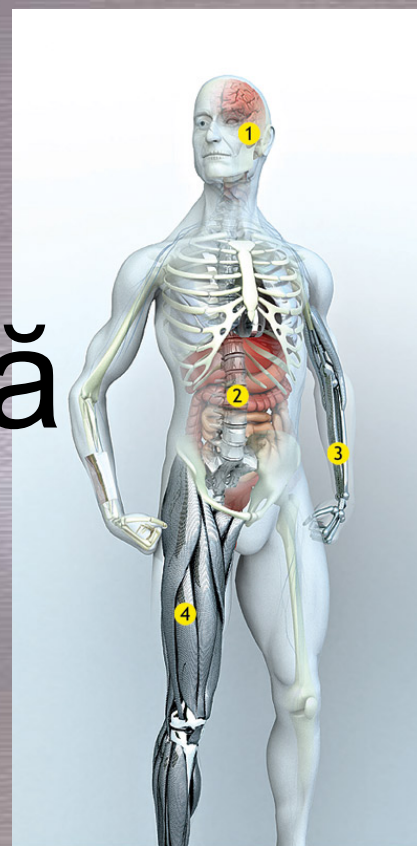


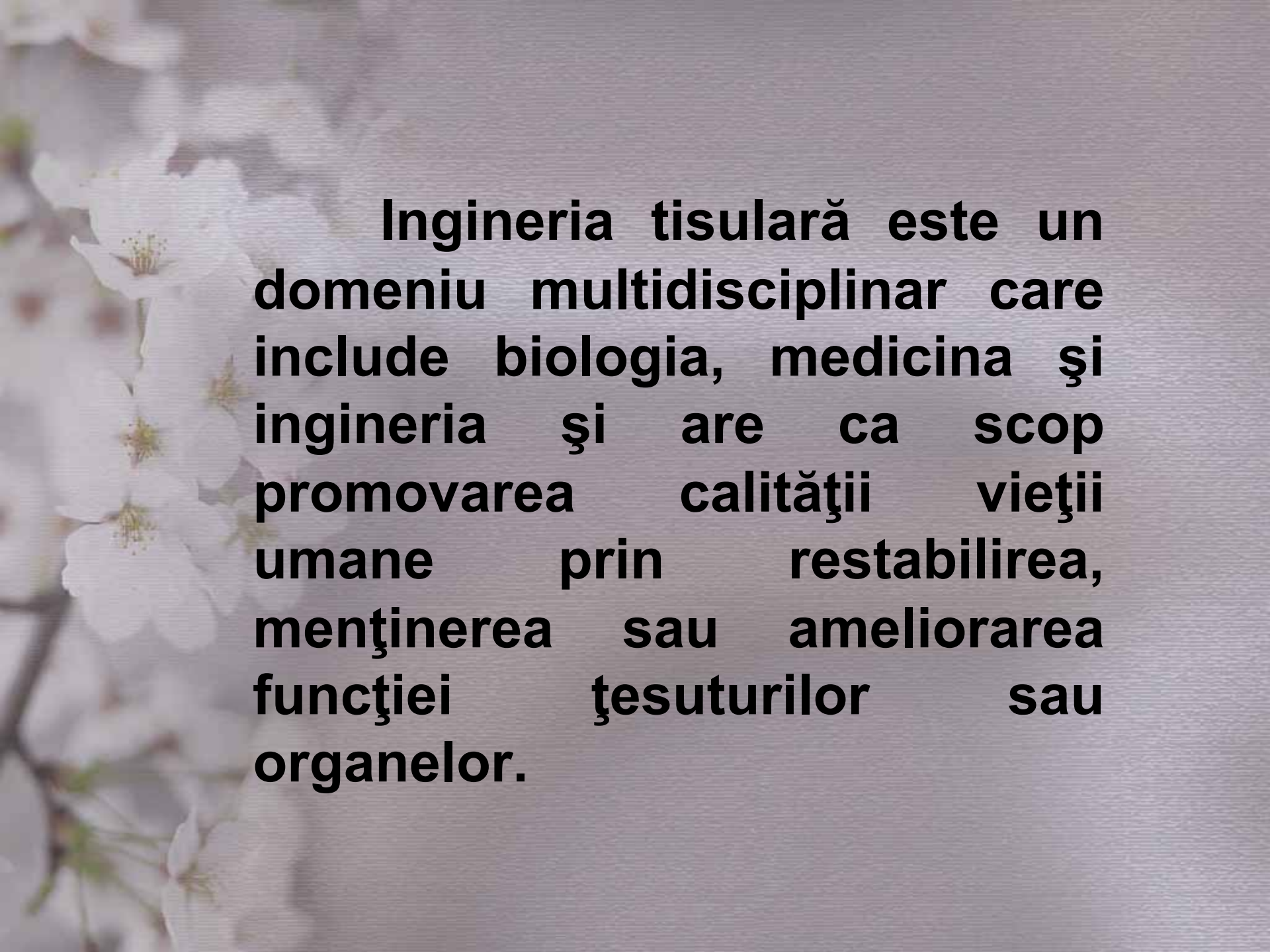
Ingineria tisulară

Dr.hab.în șt. med.
profesor universitar
Viorel Nacu

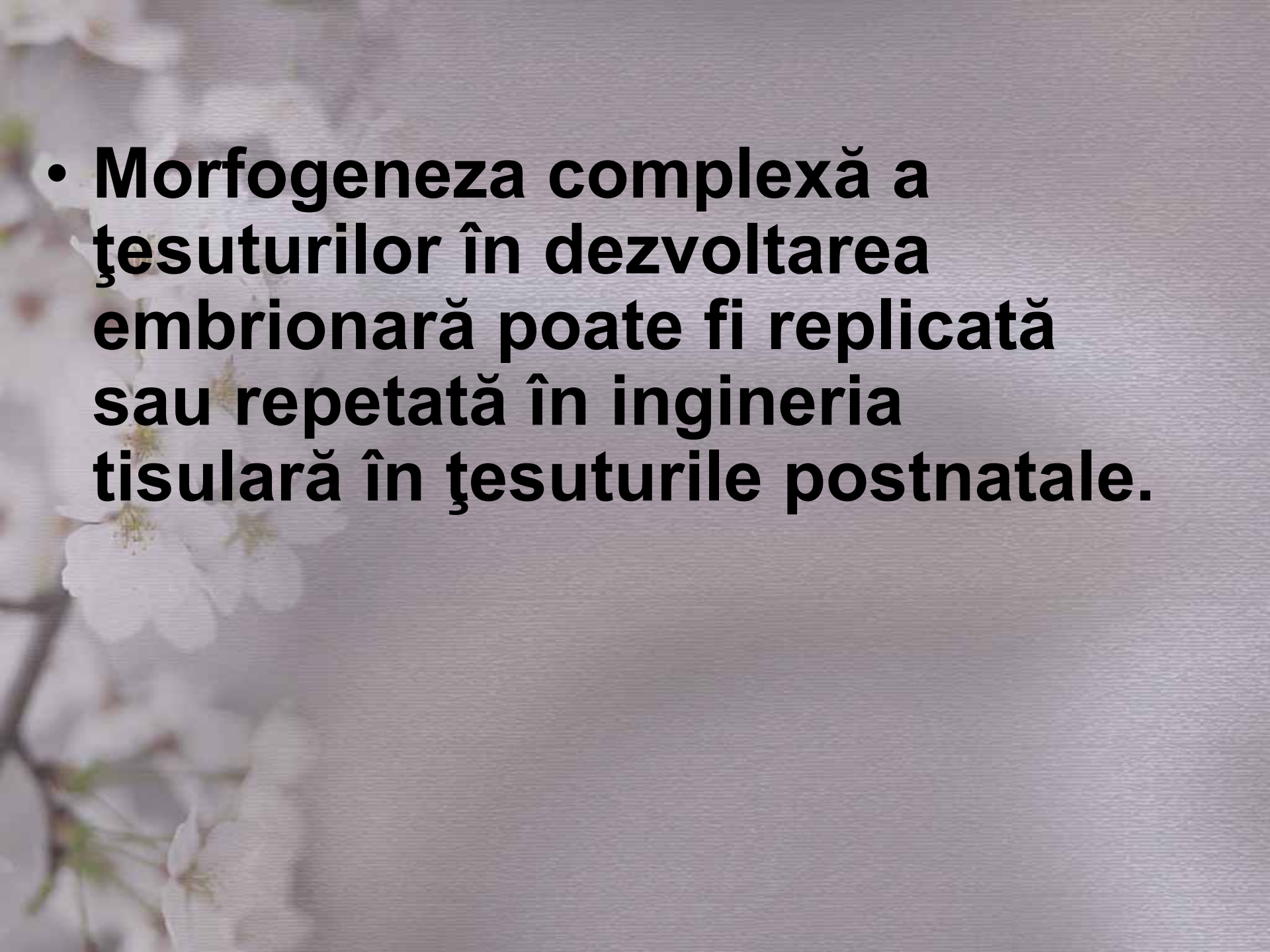


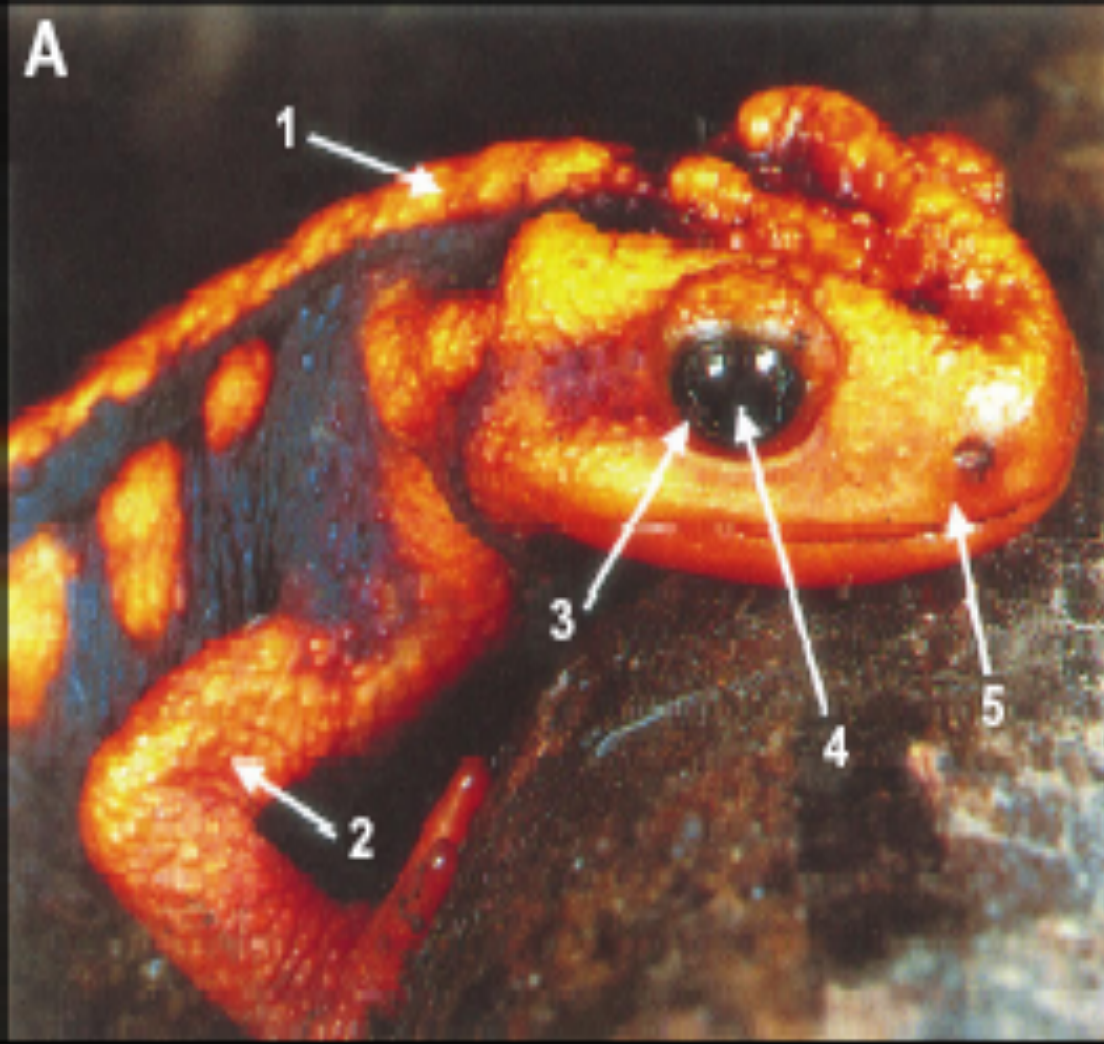
“ Nu îndrăznim pentru că
lucrurile sunt dificile, ci
pentru că nu îndrăznim
lucrurile sunt dificile”

Seneca



Ingineria tisulară este un domeniu multidisciplinar care include biologia, medicina și ingineria și are ca scop promovarea calității vieții umane prin restabilirea, menținerea sau ameliorarea funcției țesuturilor sau organelor.

- 
- **Morfogeneza complexă a țesuturilor în dezvoltarea embrionară poate fi replicată sau repetată în ingineria tisulară în țesuturile postnatale.**



Regenerarea la amfibii: triton

Ingineria tisulară

- **Aplicație terapeutică** - țesutul crește în corpul pacientului sau în afara lui și ulterior este transplantaat.
- **Aplicație diagnostică** - țesutul este crescut *in vitro* și este utilizat pentru testarea metabolismului în prezența unor substanțe medicamentoase, toxicitatea și patogenitatea lor.



Scopul Ingineriei tisulare:

Restabilirea funcției prin distribuirea elementelor vii care devin integrate în corpul pacientului.

Joseph P. Vacanti 1999

Istoricul Ingineriei tisulare:

- 1980 Yannas: Collagen--GAG matrice pentru regenerarea pielii “**pielea artificială**”;
- 1984 Wolter/Meyer: prima dată a utilizat termenul , Inginerie tisulară;
- 1991 Cima/Vacanti/Langer: Chondroците pe o pe o spongie de PGA; ureche pe un șoarece nud;
- 1993 Langer/Vacanti: Celule in matrice pentru formare tesutului *in vitro*; PGA
- 1994 Brittberg/Peterson: implantarea chondroцитelor autologice umane; **Carticel**



Ingineria tisulară necesită colaborare interdisciplinară

- **Inginerie**
- **Chimia**
- **Biologie celulară**
- **Proteomica**
- **Clinicienii,**
- **Știința materialelor**
- **Fizica**
- **Imagistica**
- **Genomica**

Elementele de baza in Ingineria tisulara:

1) **Biomaterialele:** materiale noi, neviabile care sunt prevăzute pentru organizarea creșterii și diferențierii celulelor în procesul de formarea a unui țesut funcțional (Matrige, spongii - Sintetice sau naturale).

2) **Celulele:** Sursa, Diferențierea, Purificarea Metode, protocoale, care trebuie să asigure numărul necesar de celule, și diferențierea lor în dependență de țesutul lezat (celule autologice, alogene, xenogene, celule obținute prin inginerie și prin manipulare imunologică).

3) **Biomoleculele:** includ factori de creștere sau gene, factori de diferențiere și proteine morfogenetice.

4) **Design Ingineresc:** includ expansia celulelor pe structuri 2-D, creșterea țesuturilor 3-D, bioreactore, stocarea celulelor și țesuturilor și distribuirea lor.

5) **Biomecanica:** proprietățile țesuturilor native; identificarea unor proprietăți minime necesare țesutului ingineresc, presiunea mecanica care influențează țesuturile ingineriei tisulare, eficacitatea și siguranța acestor țesuturi.


6) **Informatizarea** pentru analiza expresiei genice, expresiei proteinelor.

Analiza interacțiunilor între celule și țesuturi, modelarea tisulară și celulară, fabricarea digitală a țesuturilor; sisteme automatizate producere și de asigurare a calității, interfețelor.

- **Biomaterial** - material neviabil utilizat pentru interacțiune cu un sistem biologic în scopuri medicale.
- **Bioactivitatea** - reprezintă acțiunea pe care o exercită asupra activității celulei (respirație, metabolism, diferențiere, proliferație) atât materialul, cât și produsele care apar la biodegradarea lui în organism.
- Materialul sub acest aspect poate fi **bioinert** (care are o acțiune minimă asupra celulelor (nu există materiale absolut bioinerte)) până la **bio- sau citotoxic**.
- Bioactivitatea materialului depinde de componența chimică, viteza de degradare, produsele care apar la degradare.
- Adaptarea celulei la mediul înconjurător este determinată de parametri fiziologici (homeostaza internă): temperatură, pO₂, pH, concentrația K și Na.

Biocompatibilitate

- Este o particularitate a biomaterialului care reflectă posibilitatea coexistenței lui cu biosistemul (organismul viu) prin păstrarea funcțiilor normale ale țesuturilor și posibilității de regenerare. (aprecierea biocompatibilității poate fi efectuată numai în experimente *in vivo*).

- 
- **Biorezistență** – este capacitatea biomaterialului de a rezista pentru o perioadă anumită de timp la contactul și acțiunea țesuturilor adiacente exprimata prin menținerea proprietăților sale fizice, chimice și mecanice.

- ***Citochinele*** - Un grup de proteine și peptide care sunt utilizate în organism în calitate de componente semnal (similare hormonilor) care facilitează comunicarea între celule și reprezintă multiple proteine și glicoproteine de dimensiuni mici, cu masa de 8-30 kDa.

Citochinele utilizate în clinică

- **Interferon α** (“Roferon”, “Alferon-N”, “Intron A”) – terapie antivirală (chronic Hepatitis B and C), leucemiile.
- **Interferoni β** (“Betaseron”) – scleroza multiplă
- **G-CSF** (“Neupogen”) – tratament de suport în transplantarea măduvei osoase.
- **Interferon γ** (“Actimunne”) – granulomatoza cronică.
- **Epo** (“Procite”) – maladii renale.
- **GM-CSF, IFN- γ , IL2, TNF** – au acțiune toxică când sunt aplicate sistematic.

Problemele inginerii tisulare:

- Trebuie țesutul pentru implantare să fie produs *in vitro* sau *in vivo*?
- Ce tramă (suport) trebuie utilizat?
- Din care material trebuie să fie produs, caracteristicile porilor, capacitatea de resorbție, proprietățile mecanice?
- Cum să fie produs?
- Ce tip de celule trebuie să fie utilizate?
- Sursa de celule?
- Expandarea până la numărul necesar fără să-și schimbe fenotipul?
- Ce substanțe regulatorii sunt necesare pentru stimularea proliferării celulare și sinteza matricei pentru facilitarea diferențierii celulelor stem?

Regenerarea

- ***In Vitro***
- Se produce țesutul definitivat *in vitro* prin plasarea celulelor într-o matrice și apoi se implantează țesutul în corpul recipientului.

In Vivo

Se implantează *in vivo* biomatricea cu sau fără celule în corpul uman pentru a facilita regenerarea țesutului *in vivo*.

Ingineria medicală a țesuturilor

Creșterea grefelor *in Vitro*

- **Avantaje**
- Evaluarea țesuturilor până la implantare
- **Dezavantaje**
- Pentru incorporare țesutul trebuie să fie remodelat, fiindcă încă nu este posibilă arhitectura de stres *in vitro*.

Creșterea grefelor *In Vivo*

Avantaje


Incorporarea și formarea sub acțiunea factorilor reglatori intracorporali incluzând și acțiunea mecanică.

Dezavantaje

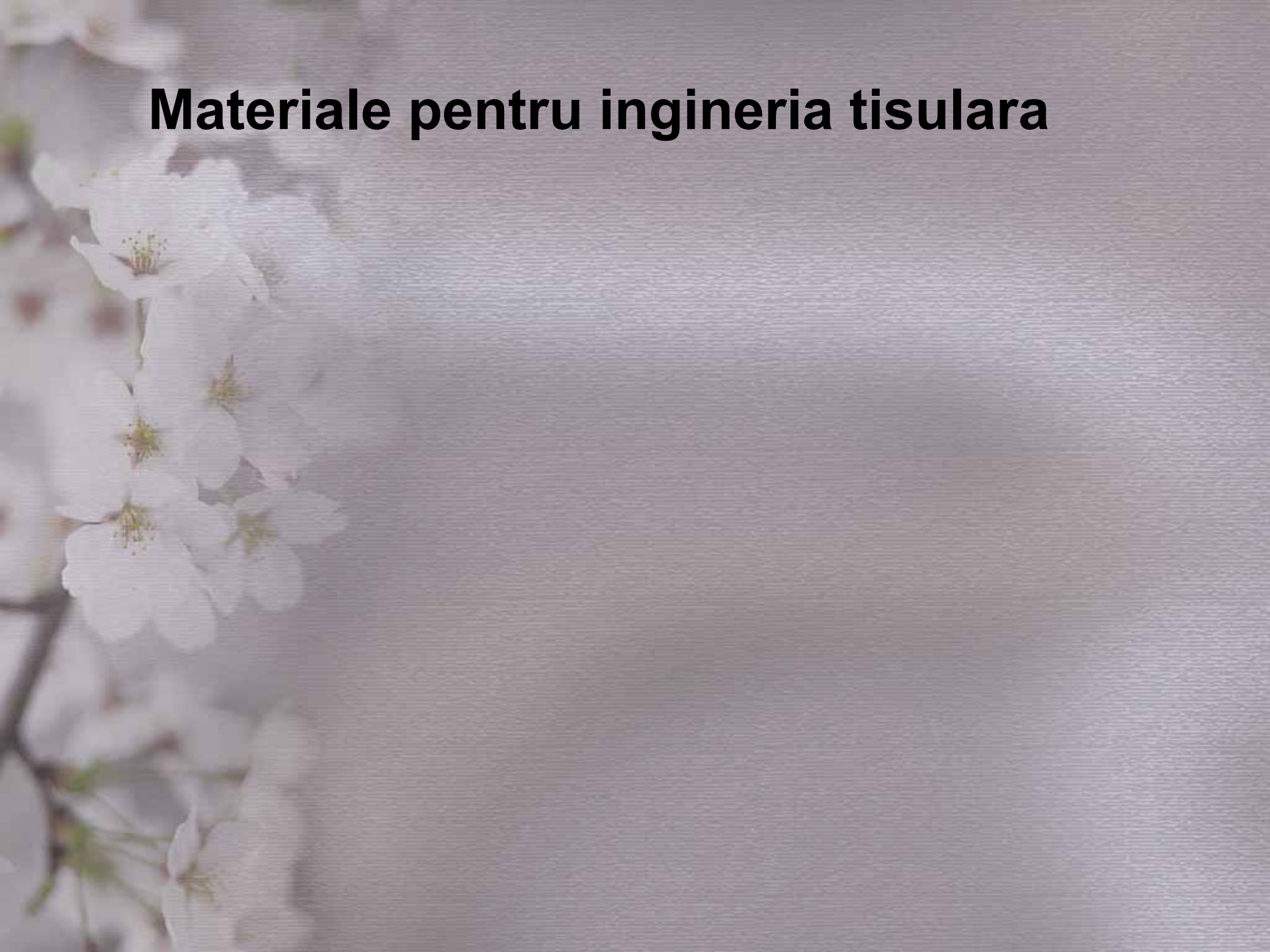
Deplasarea și degradarea sub acțiunea stresului mecanic *in vivo*.

Factorii care pot dezavantaja regenerarea

- **Invazie vasculară limitată în defecte mari.** (osul nu regenerează în mijlocul defectului de dimensiuni mari)
- **Intercalarea țesuturilor adiacente în defect** (defectele periodontale)
- **Exces de presiune mecanică în regenerat.** (fracturi instabile)

- 
- **Mitoza inadecvată necesită celule din exterior.**
 - **Migrare inadecvată necesită utilizarea unei trame, matrice.**
 - **Biosintează inadecvată necesită anumite gene sau factori de creștere.**

Materiale pentru ingineria tisulara



Materiale

Polimeri sintetici

- Polyglycolic acid (PGA)
 - Highly crystalline, hydrophilic, byproduct is glycolic acid
- Polylactic acid (PLA)
 - Hydrophobic, lower melting temperature, byproduct is lactic acid
- Polydioxanone (PDO)
 - Highly crystalline
- Polycaprolactone (PCL)
 - Semi-crystalline properties, easily co-polymerized, byproduct caproic acid
- Blends
 - PGA-PLA
 - PGA-PCL
 - PLA-PCL
 - PDO-PCL

Polimeri naturali

- Elastin
- Gelatin collagen
- Fibrillar collagen
- Collagen blends
- Fibrinogen
- **Chitosan**
- **Extracellular matrix**
- **Hyaluronic acid (glycosaminoglycans)**

Utilizzare

- Synthetic polymers
 - ❖ PGA, PLA and PLGA most commonly used
 - ❖ PDO most similar to Elastin collagen blend (limited by shape memory)
 - ❖ PCL most elastic and mixed frequently with other materials
 - ❖ Provide nanoscale physical features
- Natural polymers
 - ❖ Collagen Type I & III + PDO: best possible match for blood vessels

Ingineria tisulară

Celule:
Differentiate
Stem adulte
Embrionare

Celule

Songii

Ingineria
tisulară

Biorectoa
re

Semnale

Hidrogel
Songii nanostructurate
Songii autoasamblate
Songii fabricate din materiale
solide

Plasarea dinamica a celulelor
Creșterea masei transferabile
Stimuli mecanici

Molecule mici
Factori de creștere, polipeptide
Acizi Nucleici (ADN, ARN,
oligonucleotide)

Configurare 3D: Materials

- Pentru ca un material să regenereze un material destinat țesuturilor trebuie să:
 - Stimuleze;
 - creșterea celulelor/differentierea
 - atașarea celulelor,
 - depozitarea matricei extracelulare,
 - Ca un template pentru creșterea țesuturilor in 3D
 - pentru implantare, să fie resorbabile
 - Pentru producerea medicamentelor să fie insolubile

REZULTATE

Procesul de decelularizare a ficatului cu obtinerea biomatricei hepatice

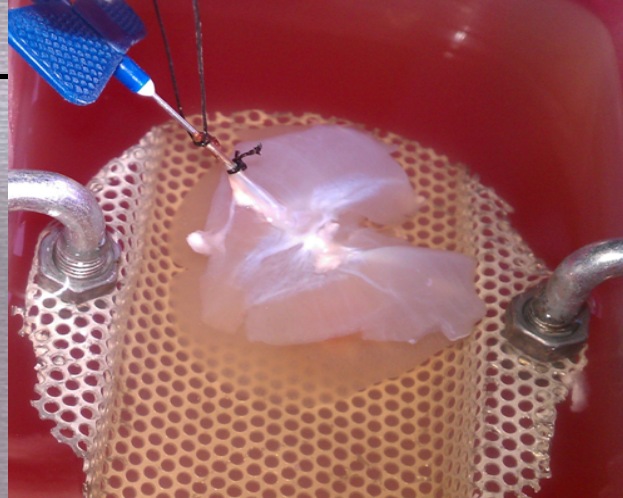
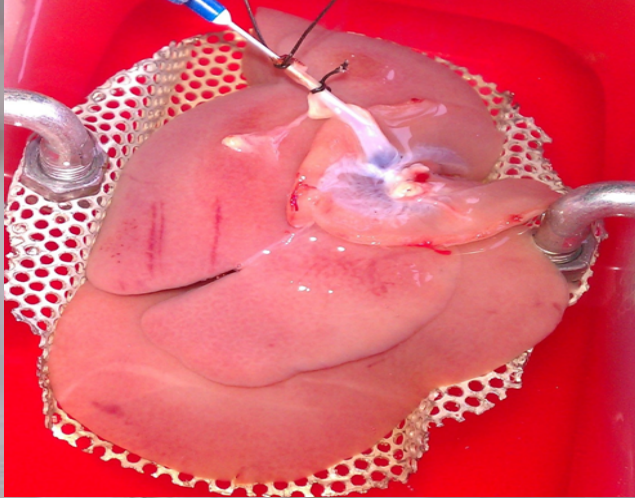


Fig.1 Decelularizarea ficatului cu SDS 0,25%

Fig.2 Decelularizarea ficatului cu SDS 0,5%

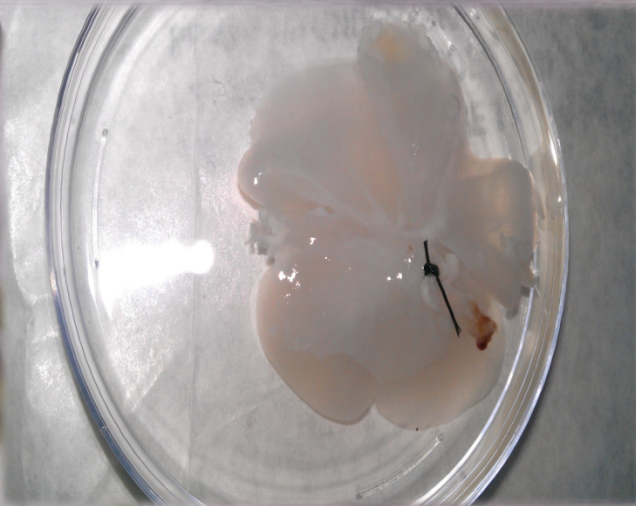


Fig.3 Matrice hepatica extracelulara

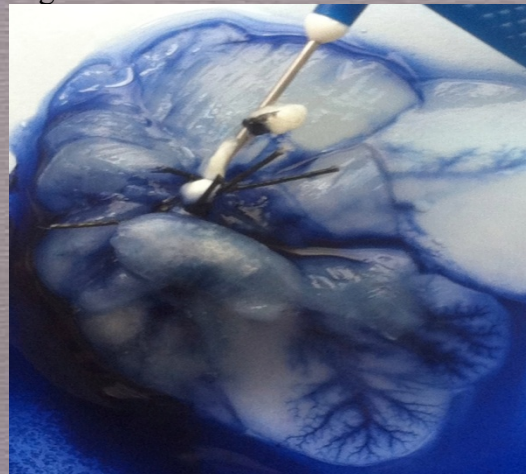
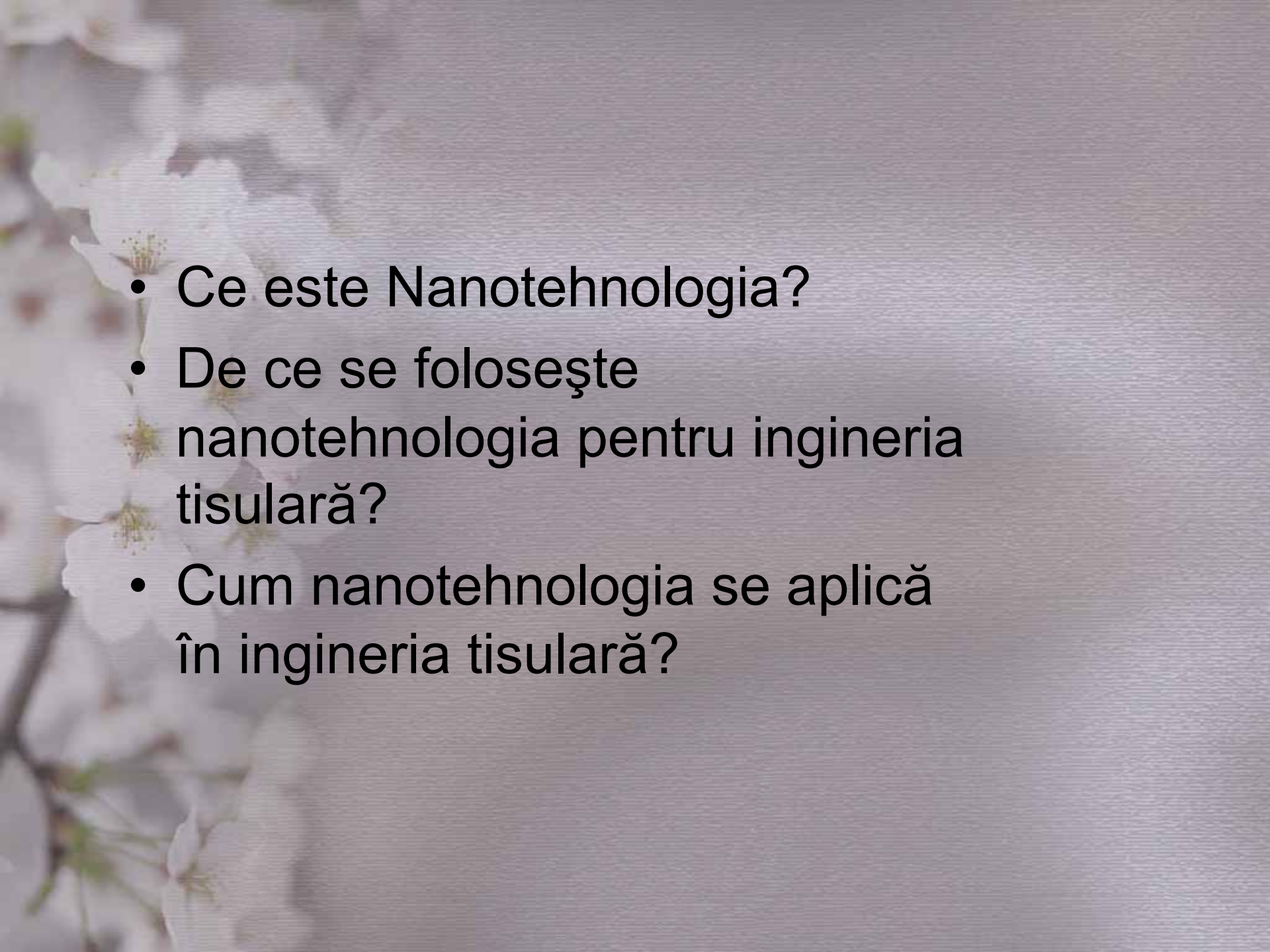


Fig. 4 Contrast cu tripan blue

- 
- Ce este Nanotehnologia?
 - De ce se folosește nanotehnologia pentru ingineria tisulară?
 - Cum nanotehnologia se aplică în ingineria tisulară?



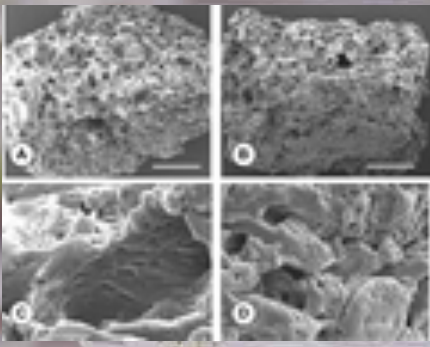
Sinteza biomaterialellor

Nanofibre:

- Obține matrice cu proprietăți similare matricei extracelulare naturale (țesutului natural), cu aceleași dimensiuni ale porilor, structură chimică și aceste hidrogel matrix a arătat bună compatibilitate și toxicitate redusă.

Tehnologii textile

- Această tehnică include toate metodologiile care au fost cu succes adoptate pentru prepararea unor plase neîmpletite din diferiți polimeri.
- Neajunsul este dificultatea de a obține o structură poroasă și o dimensiune constantă a porilor.



Utilizarea de solvenți și particule solubile

Solvent Casting & Particulate Leaching (SCPL):

- Aceste tehnologii permit producerea de structuri poroase, dar de grosime mică.
- 1. se dizolvă acid polylactic în dichloromethane și se amestică cu sodium chloride, crystals of saccharose, gelatin spheres or paraffin spheres.
- 2- se plasează într-o soluție care dizolvă aceste particule, astfel obținând un suport poros.



Utilizarea gazului.

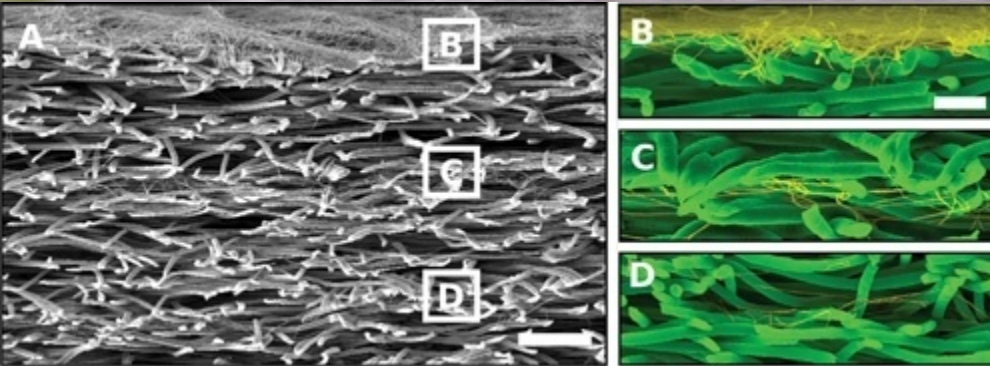
- Pentru obținerea porilor se utilizează gaz.
- Piesa este plasată într-o cameră cu presiune înaltă de CO₂ gradua presiune este scăzută până la cea normală. Porii se formează la isirea moleculelor de CO₂, dar încălzirea și presiunea nu permite utilizarea unor materiale sensibile la temperaturi mai mari, și porii nu au o legătură între ei.



Liofilizarea

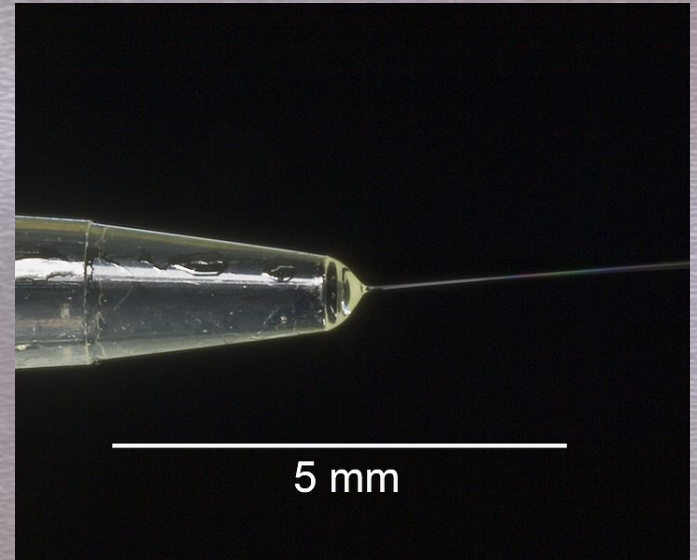
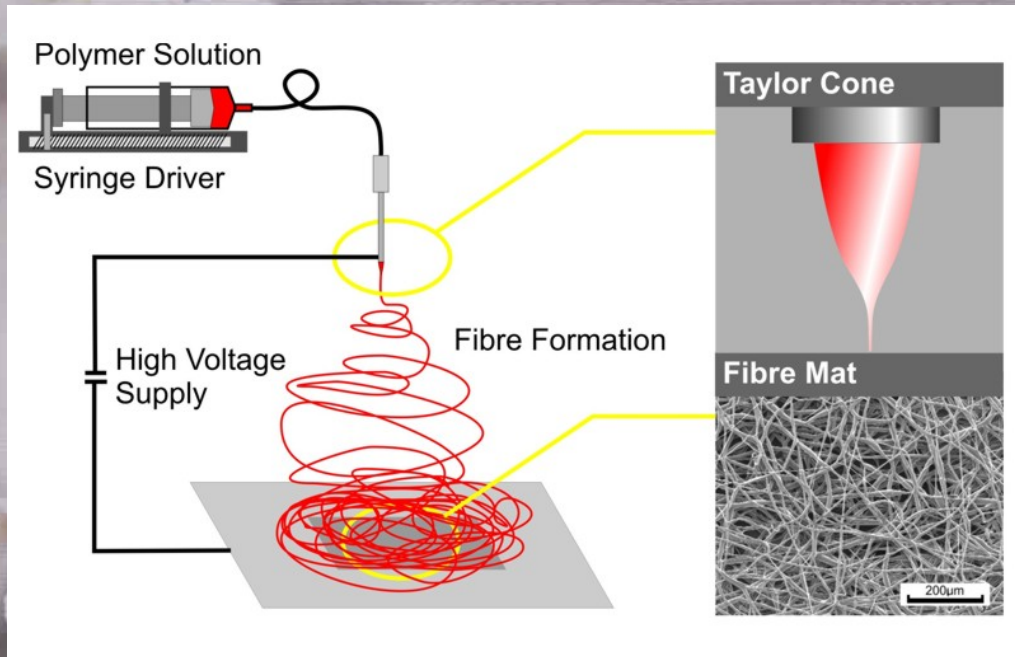
- Este dizolvat polimerul apoi soluția este amestecată cu apă, după care se aplică într-o formă și este rapid uscată în azot lichid după care este plasată în vacuum în care se evaporă apa și solventul. (porii sunt de diferite dimensiuni și destul de mici).
-

Electrospinningul:



- Sub acțiunea curentului electric de tensiune înaltă se pot obține microfibre, inclusiv nanofibre, este o tehnică relativ simplă de obținere a diferite tipuri de spongii.

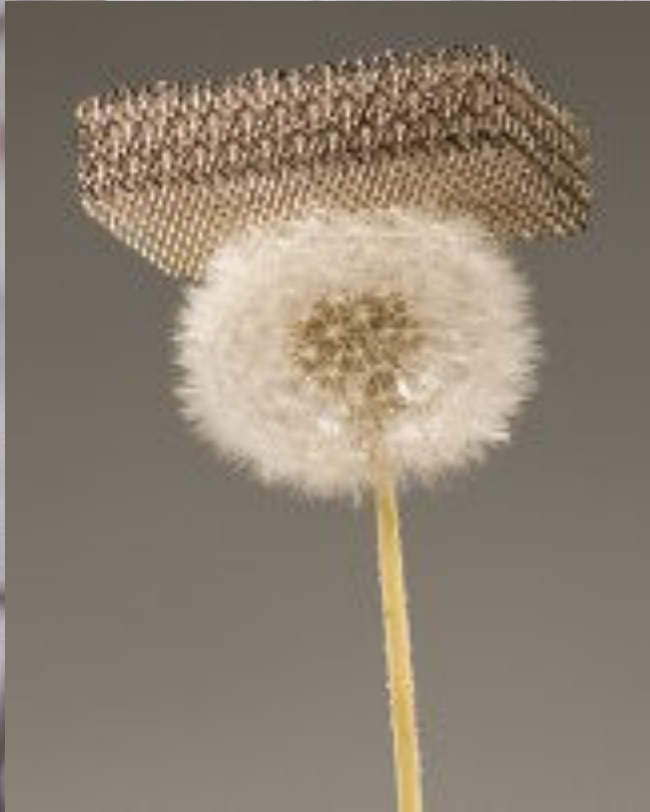
Electrospinning



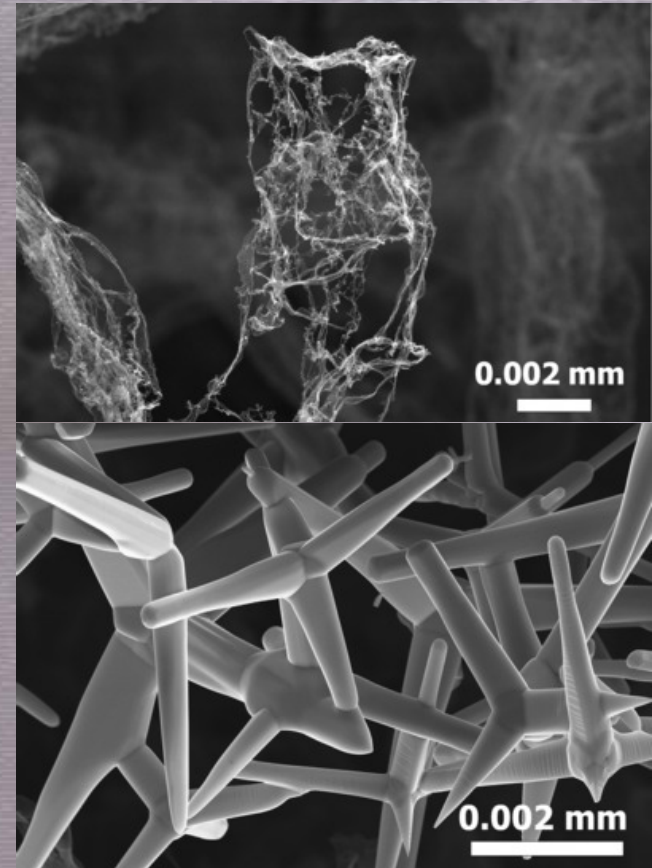
- This process involves the ejection of a charged polymer fluid onto an oppositely charged surface.
- Multiple polymers can be combined
- Control over fiber diameter and scaffold architecture

World's Lightest Material Unveiled, Metal Is 99.9% Air

A team of researchers from UC Irvine, HRL Laboratories and the California Institute of Technology have developed the world's lightest material – with a density of 0.9 mg/cc – about one hundred times lighter than Styrofoam™. Their findings appear in the Nov. 18 issue of Science.



Aerographite - a conductor as light as air



The tetrapods of the zinc oxide form an ideal basis for the robust material Aerographite.

<http://www.electroline.com.au/articles/55944-Aerographite-a-conductor-as-light-as-air>



- Pentru a regenera un țesut materialul trebuie să:
- Stimuleze;
- Creșterea celulelor, diferențierea
- Atașamentul celulelor,
- depunerea matricei extracelulare,
- să fie ca un template pentru creșterea 3D a celulelor,
- Bune pentru implantare,
- Să fie resorbabile,
- pentru farmacie să fie insolubile,



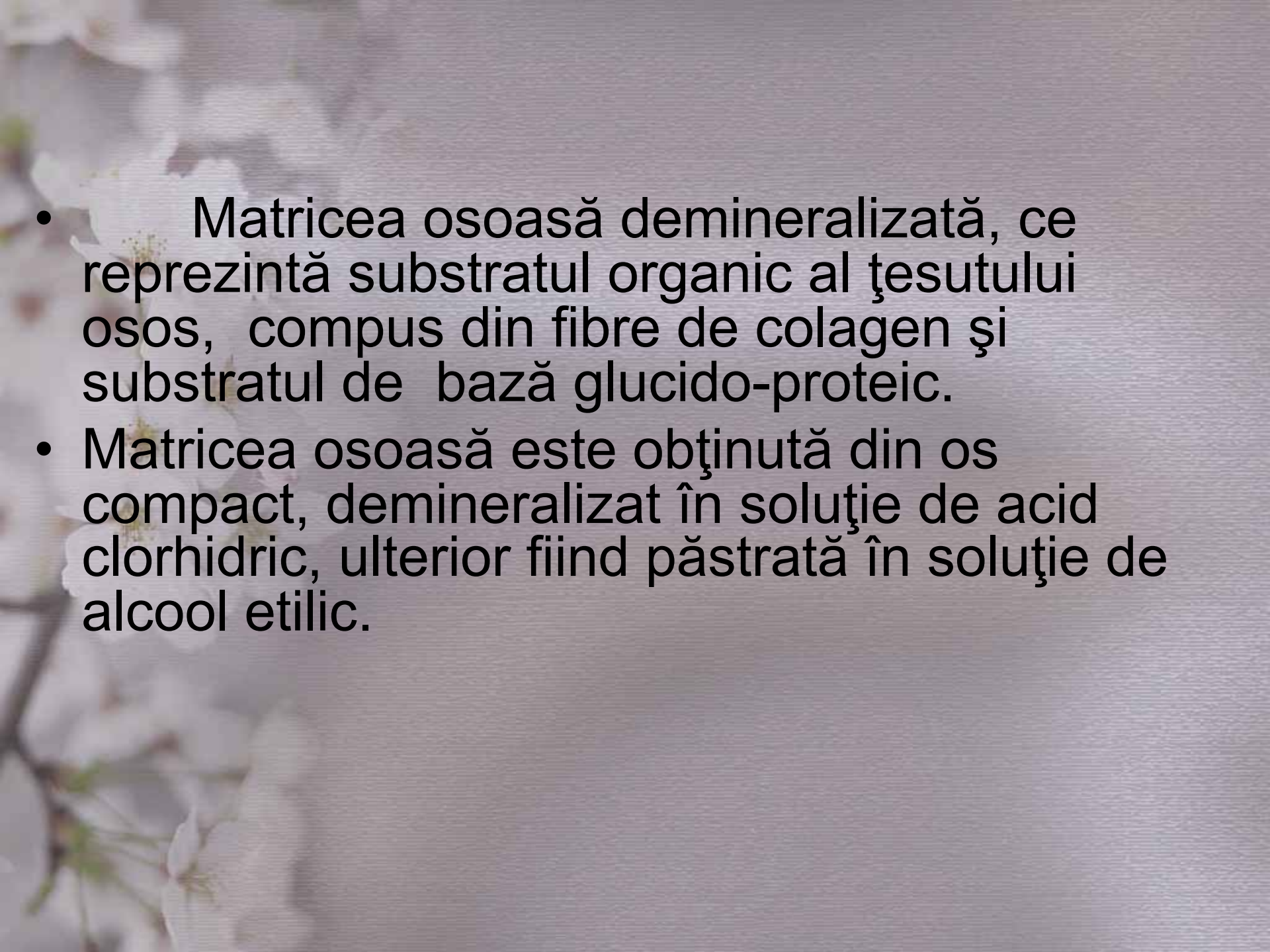
Design și manufactură asistat computerizat

- Materialul tridimensional este produs virtual in CAD după care spongia este obținută prin utilizarea unei imprimante cu praf de polimer.



Tehnologii de printare

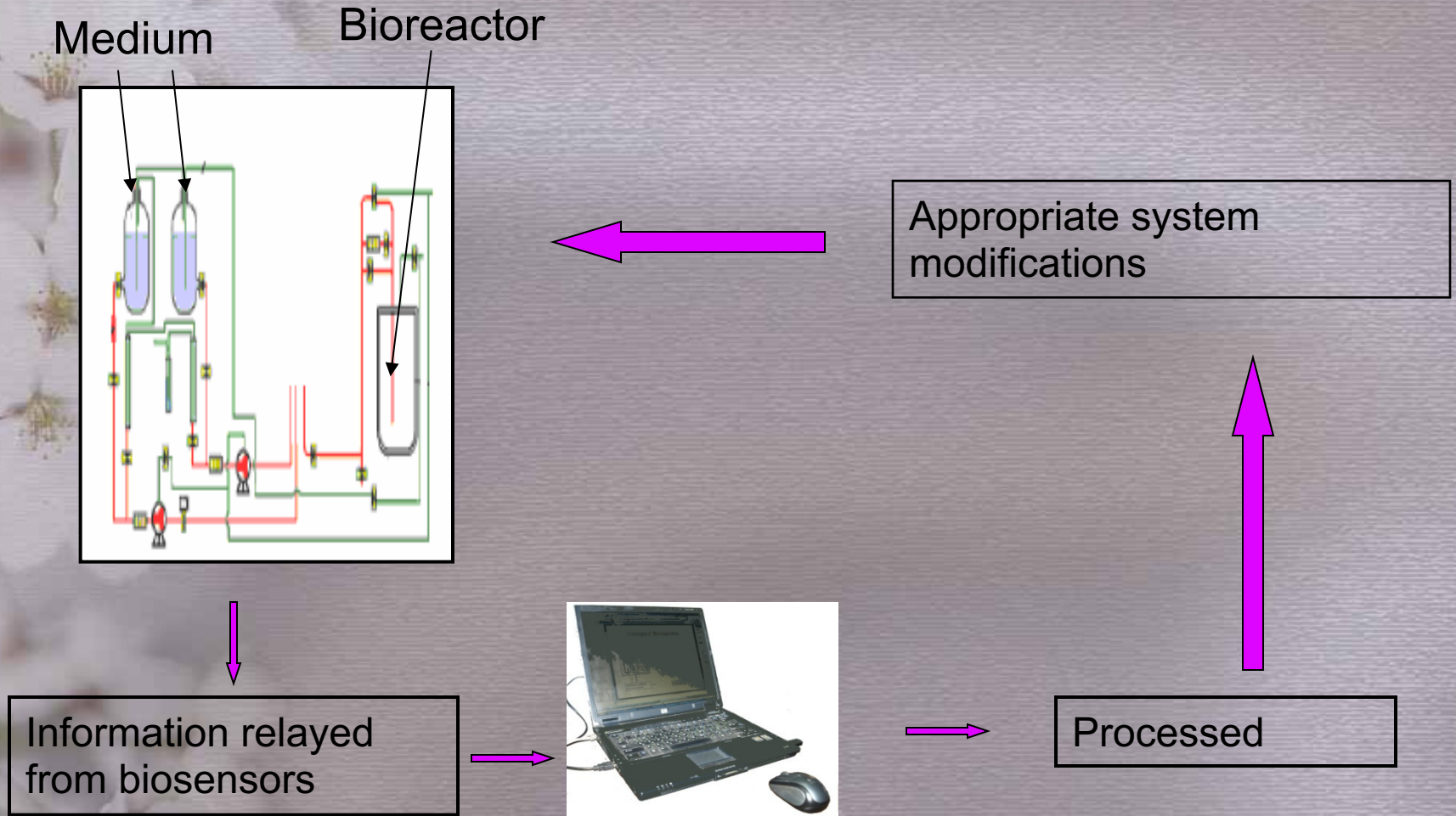
- Nanoimprinting Lithography
- Organ Printing
- Contact Printing

- 
- Matricea osoasă demineralizată, ce reprezintă substratul organic al țesutului osos, compus din fibre de colagen și substratul de bază glucido-proteic.
 - Matricea osoasă este obținută din os compact, demineralizat în soluție de acid clorhidric, ulterior fiind păstrată în soluție de alcool etilic.

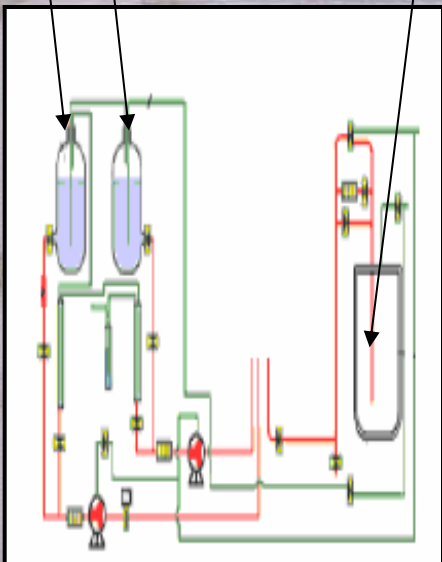
Bioreactoare

- Stem cells can be grown in 'beads'
- Differentiation can occur within beads cultured in defined medium e.g. to bone
- Scalable production of stem cells can be achieved in 3D culture

'Intelligent' Bioreactors



Medium Bioreactor



Appropriate system modifications

Information relayed from biosensors

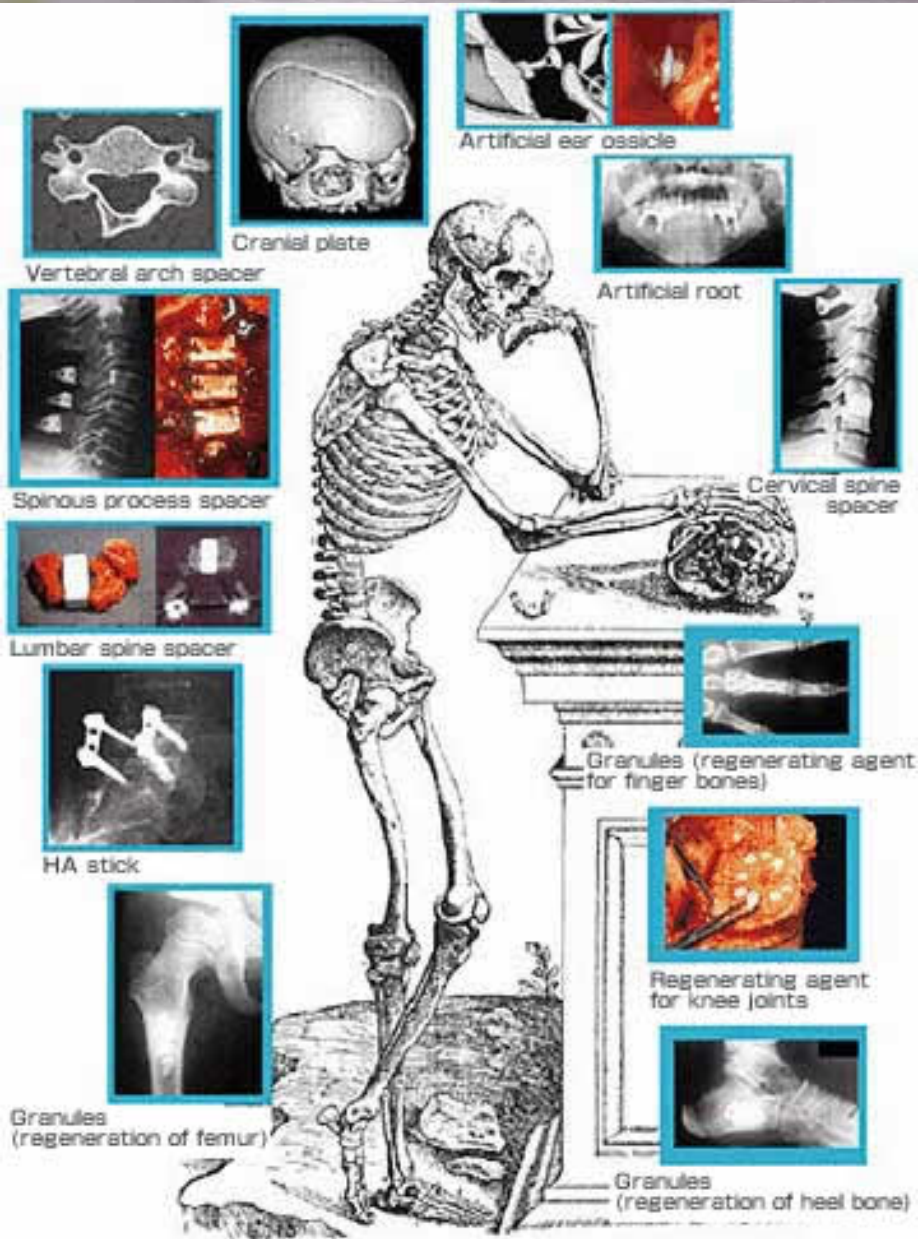


Processed

Avantajele Bioreactorului

- **Metodă universală**
- **Echipament automatizat**
- **Reducerea timpului de creștere de la (45 la 15 zile)**
- **Roadă crescută (+500%) pentru producție industrială**

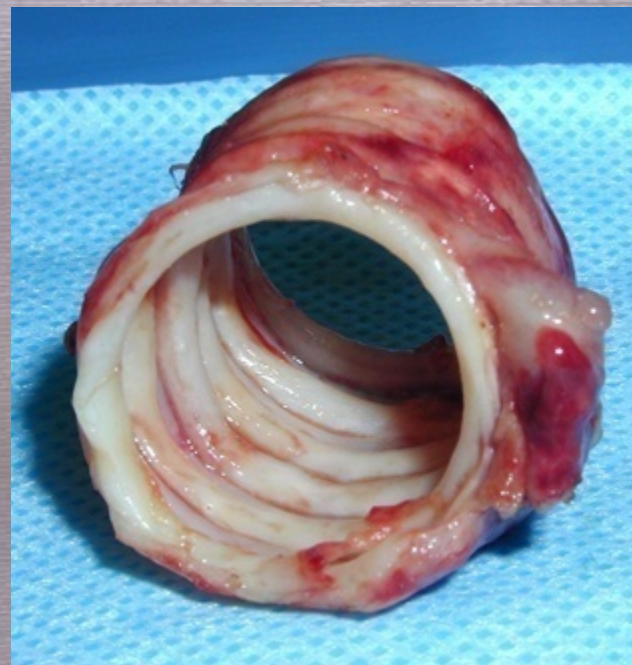
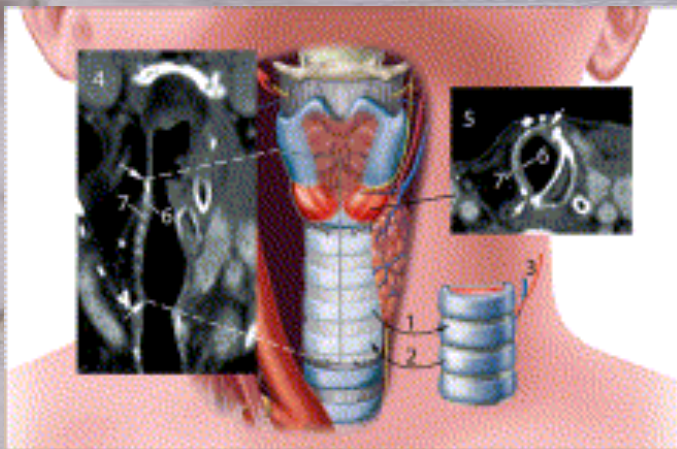
Os artificial



**Piele artificială
constituită din celule cutanate umane incluse în
colagen**



Trahee obținută prin inginerie tisulară



Doris Taylor's Cord decelularizat

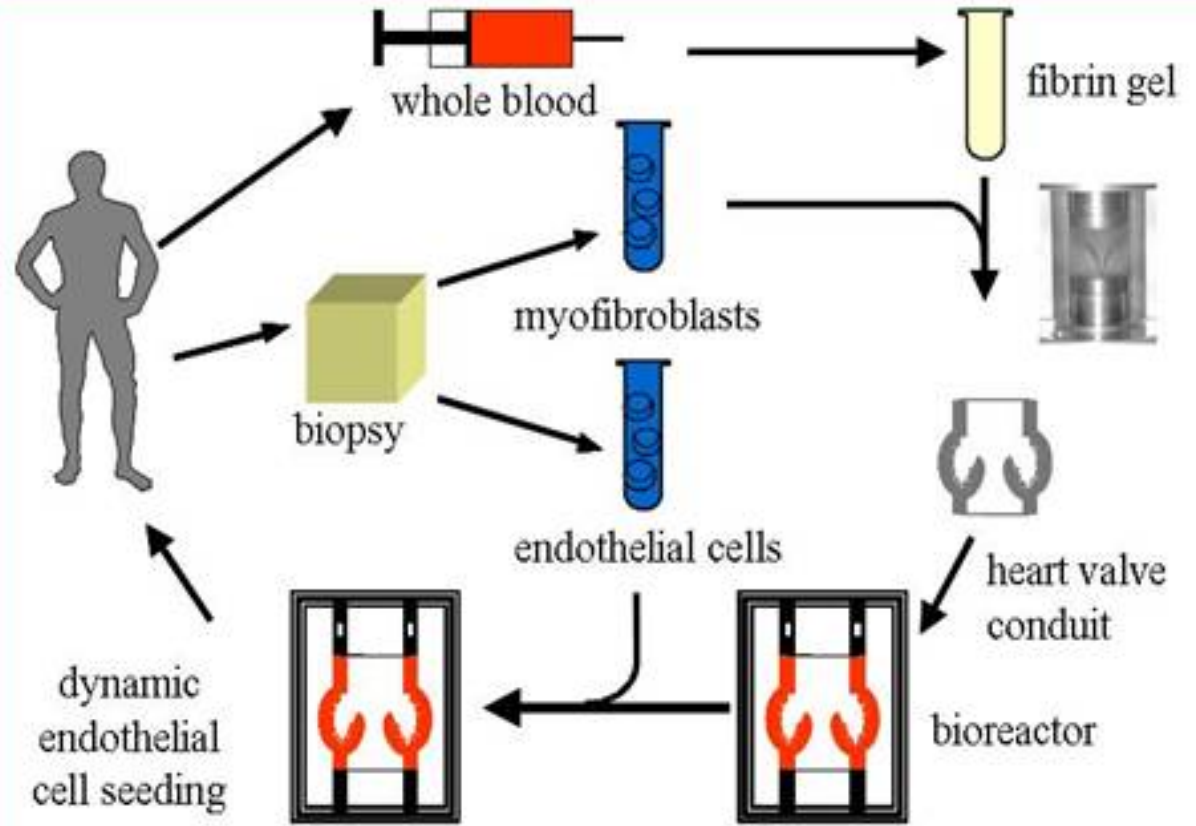


Valve cardiaque

(Tissue engineered autologous heartvalves and vessels - workgroup of r.med.S.Jockenhoevel at the Department of Applied Medical Engineering (RWTH-Aachen University, Germany))

The allografts in cardio surgery are used from body. By our colleges from the "Center preparation of the allogeneous cardiac v

They utilized decellularised allograft - valves of heart as a graft of the valve of the Imor

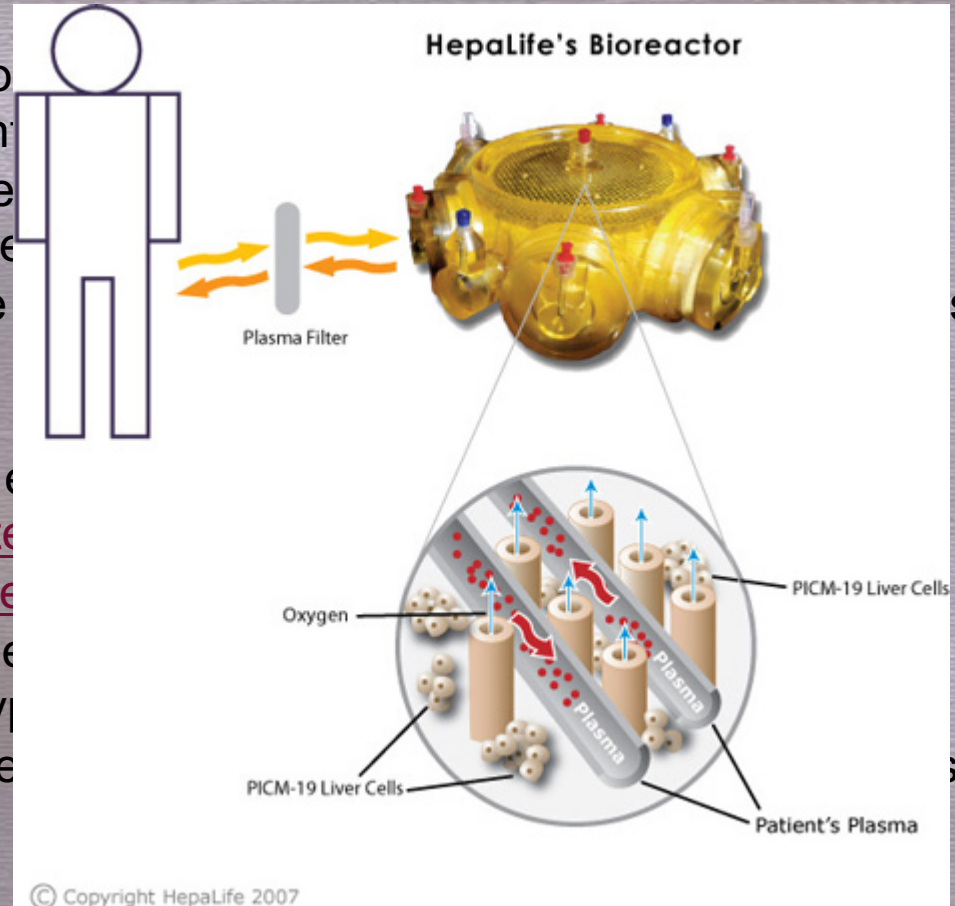


Ficat artificială care utilizează hepatocite vii.

The purpose of a permanent supportive regenerative bridge is to bridge the gap as long as possible.

Function

BALs are composed of hepatocytes that function like normal liver cells, which is seen in several types of hollow fiber



1. Allen J, Hassanein T, Bhatia S (2001). "Advances in bioartificial liver devices". *Hepatology* **34** (3): 447–55. doi:10.1053/jhep.2001.26753. PMID 11526528. [Free Full Text](#).
2. Strain A, Neuberger J (2002). "A bioartificial liver--state of the art". *Science* **295** (5557): 1005–9. doi:10.1126/science.1068660. PMID 11834813.
3. [Current Work on the Bioartificial Liver](#)

Piele artificială

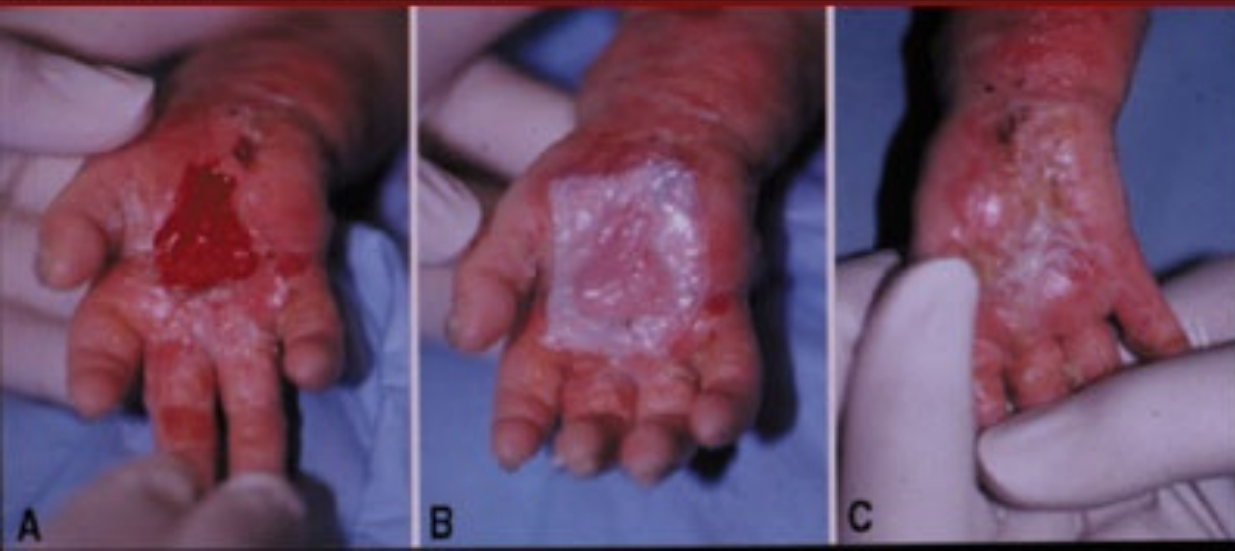


- Fibroblaste pe o matrice compusă din colagen tip I cu cultivarea ulterioară de keratinocite și lăsate să se stratifice.

Constructed by culturing human foreskin-derived neonatal fibroblasts in a bovine type I collagen matrix over which human foreskin-derived neonatal epidermal keratinocytes are then cultured and allowed to stratify,

- Apligraf provides both cells and matrix for the nonhealing wound. Its exact mechanism of action is not known, but it is known to produce cytokines and growth factors similar to healthy human skin.

Medscape® www.medscape.com





Promiteți-vă că veți face tot ce este posibil pentru a vă atinge obiectivele; aveți încredere în viață, aveți încredere în voi înșivă.

Vă mulțumesc pentru atenție!!