

DISPOZITIVE ȘI METODE BREVETATE CU UTILIZARE ÎN INGINERIA TISULARĂ***PATENTED DEVICES AND METHODS FOR UTILIZATION IN TISSUE ENGINEERING***

CZU: 61:001.894

<https://doi.org/10.56329/1810-7087.22.1.08>

DRD., MARIANA JIAN

[HTTPS://ORCID.ORG/0000-0001-9352-5866](https://orcid.org/0000-0001-9352-5866)

DRD., VITALIE COBZAC

[HTTPS://ORCID.ORG/0000-0002-5010-1163](https://orcid.org/0000-0002-5010-1163)

DR. HAB. ȘT. MED., VIOREL NACU

[HTTPS://ORCID.ORG/0000-0003-2274-9912](https://orcid.org/0000-0003-2274-9912)

LABORATORUL DE INGINERIE TISULARĂ ȘI CULTURI CELULARE,
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „NICOLAE TESTEMIȚANU”, CHIȘINĂU, REPUBLICA MOLDOVA

REZUMAT

În această lucrare sunt relatate metode și dispozitive brevetate obținute în urma activității de cercetare în cadrul proiectelor desfășurate în Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. Dispozitivele și metodele brevetate țin de domeniul ingineriei tisulare și prezintă importanță economică, tehnică și medicală prin faptul că permit de a desfășura eficient, sigur și calitativ procesul de obținere a grefelor pentru transplantare.

Cuvinte-cheie: inginerie tisulară; grefă; metodă; dispozitiv; reticulare; spongie.

ABSTRACT

This paper describes the patented methods and devices which were obtained during researches in projects conducted in the Laboratory of Tissue Engineering and Cell Cultures of SUMPh “N. Testemitanu”. Patented devices and methods are part of tissue engineering domain and are of economic, technical and medical importance, because they allow an efficient, safe and qualitative process for grafts obtaining for transplantation.

Keywords: Tissue engineering; graft; method; device; crosslinking; sponge.

Introducere

Performanțele în ingineria tisulară, un domeniu multidisciplinar, sunt rezultatul activității inovative în materie de noi metode și dispozitive care eficientizează și facilitează procesul de activitate în acest domeniu.

Ingineria tisulară este o știință relativ tânără și are ca obiectiv înlocuirea sau regenerarea țesuturilor și a organelor afectate. Acest domeniu este unul multidisciplinar având la bază știința materialelor, biologia celulară, imunologia, știința clinică [2]. Scopul ingineriei tisulare este de a obține prin tehnici inovative construcții funcționale care permit restaurarea, menținerea sau ameliorarea țesuturilor deteriorate sau a organelor întregi variind de la biomateriale la terapii cu celule stem sau terapii imune [3, 4, 5].

Domeniul ingineriei tisulare a avut o evoluție rapidă, furnizând rezultate promițătoare în satisfacerea nevoilor pacienților și devenind o provocare globală prin explorarea soluțiilor inovatoare în acordarea asistenței medicale populației [1].

În Republica Moldova, în încercările de a performa, optimiza și facilita procesul de obținere a diferitor structuri pentru ingineria tisulară, au fost brevetate o serie de metode și dispozitive.

Scopul cercetărilor noastre constă în obținerea rezultatelor calitative și veridice prin racordarea la noile tendințe în materie de tehnologii și dispozitive brevetate care influențează pozitiv domeniul vizat.

În această lucrare vă vom prezenta o parte din metodele și dispozitivele medicale brevetate în cadrul Laboratorului de inginerie tisulară și culturi celulare care au fost utilizate pentru îndeplinirea obiectivelor unor cercetări ample cu referire la ingineria tisulară, și anume obținerea biomaterialelor din collagen, a grefelor osteocondrale și a recelularizării matricilor tridimensionale decelularizate ale ficatului.

Materiale și metode

În calitate de materiale de studiu au fost utilizate: ficat de șobolan de rasa Wistar, decelularizat conform metodei propuse de Jian et. al. [11], țesut osteocondral de la iepure, demineralizat cu soluție de HCl de 0,1 N, condrocite izolate din țesut cartilagos de iepure, collagen din tendon Ahile de bovină, supus liofilizării cu liofilizatorul Unicryo, Germania. Reticularea a fost efectuată cu glutaraldehidă de 0,25 %, iar viabilitatea celulară a fost testată prin MTT cu utilizarea celulelor stem mezenchimale și a condrocitelor. Au fost studiate metode de reticulare a biomaterialelor, de obținere a grefelor pentru transplantare. Cercetările au fost efectuate în acord cu Comitetul de Etică al Cercetării.

Rezultate și discuții

În perioada anilor 2016-2021, au fost elaborate dispozitive și metode cu aplicare în ingineria tisulară, unele dintre acestea constituind rezultate din cadrul proiectului „Nanoarhitecturi în bază de GaN și matrici tridimensionale din materiale biologice pentru aplicații în microfluidică și inginerie tisulară” cu cifrul 20.80009.5007.20 din Programul de Stat 2020 - 2023.

În literatura de specialitate, procesul de reticulare a spongiilor de collagen este descris ca fiind efectuat prin contactul direct între agentul de reticulare și structurile collagenice tridimensionale [6]. Totuși, utilizarea agenților de reticulare prin contact direct prezintă anumite neajunsuri, cum ar fi: neuniformitatea reticulării, prezența reziduurilor chimice citotoxice după spălare. Astfel, scopul nostru a fost să creăm un dispozitiv de reticulare (BI SD MD 1137) care ar limita contactul direct al agentului de reticulare cu materialul biologic (spongia de collagen). Dispozitivul dat este constituit dintr-un recipient ermetic, cu o plasă în interior pe care se plasează spongia de collagen sau alte materiale biologice, și un burete din po-

liuretan îmbibat cu soluție de glutaraldehidă sau alt agent de reticulare (Figura 1).

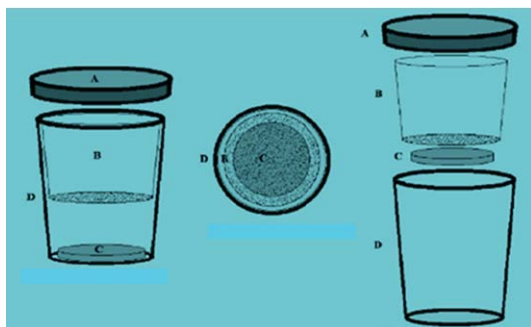


Figura 1. Dispozitiv pentru reticularea spongiei de collagen cu vapori de glutaraldehidă: A – capac; B – plasă perforată situată la 3 cm de la baza containerului, cu ochiuri de diametrul 0,5 mm; C – burete din poliuretan îmbibat cu glutaraldehidă; D – container.

Sursa: Elaborată de autori

Reticularea spongiilor de collagen cu ajutorul dispozitivului menționat se efectuează prin expunerea la vapori de glutaraldehidă, care pătrund ușor prin ochiurile plasei. Spongiile de collagen au fost reticulate cu vapori de glutaraldehidă de 0,25% (Figura 2).

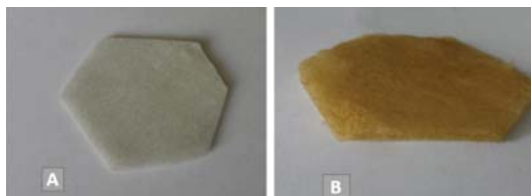


Figura 2. Spongiile de collagen: A – nereticulată; B – reticulată cu vapori de glutaraldehidă de 0,25%

Sursa: Elaborată de autori

În calitate de martor, am utilizat spongia de collagen reticulată prin imersiunea în glutaraldehidă de 0.05% versus spongia de collagen reticulată cu vapori de glutaraldehidă de 25%. Ulterior, a fost testată viabilitatea celulară la contactul cu respectivele spongi prin testul cu MTT pentru a analiza potențialul de utilizare în calitate de transplant al acestora.

Ca urmare a utilizării dispozitivului dat, am obținut spongi reticulate uniform, cu o cantita-

te redusă de polimeri de glutaraldehidă, ce sunt greu de eliminat prin spălare și care au prezentat o viabilitate mai înaltă a celulelor (72.88% vs 89.72%; $p < 0.05$; $n = 6$).

Un alt dispozitiv brevetat în cadrul laboratorului este dispozitivul pentru separarea pastei osoase demineralizate (BI SD MD 1582). Demineralizarea osoasă este un proces ce constă în eliminarea sărurilor de calciu din os cu scopul de a obține matricea proteică osoasă demineralizată, utilizată pe larg în ingineria țesutului osos și practica clinică [7]. În procesul de obținere a pastei osoase se utilizează diverse soluții apoase, care necesită a fi schimbate la anumite perioade, fapt ce se soldează cu pierderea unei cantități considerabile de os. Pentru a evita aceste pierderi, a fost elaborat dispozitivul sus-menționat. Structura dispozitivului pentru separarea pastei osoase permite reținerea particulelor de os la schimbarea soluțiilor, datorită filtrului cu porii de $\leq 100 \mu\text{m}$, ce este fixat într-un tub și în care, prin capătul superior al tubului, se introduce o pâlnie. Ca urmare, în timpul schimbării soluțiilor utilizate pentru obținerea pastei osoase demineralizate, are loc reținerea de către dispozitiv a unei cantități semnificative de pastă osoasă [Figura 3].

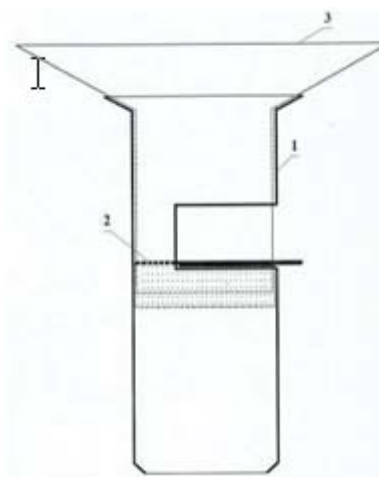


Figura 3. Elementele dispozitivului pentru separarea pastei osoase: 1 – tub; 2 – filtru; 3 – pâlnie

Sursa: Elaborată de autori

Utilizarea respectivului dispozitiv are drept rezultat păstrarea unui volum important de pastă osoasă (14-18%), care anterior se pierdea în timpul schimbării lichidelor utilizate pentru procesare. În plus, structura simplă a dispozitivului brevetat îl face ușor pe acesta în utilizare, iar pasta osoasă obținută în condiții sterile este apoi utilizată în cadrul instituțiilor medico-sanitare din țară (Figura 4).



Figura 4. Pastă osoasă demineralizată gata pentru utilizare

Sursa: Elaborată de autori

Obținerea spongiilor de collagen este foarte importantă în activitatea Laboratorului de inginerie tisulară. Conform Jong-Eun Lee et al. [8], obținerea spongiilor collagenice se realizează prin liofilizarea suspensiilor collagenice congelate în vase. Există, totuși, anumite dificultăți în detașarea spongiilor de collagen din vasul utilizat. Iată de ce ne-am propus elaborarea unei metode de obținere a spongiei de collagen (BI SD MD 1169) prin care să evităm deteriorarea spongiilor collagenice după detașare. Metoda brevetată constă în suspendarea spongiilor collagenice în timpul procesului de liofilizare. Ca urmare a utilizării respectivei metode, nu au mai fost înregistrate cazuri de deteriorare a spongiilor de collagen în timpul extragerii acestora din vasul utilizat (Figura 5).

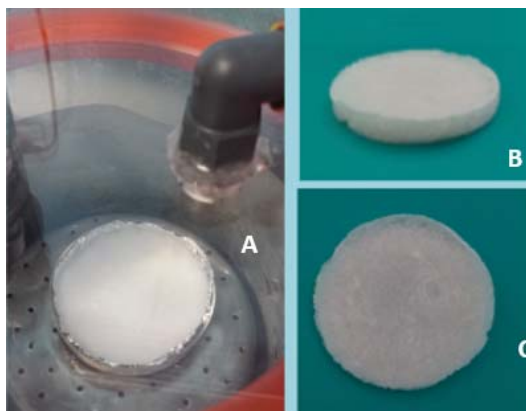


Figura 5. Spongi de collagen: A – în procesul de obținere; B, C – după liofilizare

Sursa: Elaborată de autori

Metoda dată presupune efectuarea anumitor manipulări cu soluția collagenică aflată într-un cilindru scurt, acoperit la bază cu o folie de staniol. După congelare, cilindrul cu collagenul congelat este scos din congelator, folia de staniol este detașată rapid de vas și introdusă în aparatul de liofilizare pentru uscare cu collagenul orientat în sus, la presiunea de 0.015 bar.

Conform Erggelet et. al., leziunile de cartilaj articular se întâlnesc frecvent la pacienți cu traumatisme ale articulațiilor mari, iar defectele de cartilaj pot duce la invalidizarea pacientului. Cu scop de regenerare a defectelor de cartilaj, se utilizează transplantarea de grefe osteocondrale autologe sau alogene, dar și tehnici de inginerie tisulară. Deoarece cantitatea de țesut autolog pentru grefare este foarte limitată, în special în defectele cartilaginoase mari, obținerea unei grefe alogene funcționale cu condrocite vii devenind astfel un proces dificil, dar și utilizarea tehnicilor de transplantare a condrocitelor autologe pe matrice și fără soldându-se cu formarea de țesut fibrocartilagos în loc de cartilaj hialin [11], s-a ajuns la ideea de a combina respectivele metode de tratament într-un singur tip de grefă. Astfel, am creat o grefă din țesut osteocondral (BI SD MD 1177) ce conține cartilaj articular decelularizat și

os subcondral demineralizat și poate fi populată cu celule condroprogenitoare autologe [9]. Greifa poate fi alo- sau xenogenă și este perforată pe

toată lungimea, ceea ce permite o populare bună cu celule, dar și o integrare mai eficientă a țesutului în organismul gazdă (Figura 6).

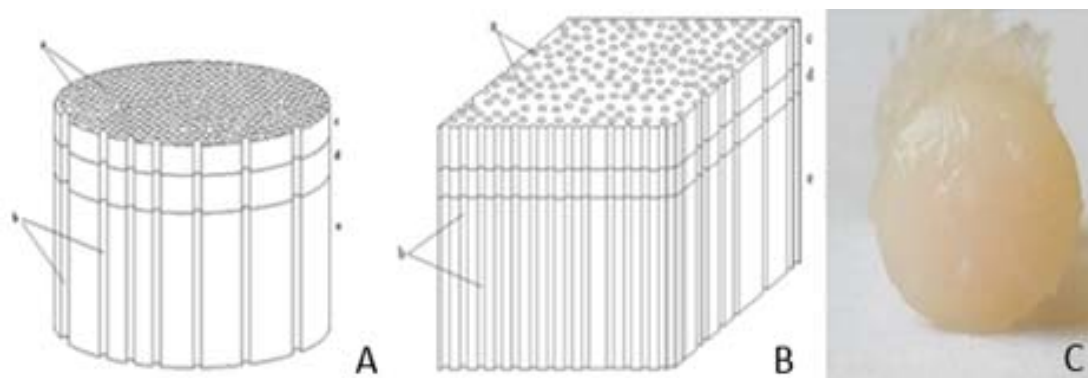


Figura 6. Reprezentarea schematică a grefei osteocondrale demineralizate-decelularizate perforate (GODDP):
A, B (a – orificiile perforate de pe suprafața cartilajului; b – canalele paralele care străbat grea în toată lungimea;
c – cartilajul articular decelularizat; d – osul subcondral demineralizat; e – os spongios demineralizat);
C – greafă osteocondrală de tip cilindru

Sursa: Elaborată de autori

Grefe osteocondrale îmbibate cu celule stem mezenchimale din măduva osoasă, dar și condrocite autologe, au fost transplantate în defecte osteocondrale la iepuri și au demonstrat o integrare perfectă și umplerea defectului. În calitate de martor, am utilizat țesut osteocondral autolog.

O experiență importantă în cadrul căreia sunt abordate tehnicile de inginerie tisulară este obținerea de schele tridimensionale decelularizate care, după recelularizare cu celule autologe, vor fi transplantate recipientului. Aceasta este destinată soluționării deficitului de organe în lipsa donato-

rilor [10]. Un aspect important în obținerea greii hepatice îl reprezintă procesul de recelularizare care necesită o cantitate mare de celule. Din acest considerent a fost propusă o metodă (BI SD MD 1171) care ar permite o mărire a adeziunii hepatocitelor la matricea hepatică decelularizată prin prelucrarea matricii cu soluție de collagen din tendon Ahile de bovină (Figura 7). Lotul martor a servit matricea hepatică decelularizată care nu a fost prelucrată cu collagen. La analiza histologică a ficatului recelularizat se observă aderarea celulelor hepatice la matricea hepatică decelularizată (Figura 8).



Figura 7. Ficat recelularizat pe parcursul a 12 ore

Sursa: Elaborată de autori

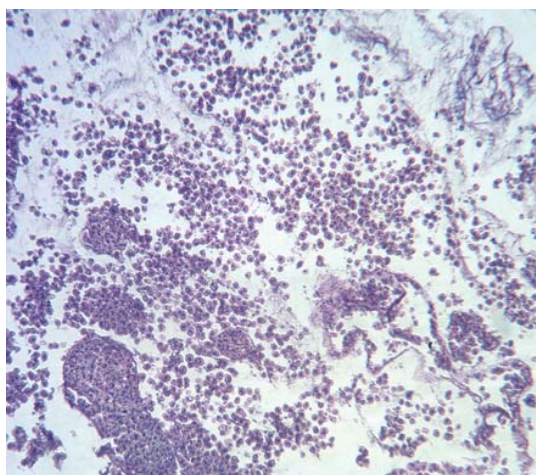


Figura 8. Analiza histologică cu Hematoxină-Eozină a ficatului recelularizat după 12 ore

Sursa: Elaborată de autori

Cantitatea de soluție de collagen injectată este direct proporțională cu masa ficatului. La 10 g de masă umedă de ficat se utilizează 200 ml $\pm$ 40 ml de soluție de collagen, aceasta fiind injectată foarte lent pentru a permite atașarea fibrelor de collagen la matricea hepatică decelularizată, evitându-se formarea conglomeratelor și obturarea vaselor intrahepatice.

Ca urmare a aplicării metodelor și dispozitivelor sus-numite, au fost obținute spongii de collagen din tendon Ahile de bovină care au fost celularizate și transplantate la iepuri și, de asemenea, grefe osteocondrale, care au fost transplantate la nivelul defectelor osoase. Au fost recelularizate matricile hepatice decelularizate și au fost transplantate la șobolani.

Concluzii

Dispozitivele și metodele brevetate pentru utilizare în ingineria tisulară au fost concepute pentru obținerea rezultatelor calitative și veridice și prezintă o serie de avantaje precum sunt:

1. Dispozitivul pentru reticularea spongiei de collagen cu vapori de glutaraldehidă nu permite formarea cristalelor de glutaraldehidă ce se obțin prin contact direct cu proba biologică și care sunt greu de înlăturat.

2. Dispozitivul pentru separarea pastei osoase prezintă eficiență în păstrarea unui volum important de pastă osoasă în timpul tratării acesteia.

3. Metoda de obținere a spongiilor de collagen prezintă siguranță și lejeritate în implementare cu posibilitatea unei liofilizări mai rapide și uniforme a soluției de collagen, obținerea unei forme și a unei dimensiuni dorite de spongie din collagen, dar și păstrarea integrității acestora la detașare.

4. Grefa osteocondrală este una non-imunogenă, cu capacitate de integrare rapidă în țesutul gazdă, dar și de suplinire cu țesut cartilaginios.

5. Metoda de mărire a adeziunii matricii hepatice decelularizate conduce la ameliorarea și majorarea vitezei procesului de recelularizare a ficatului prin sporirea adeziunii matricii extracelulare hepatice.

REFERINȚE

- 1) FENGXUAN, Han, JIAYUAN, Wang, LUGU-ANG, Ding et al. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Achievements, Future, and Sustainability in Asia*. Front. Bioeng. Biotechnol., 24 March 2020 | <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00083>.
- 2) <https://bme.duke.edu/research/tissue-engineering-regenerative-medicine>.
- 3) <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>.
- 4) DZOBO, Kevin , SHIRLEY, Keolebogile, MOTAUNG, Caroline M. , ADESIDA, Adetola . *Recent Trends in Decellularized Extracellular Matrix Bioinks for 3D Printing: An Updated Review*. Int J Mol Sci. 2019 Sep 18;20(18):4628. doi: 10.3390/ijms20184628.
- 5) CHANDRA, Prafulla K., SOKER, Shay, ATALA, Anthony. *Chapter 1 - Tissue engineering: current status and future perspectives*. Principles of Tissue Engineering (Fifth Edition). 2020, P. 1-35.
- 6) ZHIGU, Wu, ZHIYONG, Sheng, TONGZHU, Sun, MIAO, Geng, JUNYOU, Li, YONGMING, Yao, ZUXIU, Huang. *Preparation of collagen-based*

materials for wound dressing. Chinese Medical Journal 2003; 116(3): 419-423.

7) NAROTZKY, Emma, JEROME, Maria E., HORNER, John R., RASHID, Dana J. *An Ion-exchange Bone Demineralization Method for Improved Time, Expense, and Tissue Preservation*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 2020, Vol. 68(9) 607–620.

8) JONG-EUN, Lee, JONG-CHUL, Park, YU-SHIK, Hwang, JEONG KOO, Kim, JOONG-GON, Kim, HWAL, Suh. *Characterization of UV-irradiated Dense/porous Collagen Membranes: Morphology Degradation and Mechanical Properties*. 2001, Yonsei Medical Journal, vol. 42, No 2, p. 172-179.

9) COBZAC, Vitalie, VEREȘTIUC, Liliana, JIAN, Mariana, NACU, Viorel. *Tissue engineered grafts in articular cartilage defects treatment*. Abstract

book MedEspera 2018. P.500.

10) JIAN, Mariana, COBZAC, Vitalie, MOGHILDEA, Ivan, POPESCU, Victor, NACU, Viorel. *Techniques of liver decellularization*. The Moldovan Medical Journal. Vol.6 nr.4, 2018. p. 21-24.

11) ERGGELET, C., VAVKENA, P. *Microfracture for the treatment of cartilage defects in the knee joint – A golden standard?* J Clin Orthop Trauma., 2016; 7 (3): 145–152. DOI: 10.1016/j.jcot.2016.06.015.

12) COBZAC, V., VEREȘTIUC, L., JIAN, M., NACU, V. *Assessment of ionic and anionic surfactants effect on demineralized osteochondral tissue*. IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 2019; 572 012084 DOI:10.1088/1757-899X/572/1/012084.