată a plăgii, acest proces fiind definitiv în 18 zile pentru M1 și completă în 21 de zile pentru lotul M2. Au fost observate diferențe semnificative de suprafață între cele două grupuri, unde epitelizarea sub materialele utilizate s-a realizat mai rapid și uniform, și lotul martor unde unde închiderea plăgi s-a realizat prin contracția pielii și formarea de țesut conjunctiv cicatriceal. Produsul test 3D hibrid are o capacitate excelentă de a induce închiderea și epitelizarea plăgii și poate fi o opțiune eficientă de tratament clinic în cele mai multe dintre cazuri. Cea mai bună evoluție spre cicatrizarea și regenerarea structurilor pielii a fost observată la produsul test M2, unde aceasta evoluție a constat în prezența de țesut conjunctiv dens, orientat, matur, numeroase vase de neoformație și tendința de diferențiere a celulelor locale în direcție epitelială, pentru refacerea epidermului.

Activitatea II.10. Management proiect, raportare etapa. Diseminarea rezultatelor

Rezultatele experimentale din cadrul proiectului au fost diseminate astfel:

Lucrări publicate în reviste cotate ISI

1. Nacu, I; Bercea, M; Nita, LE; Peptu, CA; Butnaru, M; Verestiuc, L, 3D bioprinted scaffolds based on functionalized gelatin for soft tissue engineering, *Reactive and Functional Polymers*, Volume 190, September 2023, 105636, (IF=5.1) <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2023.105636>
2. Luca A., Nacu I., Tanasache S., Peptu C.A., Butnaru M., Verestiuc L. New Methacrylated Biopolymer-Based Hydrogels as Localized Drug Delivery Systems in Skin Cancer Therapy, *Gels* 9, no. 5: 371, 2023. (IF=4.6) <https://doi.org/10.3390/gels9050371>
3. Nita L.E., Nacu I., Ghilan A., Rusu A.G., Șerban A.M., Bercea M., Verestiuc L., Chiriac A.P., Evaluation of hyaluronic acid-polymacrolactone hydrogels with 3D printing capacity, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 256, Part 2, 128279, 2024. (IF=8.2) <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128279>.
4. Chiriac A.P., Ghilan A., Serban A.M., Măcșim A.M., Bargan A., Doroftei F., Chiriac V. M., Nita L.E., Rusu A.G., Sandu A.I. 2022. "Preparation of an Antioxidant Assembly Based on a Copolymacrolactone Structure and Erythritol following an Eco-Friendly Strategy" *Antioxidants* 11, no. 12: 2471. (IF=7) <https://doi.org/10.3390/antiox11122471>

Lucrări publicate în volume conferințe indexate ISI

1. Simion A., Luca A., Cojocaru F.D., Verestiuc L., Balan V., Synthesis and Characterization of Self-assembled Hydrogels Based on Amphiphilic Derivates of Chitosan and Gelatin, *ICNBME 2023: 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering*, September 2023, Part of the IFMBE Proceedings book series (IFMBE, volume 91), 407-416

Lucrări publicate în volume conferințe naționale

1. Toma I., Nedelcu L., Hidrogeluri hibride ca pansamente pentru tratarea leziunilor cutanate, Conferința Națională BENG Conference, EDIȚIA XXV, 3-7 MAI 2023, Iasi, Romania
2. Ilie I.G., Nacu I., Tunaru A., Suporturi obținute prin bioimprimare 3d pe bază de gelatină și alginat de sodiu pentru ingineria tisulară a țesuturilor moi, Conferința Națională BENG Conference, EDIȚIA a XXV-a, 3-7 MAI 2023, Iasi, Romania

Lucrări prezentate la conferințe internaționale

1. Simion A., Luca A., Cojocaru F.D., Verestiuc L., Balan V., Synthesis and Characterization of Self-assembled Hydrogels Based on Amphiphilic Derivates of Chitosan and Gelatin, *ICNBME 2023: 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering*, September 2023, Part of the IFMBE Proceedings book series (IFMBE, volume 91), 407-416

2. Botezatu I., Nacu I., Cojocaru F.D., Balan V., Vereștiuc L., 3D Printed Scaffolds Based on Biopolymers-Calcium Phosphates and Magnetic Nanoparticles for Bone Tissue Engineering. Virtual International Scientific Conference on “Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering” NanoBioMat 2023 – Summer Edition, 28-30 June 2023
3. Nacu I., Ilie I., Tunaru A., Nita L.E., Vereștiuc L. Iliana, 3D Bioprinted Scaffolds Based on Functionalised Gelatin and Sodium Alginate for Soft Tissue Engineering, 3rd International Conference on Bioengineering and Polymer Science, Bucharest, June 7-11, 2023
4. Nacu I., Nedelcu L., Niță L.E., Vereștiuc L., Biocompatible Hybrid Scaffolds Based on Functionalized Gelatin for Soft Tissue Engineering. International Scientific Conference on “Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering” NanoBioMat 2023 – Winter Edition, Bucharest (virtual), 22-24 November 2023

Lucrări prezentate la conferințe naționale

1. Toma I., Nedelcu L., Hidrogeluri hibride ca pansamente pentru tratarea leziunilor cutanate, Conferința Națională de Bioinginerie Pentru Studenți și Tineri Cercetători (BENG Conference), EDIȚIA a XXV-a, 3-7 MAI 2023, Iasi, Romania
2. Ilie I.G., Nacu I., Tunaru Ax., Suporturi obținute prin bioimprimare 3D pe bază de gelatină și alginat de sodiu pentru ingineria tisulară a țesuturilor moi, Conferința Națională de Bioinginerie Pentru Studenți și Tineri Cercetători (BENG Conference), EDIȚIA a XXV-a, 3-7 MAI 2023, Iasi, Romania
3. Cobzariu (Nacu) I., Niță L.E., Vereștiuc L., Biocompatible scaffolds based on functionalized polymers for soft tissue engineering, SCIENTIFIC COMMUNICATIONS OF YOUNG RESEARCHERS, MacroYouth 2023, 4th Edition, Iasi, November 17, 2023

Alte activități:

1. Nedelcu Lidia, Lucrare disertație, Influența naturii și masei moleculare a gelatinei asupra capacității de obținere a biocernelurilor pentru bioimprimare, susținută în iulie 2023, Program de Masterat Biotehnologii Medicale și Biomateriale Avansate, Facultatea de Bioinginerie Medicală, Universitatea de Medicină și Farmacie Grigore T. Popa, Iași

Bibliografie Selectivă

- [1] Erdagi S.I., Ngwabebhoh F.A., Yildiz U., Genipin crosslinked gelatin-diosgenin-nanocellulose hydrogels for potential wound dressing and healing applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 149, 651-663, 2020; [2] Felicity A., Kasapis S., Modelling the mechanism and kinetics of ascorbic acid diffusion in genipin-crosslinked gelatin and chitosan networks at distinct pH, *Food Bioscience*, Vol.46, 2022; [3] Wang, X., Ge, J., Tredget, E. E. & Wu, Y. The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. *Nat Protoc* 8, 302–309 (2013); [4] Chen, L., Mirza, R., Kwon, Y., DiPietro, L. A. & Koh, T. J. The murine excisional wound model: Contraction revisited. *Wound Repair Regen* 23, 874–877 (2015); [5] Galiano, R. D., Michaels, J., V., Dobryansky, M., Levine, J. P. & Gurtner, G. C. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair and Regeneration* 12, 485–492 (2004); [6] Fischer, K. S. et al. Protocol for the Splinted, Human-like Excisional Wound Model in Mice. *Bio Protoc* 13, e4606 (2023); [7] Chakraborty, S. et al. Agrin-Matrix Metalloproteinase-12 axis confers a mechanically competent microenvironment in skin wound healing. *Nat Commun* 12, 6349 (2021); [8] Boniakowski, A. E., Kimball, A. S., Jacobs, B. N., Kunkel, S. L. & Gallagher, K. A. Macrophage-Mediated Inflammation in Normal and Diabetic Wound Healing. *J Immunol* 199, 17–24 (2017); [9] Kirby, G. T. S., Michelmore, A., Smith, L. E., Whittle, J. D. & Short, R. D. Cell sheets in cell therapies. *Cytherapy* 20, 169–180 (2018).