DORIN LELEA
Digitally signed by DORIN LELEA
T=Director Scoala Doctorala, C=RO, S=TIMIS, L=Timisoara, O=UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN TIMISOARA, E=dorin.lelea@upt.ro, SERIALNUMBER=201104209DL10, G=DORIN, SN=LELEA, CN=DORIN LELEA
Atest integritatea acestui document
Computerul meu
2024.03.07 12:53

Dispozitiv experimental prevăzut cu sistem de analiză computerizată de imagini biomedicale pentru obținerea biomatricilor cardiace

Teză destinată obţinerii
titlului ştiinţific de doctor inginer
la
Universitatea Politehnica Timişoara
în domeniul INGINERIE ELECTRONICĂ, TELECOMUNICAȚII ȘI TEHNOLOGII INFORMAȚIONALE
de către

Ing. Dumitru-Daniel BONCIOG

Preşedintele comisiei: prof.univ.dr.ing Aldo de Sabata
Conducător ştiinţific: prof.univ.dr.ing Mihaela-Ruxandra Lascu
Referenţi ştiinţifici: - prof.univ.dr.ing Lăcrămioara Stoicu-Tivadar
- acad.prof.univ.dr. Gheorghe-Ioan Mihalaș
- prof.univ.dr. ing. Nicolae-Marius Roman

Ziua susţinerii tezei: 30.01.2024

BUPT

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

1. Automatică
2. Chimie
3. Energetică
4. Inginerie Chimică
5. Inginerie Civilă
6. Inginerie Electrică
7. Inginerie Electronică şi Telecomunicaţii
8. Inginerie Industrială
9. Inginerie mecanică
10. Ştiinţa Calculatoarelor
11. Ştiinţa şi Ingineria Materialelor
12. Ingineria Sistemelor
13. Inginerie Energetică
14. Calculatoare şi Tehnologia Informaţiei
15. Ingineria Materialelor
16. Inginerie şi Management
17. Arhitectură
18. Inginerie Civilă și Instalații
19. Inginerie Electronică, Telecomunicații și Tehnologii Informaționale

Universitatea Politehnica Timişoara a iniţiat seriile de mai sus în scopul diseminării expertizei, cunoştinţelor şi rezultatelor cercetărilor întreprinse în cadrul Şcolii doctorale a universităţii. Seriile conţin, potrivit H.B.Ex.S Nr. 14 / 14.07.2006, tezele de doctorat susţinute în universitate începând cu 1 octombrie 2006.

Copyright © Editura Politehnica – Timişoara, 2023

Această publicaţie este supusă prevederilor legii dreptului de autor. Multiplicarea acestei publicaţii, în mod integral sau în parte, traducerea, tipărirea, reutilizarea ilustraţiilor, expunerea, radiodifuzarea, reproducerea pe microfilme sau în orice altă formă este permisă numai cu respectarea prevederilor Legii române a dreptului de autor în vigoare şi permisiunea pentru utilizare obţinută în scris din partea Universităţii Politehnica Timişoara. Toate încălcările acestor drepturi vor fi penalizate potrivit Legii române a drepturilor de autor.

România, 300223 Timişoara, Bd. Vasile Pârvan 2B
Tel./fax 0256 404677
e-mail: editura@upt.ro

BUPT

Cuvânt înainte

În calitate de doctorand în cadrul Facultății de Electronică, Telecomunicații și Tehnologii Informaționale, Departamentul de Măsurări și Electronică Optică al Universităţii Politehnica Timişoara în colaborare cu Spitalul Clinic Județean de Urgență ”Pius Brânzeu” Timișoara - Centru de Terapii Genice și Celulare în Tratamentul Cancerului - OncoGen, am avut privilegiul de a finaliza teza de doctorat într-un domeniu important și de mare actualitate - ingineria tisulare. În această teză, am prezentat cu mult entuziasm rezultatele practice obținute în urma realizării unui dispozitiv inovator pentru decelularizarea *in vitro* a inimilor de șobolan.

Pe durata programului de cercetare doctorală, Octombrie 2020 și Decembrie 2023, am avut onoarea să beneficiez de îndrumarea și experiența distinsei doamne Prof.univ.habil.dr.ing. Mihaela Ruxandra Lascu, contribuind astfel la finalizarea cu succes a tezei de doctorat. Îi aduc calde mulțumiri pentru îndrumarea acordată în parcurgerea tuturor etapelor de cercetare, necesare atingerii obiectivelor propuse, precum și sprijinul oferit de-a lungul tuturor etapelor cheie ale cercetării doctorale.

Doresc să îmi exprim aprecierea mea sinceră și călduroasă pentru colaborarea strânsă și suportul oferit de Dr.habil. Valentin Laurențiu Ordodi, care este un partener valoros în realizarea de articole științifice și a experimentelor practice. Această colaborare a fost esențială pentru succesul acestei teze de doctorat și sunt profund recunoscător pentru dedicarea sa neîntreruptă și pentru eforturile sale constante de a mă îndruma și a mă ajuta să obțin cele mai bune rezultate. Dr. Ordodi este o persoană dedicată în activitatea didactică și de cercetare, iar aceste calități au inspirat nu doar munca mea de cercetare, ci și dezvoltarea mea personală. Așadar, vreau să îi mulțumesc pentru căldura, prietenia și sprijinul său constant, care au făcut posibilă realizarea acestei teze de doctorat și care m-au învățat multe despre dedicarea și pasiunea pentru cercetare.

De asemenea, îmi exprim aprecierea și recunoștința către doamna director departament MEO - șef lucrări univ.dr.ing. Liliana Mâțiu-Iovan pentru susținerea și încurajarea valoroasă și constantă oferită în această călătorie academică, dar și personală.

Nu în ultimul rând, recunoștința mea se îndreaptă către familia mea, care mi-a oferit suport și înțelegere în timpul întregului program de cercetare și care au fost alături de mine în momentele importante ale vieții mele academice.

Timişoara, Ianuarie 2023 Dumitru-Daniel Bonciog

BUPT

BONCIOG, Dumitru-Daniel

Dispozitiv experimental prevăzut cu sistem de analiză computerizată de imagini biomedicale pentru obținerea biomatricilor cardiace

Teze de doctorat ale UPT, Seria X, Nr. YY, Editura Politehnica, 2023, 124 pagini, 47 figuri, 3 tabele.

Cuvinte cheie: dispozitiv Langendorff, sistem de decelularizare, inginerie tisulară, decelularizare cardiacă, biomatrice cardiacă, imagini biomedicale, aplicație software, rețea neuronală,

Rezumat,

Teza abordează o tematică nouă și importantă în domeniul ingineriei tisulare. Lucrarea are ca obiectiv proiectarea, elaborarea și construirea unui dispozitiv, tip Langendorff modificat pentru decelularizarea *in vitro* inimii de șobolan, asociat cu un sistem de analiză computerizată a imaginilor biomedicale colectate în scopul obținerii de biomatrici cardiace. Teza include o prezentare a procesului automatizat de decelularizare, algoritmului software optimizat și îmbunătățirile aduse dispozitivului prin integrarea unei coloane vibrante de fluid. În plus, ultimul capitol al lucrării prezintă un aspect inovator și se axează pe optimizarea procesului de decelularizare prin intermediul unor rețele neuronale. Această teză aduce o contribuție semnificativă în domeniul ingineriei tisulare în vederea optimizării protocoalelor de transplant de organe, utilizând elemente electronice, mecanice și de inteligență artificială.

BUPT

CUPRINS

CUPRINS 5
NOTAȚII, SIMBOLURI ȘI ABREVIERI 7
LISTA DE FIGURI 9
LISTA DE TABELE 12
1. INTRODUCERE 13
1.1 Provocări actuale 14
1.2 Perspective inginerești 15
1.3 Protocoale experimentale folosite pentru decelularizare 17
1.4 Metode și agenți fizico-chimici utilizați în procesul de decelularizare 18
2. DIVERSE DISPOZITIVE DE LABORATOR ȘI SISTEME DE DECELULARIZARE .. 20
2.1 Sisteme de decelularizare bazate pe perfuzie 22
2.2 Sisteme de decelularizare bazate pe imersie și agitare 28
2.3 Dispozitive și sisteme de decelularizare comerciale 30
2.4 Lipsa standardelor pentru caracterizările materialelor decelularizate 33
3. PROIECTAREA ȘI REALIZAREA UNUI DISPOZITIV EXPERIMENTAL FOLOSIT PENTRU DECELULARIZAREA INIMILOR DE ȘOBOLAN 34
3.1 Obiective generale propuse 34
3.2 Determinări folosind metoda spectrofotometriei în ultraviolet folosind NanoDrop ND-1000 35
4. PROIECTAREA ȘI REALIZAREA UNUI DISPOZITIV LANGENDORFF MODIFICAT PENTRU DECELULARIZAREA INIMII DE ȘOBOLAN 37
4.1 Scopul studiului 37
4.2 Descrierea dispozitivului experimental 38
4.3 Componentele sistemului 39
4.4 Protocol experimental 41
4.5 Rezultate și discuții 42
4.6 Concluzii 44
4.7 Sumarul contribuțiilor 44
5. PROIECTAREA UNUI SISTEM AUTOMATIZAT PENTRU PROCESUL DE DECELULARIZARE A INIMII DE ȘOBOLAN 45
5.1 Crearea aplicației software de achiziție, prelucrare și analiză a imaginilor biomedicale 45
5.1.1 Scopul studiului 45
5.1.2 Obiectivele generale propuse 46
5.1.3 Descrierea dispozitivului experimental 46
5.1.4 Implementare Hardware 46
5.1.5 Implementare Software 49
5.1.6 Rezultate și discuții 52
5.1.7 Concluzii 53
5.2 Optimizarea algoritmului software pentru decelularizarea automată 54
5.2.1 Scopul studiului 54
5.2.2 Descrierea dispozitivului experimental 54

BUPT

5.2.3 Implementare Hardware 54
5.2.4 Implementare Software 54
5.2.5 Sistemul de monitorizare 59
5.2.6 Test spectrofotometric 60
5.2.7 Concluzii 62
5.3 Sumarul contribuțiilor 62
6. ÎMBUNĂTĂȚIREA DISPOZITIVULUI EXPERIMENTAL CONTROLAT ÎN PRESIUNE PREVĂZUT CU O COLOANĂ VIBRANTĂ DE FLUID 64
6.1 Scopul studiului 64
6.2 Descrierea dispozitivului experimental 65
6.2.1 Componentele sistemului 65
6.2.2 Sistemul de monitorizare 78
6.2.3 Test spectrofotometric 81
6.2.4 Concluzii 83
6.3 Sumarul contribuțiilor 84
7. OPTIMIZAREA PROCESULUI DE DECELULARIZARE PRIN INTERMEDIUL UNEI REȚELE NEURONALE 85
7.1 Introducere 85
7.2 Scopul studiului 89
7.3 Descrierea arhitecturii rețelei neuronale convoluționale 90
7.4 Rezultate și discuții 92
7.5 Concluzii 93
7.6 Sumarul contribuțiilor 94
8. CONCLUZII ŞI CONTRIBUŢII PERSONALE 95
8.1 Concluzii 95
8.2 Contribuții propii 97
8.3 Direcții viitoare de cercetare 100
BIBLIOGRAFIE 102
ANEXA A 111
ANEXA B 114
ANEXA C 120
ANEXA D 123
LISTA PUBLICAŢIILOR REZULTATE ÎN URMA CERCETĂRII DOCTORALE, PUBLICATE SAU ACCEPTATE SPRE PUBLICARE, SUB AFILIERE UPT 124

BUPT

NOTAȚII, SIMBOLURI ȘI ABREVIERI

Acronim	Limba Română	Limba Engleză
3D	Tridimensional	Three dimensional
ADN	Acid dezoxiribonucleic	Deoxyribonucleic Acid
AO	Amplificator operațional	Operational Amplifier
ARN	Acid ribonucleic	Ribonucleic Acid
CNN	Rețele neuronale convoluționale	Convolutional Neural Network
DC-DC	Sursă în comutație DC-DC	Direct Current to Direct Current
DI H_2O	Apă deionizată	Deionized Water
DVI	Interfață digitală vizuală	Digital Visual Interface
ECM	Matrice extracelulară	Extracellular Matrix
EDTA-Na_2	Acid etilendiaminotetraacetic	Ethylenediaminetetraacetic Acid
GAN	Rețelele adversare generative	Generative Adversarial Networks
GPU	Unitate de procesare grafică	Graphics Processing Unit
GRU	Unitate de recurență ghidată	Gated Recurrent Unit
GUI	Interfața cu utilizatorul	Graphical User Interface
HDMI	Interfață multimedia de înaltă definiție	High-Definition Multimedia Interface
HPC	Cameră de perfuzie hidrostatică	Hydrostatic Perfusion Chamber
IR	Infraroșu	Infrared
LED	Diodă electro-luminiscentă	Light Emitting Diode
LSTM	Memorie pe termen scurt	Long Short-Term Memory
micro SD	Card de memorie	micro SD
MLP	Perceptron multistrat	Multilayer Perceptron
mmHg	Milimetri pe coloană de mercur	Millimeters of Mercury
NaCl	Clorură de sodiu	Sodium Chloride
NH_4OH	Hidroxid de amoniu	Ammonium Hydroxide
ORCA	Bioreactor cu Control și Achiziționare pentru Organe	Organ Control and Acquisition Bioreactor
PBS	Clorură de potasiu	Potassium Chloride

PC	Calculator personal	Personal Computer
PEG	Polietilenglicol	Polyethylene Glycol
ReLU	Unitatea liniară rectificată	Rectified Linear Unit
ResNet	Rețea Residuală	Residual Network
RMS	Valoare efectivă/rădăcina pătrată medie	Root Mean Square
SBC	Calculator pe o singură placă	Single-board Computer
$scCO_2$	Dioxid de carbon supercritic	Supercritical Carbon Dioxide
SDS	Dodecil sulfat de sodiu	Sodium Dodecyl Sulfate
Snubber	Amortizare	Snubber
THD	Componentă cu montaj Trough-Hole	Through Hole Device
UK	Regatul Unit	United Kingdom
UV	Ultraviolet	UltraViolet
VAC	Tensiune curent alternativ	Volts Alternating Current
VDC	Tensiune curent continuu	Volts Direct Current
VGG	Grupul de geometrie vizuală	Visual Geometry Group

LISTA DE FIGURI

Figura 1-1. Percepția tehnică a organelor și țesuturilor umane *(adaptare după Sarindr Bhumiratana și colab.) [11].* 15
Figura 2-1. Configurare experimentală a sistemului de decelularizare prin perfuzie realizat din a–bioreactor, b–capcane de aer, c–program realizat în LabVIEW, d–pompă peristaltică și electrovalve *(după N. Poornejad și colab.) [45].* 23
Figura 2-2. Configurare experimentală a sistemului de decelularizare automată *(după A.P. Price și colab.) [46].* 24
Figura 2-3. Schema sistemului de mare capacitate pentru decelularizarea organelor mari *(după D.C. Sullivan și colab.) [47].* 25
Figura 2-4. Schema sistemului hibrid de decelularizare cu $scCO_2$. 1–Cilindru CO_2; 2–Supapă de înaltă presiune; 3–Injectomat; 4–Camera de mediu; 5–Cameră de presaturare; 6 – Agitator și aditiv(i); 7–Cameră de tratament; 8–Biomaterial; 9–Manometru; 10–Pompă manuală; 11–Regulator de contrapresiune *(după D.M. Casali și colab.) [48].* 26
Figura 2-5. Diagrama configurației experimentale a dispozitivului *(adaptare după B. Struecker și colab.) [50].* 27
Figura 2-6. Flux de lucru pentru a crea soluții ECM specifice țesuturilor care pot fi încorporate în hidrogeluri *(adaptare după A. Skardal și colab.) [51].* 29
Figura 2-7. Bioreactor cu cameră tubulară Ebers *(după Ebers Medical) [59].* 30
Figura 2-8. Camera de perfuzie hidrostatică pentru decelularizarea organelor și țesuturilor - HPC-3 *(după Harvard Apparatus) [60].* 31
Figura 2-9. Bioreactor de regenerare și achiziție de organe a aparatului Harvard, (A) rezervor de încălzire și sistem de control al temperaturii, (B) pompe peristaltice, (C) camera organelor, (D) pompă pulsatilă *(după Harvard Apparatus) [61].* 32
Figura 3-1. Spectrofotometru NanoDrop ND-1000..... 36
Figura 4-1. A. Dispozitiv experimental. B. Diagrama bloc *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [65].* 38
Figura 4-2. Schema electronică a dispozitivului experimental *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [67].* 39
Figura 4-3. A. Circuitul funcțional. B. Partea electronică a dispozitivului. ... 40
Figura 4-4. Îndepărtarea pilozității (A) și injectarea heparinei animalului (B). 41
Figura 4-5. Extracția inimii – deschiderea cavității toracice (A) și fixarea cordului pe canula dispozitivului de decelularizare (B). 42
Figura 4-6. Evoluția concentrației de ADN și proteine în timpul decelularizării inimii (valori mediane) *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [65].* 43
Figura 4-7. Inima înainte de decelularizare (A) și după decelularizare (B). 43
Figura 5-1. Schema bloc a sistemului *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].* 47

BUPT

Figura 5-2. Raspberry Pi 3, model BCM2837 (A) și Raspberry Pi camera (B) *(după D. D. Bonciog și colab.) [81].* 48
Figura 5-3. Dispozitivul experimental utilizat pentru automatizarea procesului de decelularizare *(după D. D. Bonciog și colab.) [87].* 49
Figura 5-4. Interfața cu utilizatorul *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [81].* 51
Figura 5-5. Dependenţa „variabilei de proces" în funcţie de timp *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [81].* 52
Figura 5-6. Organul simulat înainte (A) și după experiment (B) *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [81].* 53
Figura 5-7. Diagrama de funcționare a algoritmului software *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [86].* 55
Figura 5-8. Interfața cu utilizatorul *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [86].* 56
Figura 5-9. Imaginile reale cu organul simulat înainte (A) și după experiment (B), imaginile prelucrate înainte (C) și după experiment (D) *(după D. D. Bonciog și colab.) [86].* 57
Figura 5-10. Serii de imagini aleatorii ale procesului de decolorare *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].* 58
Figura 5-11. Evoluția colorantului în timpul experimentelor, realizată automat cu aplicația software (culoare albastră) *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [86].* 59
Figura 5-12. Evoluția colorantului (valori medii) utilizând spectrofotometrul *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [86].* 60
Figura 5-13. Evoluția colorantului în timpul experimentelor *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [86].* 61
Figura 6-1. Schema sistemului propus *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].* 65
Figura 6-2. Ansamblul electromagnetic *(după D. D. Bonciog și colab.) [87].* 67
Figura 6-3. Schema electrică a amplificatorului de putere *(după D. D. Bonciog și colab.) [87].* 68
Figura 6-4. Circuitul funcțional (A. Vedere de sus, B. Vedere din dreapta). 71
Figura 6-5. Oscilator cu punte Wien realizat cu amplificator operaţional *(după D. D. Bonciog și colab.) [87].* 72
Figura 6-6. Redresor bialternanță cu transformator cu priză mediană *(după D. D. Bonciog și colab.) [87].* 74
Figura 6-7. Stabilizator de tensiune *(după D. D. Bonciog și colab.) [87].* 78
Figura 6-8. Dispozitivul experimental îmbunătățit pentru automatizarea procesului de decelularizare *(după D. D. Bonciog și colab.) [87].* 79
Figura 6-9. Serii de imagini aleatorii ale procesului de decelularizare *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].* 80
Figura 6-10. Dependența „variabilei de proces" în funcţie de timp pentru lotul A și lotul B *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].* 81
Figura 6-11. Evoluția concentrației de ADN și de proteine (valori medii) *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].* 82
Figura 6-12. Identificarea punctului final de decelularizare pentru fiecare experiment *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].* 82

BUPT

Figura 6-13. Durata medie a fiecărui experiment (studiu comparativ) *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].* 83
Figura 7-1. Arhitectura rețelei AlexNet *(după Alex Krizhevsky și colab.) [114].* 87
Figura 7-2. Modul Inception *(adaptare după C. Szegedy și colab.) [115]*... 88
Figura 7-3. Arhitectura rețelei neuronale convoluționale *(după D. D. Bonciog și colab.) [145].* 91

BUPT

LISTA DE TABELE

Tabel 6-1. Legenda diagramei bloc *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].* 66
Tabel 6-2. Protocol experimental *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].* 79
Tabel 7-1. Rezultatele de testare *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [145].* 92

BUPT

1. INTRODUCERE

Cercetarea medicală a evoluat spectaculos în ultimele decenii, influențând semnificativ creșterea speranței de viață. Medicina contemporană, în sepcial medicina de transplant, se confruntă cu provocarea patologiilor cronice degenerative care cunosc o recrudescență, din păcate majoră în populație.

Găsirea unui donator compatibil este o problemă dificilă și limitativă atât în cazul transplanturilor de organe, cât și de celule sau țesuturi. Se cunoaște faptul, că o multitudine de factori, de mediu, genetici și individuali duc la afecțiuni cronice, care determină declinul funcțional al organelor, în anumite situații ajungânduse la insuficiența ireversibilă a unui organ, fapt care determină creșterea anuală a numărului de persoane, care necesită o intervenție de transplant [1].

Această provocare a oferit șansa de a explora noi opțiuni pentru înlocuirea organelor și țesuturilor deteriorate, stabilind o nouă tendință în transplantologie [2,3].

Transplantologia actuală ridică o serie de probleme semnificative. Numărul potențialilor donatori de țesuturi și organe este mult mai redus decât numărul de pacienți, care au nevoie de un astfel de tratament și ca urmare, se dezvoltă liste de așteptare extrem de mari. Cea de-a doua problemă este cea a răspunsului imun de rejet acut, respectiv cronic. Pentru a nu periclita succesul transplantului respectiv este nevoie de utilizarea unor tratamente imunosupresive, de cele mai multe ori agresive și cu efecte adverse foarte serioase (afecțiuni neoplazice, respectiv infecțioase). La aceste aspecte se adaugă considerațiile religioase și morale, care limitează și mai mult fezabilitatea efectuării unei proceduri de transplant.

Lipsa organelor transplantabile a determinat crearea unui nou domeniu de studiu numit inginerie tisulară. Prin inginerie tisulară se obțin biomatrici, care pot fi repopulate *in vitro* cu celule autologe, derivate din celule stem, înlăturându-se astfel componenta imunologică. Practic, se contruiește un construct tridimensional, complet recelularizat care poate fi transplantat.

În prezent, ingineria tisulară oferă multiple posibilități de decelularizare, respectiv recelularizare prin utilizarea diferitelor protocoale fizico-chimice și biologice.

Biomatricea obținută prin decelularizarea diferitelor țesuturi și organe reprezintă o alternativă extrem de eficientă pentru realizarea *in vitro* a unor organe perfect funcționale, care pot fi ulterior transplantate. În plus, procedura nu este afectată de aspecte etice și religioase cum ar fi găsirea unui donator compatibil [4,5].

Metodele de decelularizare folosind surfactanți sunt aplicate cu succes pe țesuturi, care nu sunt prea groase. Un exemplu este țesutul cardiac. Pentru organe mari, cum ar fi ficatul, sunt necesare metode mai complexe, în mai multe etape [6].

O serie de protocoale experimentale de decelularizare cardiacă au fost folosite atât pe animale mari, cât și pe animale mici, pentru a produce biomatrici cu o structură tridimensională adecvată.

BUPT

Procesul de decelularizare, de multe ori complex, include o serie de etape chimice, dar și aplicarea unor agenți fizici (curent electric, curgere turbulentă) și-au demonstrat utilitatea [7].

1.1 Provocări actuale

Ingineria tisulară a fost utilizată până în prezent într-un număr limitat de cazuri de transplant la om, dar se poate evidenția potențialul acesteia de a răspunde nevoilor medicale nesatisfăcute în acest domeniu. Cu toate acestea, atât obstacolele tehnice, cât și economice trebuie depășite înainte ca milioane de pacienți să poată beneficia de aceste tehnologii de vârf.

Exemplificând vezica urinară, uretra și căile respiratorii sunt structuri simple, cavitare sau tubulare, cu pereți relativ subțiri și un număr redus de tipuri celulare. Acestea sunt cele mai accesibile „produse" ale ingineriei tisulare în transplantologia clinică. Ingineria tisulară cu arhitecturi tridimensionale mai complexe rămâne o provocare recunoscută de mult timp. Soluțiile vor depinde de progresele în toate domeniile cheie ale ingineriei tisulare. Aici trebuie incluse proiectarea dispozitivelor de decelularizare, precum și selectarea celulelor și metodele de cultură a acestora, dar și maturarea constructelor în bioreactoare avizate pentru uz clinic înainte de implantarea la om.

O problemă critică va fi depășirea limitărilor de transport de nutrienți și oxigen în toată masa biomatricei, repopulate cu celule înainte ca vascularizația de neoformație să se dezvolte. Un răspuns potențial constă în dezvoltarea de biomateriale, care eliberează oxigen într-un ritm controlat pentru a susține celulele implantate până când se formează noi vase de sânge [8,9]. În plus, va fi important să se intensifice angiogeneza, pentru a oferi țesutului obținut accesul la oxigen și nutrienți în cantitate suficientă și cât mai rapid posibil. Utilizarea factorilor angiogenici, a materialelor de biomatrici îmbunătățite, respectiv a tehnologiilor 3D de imprimare și a maturării accelerate *in vitro* a țesuturilor obținute în bioreactoare, cu siguranță va rezolva aceste probleme.

De un interes deosebit este dezvoltarea de noi materiale, fie biologice, fie artificiale concepute pentru a servi ca suport în dezvoltarea țesuturilor obținute *in vitro*, atât în ceea ce privește componenta parenchimatoasă, cât și vasculatură.

O altă abordare utilizează organe întregi decelularizate, care păstrează arhitectura vasculară și o serie de componente ale matricei extracelulare din țesuturile native.

O altă provocare se concentrează pe repopularea matricilor tisulare cu celule autologe, celule alogene sau chiar xenogene. Grefele obținute folosind celule autologe, obținute din celule stem ale primitorului, teoretic nu prezintă niciun risc de rejet, neexistând nepotriviri genetice. Astfel, se evită necesitatea terapiei medicamentoase imunosupresoare, cu costuri ridicate și efectele secundare, deloc de neglijat. Această abordare autologă, deși poate mai laborioasă și mai costisitoare, pare să aibă un avantaj major. Cu toate acestea, există multe aplicații de inginerie tisulară pentru care celulele autologe adecvate ar putea să nu fie accesibile prin tehnicile de diferențiere *in vitro* a celulelor stem disponibile astăzi în scopuri clinice.

Prin urmare, se caută noi surse de celule pentru medicina regenerativă, în principal din rândul populațiilor de celule progenitoare. Cu toate acestea, orice

BUPT

utilizare a celulelor donatoare neînrudite ridică inevitabil bariera potențială a respingerii imune [10].

Dezvoltarea țesuturilor și organelor umane implică mecanisme strâns reglementate, care sincronizează molecule biologice, cum ar fi citokinele secretate de celule, cu stimuli externi, cum ar fi semnalele fizice și cadrul structural. Imitând mediul nativ al dezvoltării și regenerării țesuturilor. Bioreactoarele moderne sunt dispozitivele care pot forma țesuturi viabile și perfect funcționale *in vitro*, care pot fi ulterior transplantate *in vivo*.

1.2 Perspective inginerești

Studiile în domeniul biologiei dezvoltării și a biologiei celulare, dar și înțelegerea funcției normale și patologice a țesuturilor servesc ca fundament pentru metodele și abordările utilizate pentru a reproduce mediul nativ.

Înțelegerea expresiei genetice și a căilor de reglare, care influențează funcția celulară și dezvoltarea țesuturilor s-a îmbunătățit ca urmare a progreselor realizate în domeniul biologiei celulare și a biologiei dezvoltării. Inginerii biomedicali aplică cunoștințele lor pentru a cerceta sistemele biologice, pentru a studia și pentru a îmbunătății răspunsurile biologice, dar și pentru a genera țesuturi funcționale.

Abordarea inginerească este aplicată atât la scară microscopică, cât și la nivel molecular și celular, cât și la nivel macroscopic, țesut și organ, pentru a imita condițiile din organismul viu.

Figura 1-1 prezintă o perspectivă inginerească a organelor și țesuturilor umane.

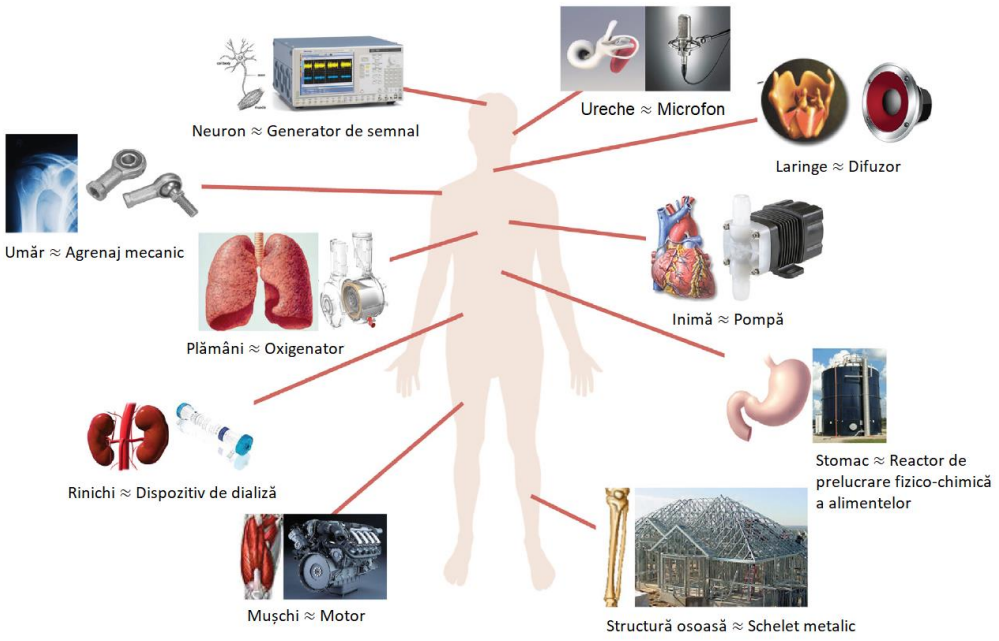


Figura 1-1. Percepția tehnică a organelor și țesuturilor umane *(adaptare după Sarindr Bhumiratana și colab.) [11].*

BUPT

Înțelegerea mediului tisular și a fiziologiei oferă o bază solidă pentru proiectarea diferitelor tipuri de bioreactoare [11]. Mecanismele celulare sunt reglate prin reprezentarea spațială și temporală a factorilor moleculari, la nivel microscopic, în timp ce comportamentul celular este influențat de interacțiunile dintre celule, dar și de interacțiunea dintre celule și matricea extracelulară.

Au fost identificate moleculele esențiale și factorii care reglează procesele dorite în numeroase căi specifice de semnalizare intra și intercelulare. În schimb, în acest domeniu al ingineriei tisulare este necesară gestionarea controlului asupra unei combinații de factori multipli care modifică activitatea celulară printr-o varietate de căi de semnalizare.

Această capacitate ar duce la optimizarea răspunsurilor celulare și la o varietate de modalități de îmbunătățire a formării de țesut, care nu sunt posibile nici *in vivo* și nici cu tehnici tradiționale de cultură a țesuturilor. Așa cum bine se cunoaște, experimentele *in vivo* sunt realizate în mediul natural al organismului. Experimentele *in vivo* tind să fie costisitoare și prezintă mai multe restricții, deoarece se ocupă de organisme vii. Controlul mediului tisular și celular în sistemele convenționale de cultură, pentru a fi relevant din punct de vedere ar reproductibilității necesită efectuarea experimentelor pe loturi mari și multiple.

Cele mai multe experiemente în biologia celulară sunt realizate prin studii de cercetare *in vitro*. Aceasta înseamnă că celulele respective nu sunt studiate în mediul lor natural din cadrul organismului. Rezultatele studiilor arată că succesul acestor experimente este limitat în ceea ce privește simularea condițiilor reale din interiorul organismului și prin urmare reduce acuratețea rezultatelor.

Realizarea unui bioreactor suficient de performant, imitând mediul natural al dezvoltării de țesuturi permite celulelor să formeze țesuturi viabile și funcționale *in vitro*. Metodele de simulare a mediului natural se bazează pe cunoștințele dobândite din domeniul biologiei celulare, biologia dezvoltării, respectiv fiziologia țesuturilor normale și patologice.

Soluțiile pentru cercetarea cantitativă a sistemelor biologice ca răspuns la schimbările în transportul molecular și prezența altor celule sau a matricei extracelulare sunt oferite de proiectarea inovatoare și de constuirea unui astfel de bioreactor.

Matricea extracelulară și populațiile de celule care interacționează pentru a îndeplini diverse funcții „inginerești", se observă foarte bine în figura 1-1. De exemplu, rinichiul combină filtrarea, osmoza, mecanismele pasive și active pentru a transporta cantități mari de molecule și apă, la fel ca un dispozitiv de dializă, în timp ce camerele inimii funcționează similar cu o pompă, care mișcă fluidul, în cazul nostru sângele prin conducte (vasele de sânge), iar plămânul acționează ca un oxigenator. Rețelele capilare combină strategiile convective și difuzive pentru a furniza țesuturilor aportul de oxigen și nutrienți, respectiv de a elimina deșeurile și dioxidul de carbon. Cartilajul și meniscul absorb forțele de impact și lubrifiază articulațiile. Semnalizarea în celulele nervoase este similară cu semnalele electrice, asemenea unui generator de semnale.

Sistemele biologice sunt semnificativ mai complexe, adaptabile și versatile decât componentele și funcțiile „inginerești" ale țesuturilor noastre.

Pentru proiectarea bioreactoarelor și definirea regimurilor lor de funcționare, este esențial să se ia în considerare vizualizarea sistemelor fiziologice dintr-o perspectivă inginerească.

BUPT

Dezvoltarea bioreactoarelor de astăzi se bazează pe înțelegerea noastră tot mai profundă a sistemelor biologice și a modului în care acestea funcționează, împreună cu strategii multidisciplinare de îmbunătățire și optimizare a răspunsurilor celulare.

Transportul adecvat al nutrienților, al factorilor biochimici și al oxigenului către celule trebuie să fie asigurat în mod constant în bioreactoarele realizate. În același timp, trebuie să permită îndepărtarea rapidă a produselor metabolice din mediul de cultură celular și deasemenea acestea vor trebui să construiască în mod eficient un sistem „vascular" sau cel puțin să reproducă transportul oferit în mod normal de vasculatură (pentru a genera și menține țesuturile viabile și funcționale).

Toate etapele dezvoltării de țesuturi sunt strâns controlate de factori mecanici (forțe fizice) și electrici (semnale electrice). Au fost măsurați curenții electrici în cursul dezvoltării țesuturilor, vindecarea rănilor și precondiționarea țesuturilor modificate. Țesuturile bilogice active din punct de vedere electric, cum ar fi mușchii și nervii, pot fi dezvoltate mult mai eficient și pot prezenta o funcționalitate mai bună, atunci când stimulii electrici sunt incluși în designul bioreactorului.

Până în prezent, proiectele de realizare de bioreactoare au progresat din ce în ce mai mult până în punctul în care permite oamenilor de știință și inginerilor biomedicali să genereze grefe de țesut funcțional și complet celularizate, să studieze reacțiile și răspunsurile biologice complexe *in vitro* și să îmbunătățească metodele de cultură de țesuturi.

Inginerii din domeniul biomedical împreună cu oamenii de știință avansează necontenit în crearea sistemelor de bioreactore folosite în ingineria tisulară, respectiv către dezvoltarea sistemelor complexe de cultivare a țesuturilor pentru generarea de grefe de țesut funcționale cu aplicabilitate clinică. Se dorește și furnizarea de instrumente pentru investigarea răspunsurilor biologice complexe, care vor deschide noi posibilități pentru regenerarea țesuturilor, precum și optimizarea tehnicilor de culturi celulare *in vitro* [11].

1.3 Protocoale experimentale folosite pentru decelularizare

Protocoalele experimentale utilizate pentru decelularizare pot varia în funcție de obiectivul specific și de tipul de țesut sau organ care urmează a fi decelularizat.

Prima etapă a oricărui protocol experimental în acest domeniu, trebuie să includă curățarea și pregătirea țesutului sau organului, înainte să se procedeze la decelularizarea propriu zisă.

Cea de-a doua etapă presupune alegerea mediului de decelularizare, care poate fi selectat dintr-o varietate de alternative și este menținut pentru o anumită perioadă de timp, în funcție de țesutul sau organul supus procesului.

Pentru monitorizarea procesului de decelularizare se pot folosi tehnici precum microscopia optică sau electronică, respectiv spectrofotometria în ultraviolet, vizibilă sau chiar în domeniul inflaroșu. Atunci când este determinat momentul final al procesului, mediul de decelularizare trebuie să fie îndepărtat, pentru ca țesutul sau organul să nu se degradeze suplimentar și să fie spălat cu soluții adecvate, iar ulterior să fie utilizat în alte aplicații, cum ar fi recelularizarea.

Cele mai eficiente protocoale de decelularizare utilizează o combinație de abordări fizice, chimice și enzimatice.

BUPT

Un protocol de decelularizare începe întotdeauna cu liza membranelor celulare folosind tratamente fizico-chimice, urmată sau nu de folosirea unor tratamente enzimatice pentru a separa componentele celulare din matricea extracelulară, solubilizarea componentelor citoplasmatice și nucleare. În final se îndepărtează toate resturilor celulare din biomatricea țesutului supus procesului.

Pentru a preveni degradarea excesivă a țesutului supus procesului de decelularizare la agenții fizico-chimici utilizați, imediat după decelularizarea completă, toate aceste substanțe reziduale trebuie îndepărtate cât mai bine posibil.

Până în prezent nu se poate discuta despre un protocol de decelularizare care poate fi aplicabil pentru toate ţesuturile şi organele. Fiecare protocol, care este folosit la ora actuală prezintă atât avantaje cât şi o serie de dezavantaje, care necesită identificarea unor soluții optimizate, adică un compromis acceptabil.

Există mai multe categorii de metode de decelularizare, ce includ factori fizici (tratamente cu ultrasunete, aplicarea vibrațiilor sau a presiunii, agitarea sau perfuzia cu diverse soluții de decelularizare), agenți chimici, cum sunt unele soluții de decelularizare, care solubilizează legăturile intercelulare și intracelulare (detergenții ionici sau nonionici, enzimele, acizii, bazele, anumite săruri) și o combinație a acestor două categorii de agenți. Acestea sunt doar câteva exemple de alternative pentru decelularizare. Metoda care va fi aleasă de către cercetătorii din acest domeniu depinde de mai mulți factori: tipul țesutului, obictivele propuse și scopul final al decelularizării.

Aceste alterantive de decelularizare cu agenți fizici, enzimatici sau chimici sunt folosiți pentru o varietate foarte mare de țesuturi. O clasificare oarecum didactică este prezentată mai jos:

- substanţe de tipul detergenţi tensioactivi ionici de tipul dodecil-sulfat de sodiu, care este foarte des folosit în acest moment [12-15];
- substanţe de tipul detergenţi tensioactivi nonionici de tipul Triton-X [16-18];
- metode chimice (substanțe alcaline și acide) [19-21];
- enzime (tripsină, endonucleaze, exonucleaze) [21-23];
- diverse metode fizice: înghețare rapidă, forță mecanică, agitație mecanică [24-27].

Este important să se noteze că protocoalele experimentale pot varia în funcție de contextul specific și că este necesară o evaluare riguroasă și controlată a procesului de decelularizare pentru a obține rezultate precise și de încredere.

1.4 Metode și agenți fizico-chimici utilizați în procesul de decelularizare

Este extrem de dificilă găsirea unui agent de decelularizare universal, eficient și ușor de utilizat în procesul de decelularizare, deoarece fiecare organ și țesut are caracteristici funcționale și morfologice diferite.

Metodele fizice care pot fi utilizate pentru a facilita decelularizarea țesuturilor, includ înghețarea, presiunea directă, ultrasunetele, câmpul electric și agitația.

Decelularizarea țesutului tendinos și ligamentelor, dar și a țesutului nervos a fost realizată frecvent utilizând înghețarea rapidă. În plus, celulele pot fi lizate și prin aplicarea unei presiuni directe asupra țesuturilor, totuși această tehnică funcționează numai pe țesuturi sau organe, care nu au o ECM bine structurată (de exemplu, ficat, plămân).

BUPT

Pe baza acestor constatări s-a determinat că efectuarea unei serii de cicluri de îngheț-dezgheț ar avea ca rezultat liza celulară, ceea ce înseamnă că matricea extracelulară nu este semnificativ afectată; în cele din urmă această abordare fiind utilă în decelularizarea tisulară. Acest procedeu a fost confirmat experimental de numeroși autori [28, 29]. Studiile care utilizează microscopia electronică au demonstrat că modificările ultrastructurale ale biomatricei realizate sunt minime și nu au impact asupra proprietăților sale mecanice [30].

Straturile de țesut din organe, care sunt caracterizate de planuri naturale de disecție, cum ar fi vezica urinară și intestinul subțire, au fost, de asemenea, separate prin procedee mecanice utilizând diverse tipuri de forțe. Aceste tehnici și metode sunt eficiente și provoacă alterarea minimă a arhitecturii tridimensionale a ECM-ului din aceste țesuturi. Totodată, aplicarea unei presiuni hidrostatice va accelera procesul de decelularizare, prin forțarea curgerii agentului folosit prin sistemul arterio-capilaro-venos al organului supus procesului de decelularizare.

Pentru a ajuta la liza celulară și la îndepărtarea resturilor celulare, ultrasunetele aplicate și agitarea mecanică au fost utilizate împreună cu tratamente chimice. Diverse dispozitive, cum ar fi agitatorul orbital sau un agitator magnetic pot fi folosite pentru a aplica agitarea mecanică. Un aparat cu ultrasunete obișnuit pare să aibă același succes în îndepărtarea materialului celular din țesut, precum plasarea țesutului pe un agitator orbital, în ciuda faptului că nu au fost efectuate studii pentru a identifica amplitudinea sau frecvența ideală a ultrasunetelor utilizate pentru distrugerea celulelor.

Fenomenul de electroporare care presupune aplicarea unui câmp electric asupra organului sau țesutului de interes, acționează prin inducerea unor microperforații la nivelul membranelor celulare, accelerând astfel procesul de decelularizare. Un câmp electric este aplicat celulelor în impulsuri foarte scurte de tensiune ridicată, folosind aceeași tehnică împrumutată din microbiologie. Membranele celulare devin permeabile pentru diferitele substanțe chimice utilizate ca urmare a aplicării acestui câmp electric. Au existat studii anterioare în care procedura a fost utilizată pentru a trata câteva tipuri de cancer la oameni [31, 32]. Tehnologia este foarte promițătoare atât în laborator, cât și în clinică. Astfel, se va obține o alterare ireversibilă a membranelor celulare ducând la liza celulelor, oferind condițiile optime decelularizării unor țesuturi și organe. Expunerea la câmp electric pe o durată de timp de câteva ore trebuie asociată întotdeauna cu o metodă eficientă pentru disiparea căldurii generate de efectul Joule-Lenz.

BUPT

2. DIVERSE DISPOZITIVE DE LABORATOR ȘI SISTEME DE DECELULARIZARE

Biomatricile, indiferent de proveniența lor (cardiace, renale, hepatice, vasculare, etc.) trebuie să respecte cât mai riguros arhitectura organului respectiv și în același timp să conțină un număr cât mai redus de elemente celulare proprii (ideal ar fi absența oricăror celule proprii ale organului de proveniență), astfel încât aceste matrici să poată fi populate ulterior cu celule obținute într-un laborator și care provin de la pacientul căruia urmează să i se efectueze un transplant.

Decelularizarea unui organ în ansamblul său oferă cel mai bun biomaterial tridimensional potrivit pentru recelularizare, folosind celulele stem proprii ale destinatarului și astfel fiind posibilă obținerea unui organ funcțional. În cazul inimii, au fost aplicate mai multe protocoale de decelularizare atât pe animale mari, cât și pe animale mai mici, pentru a obține un biomaterial cu o structură tridimensională adecvată.

Harald Ott și echipa sa, a aplicat perfuzie anterogradă coronariană pe inima șobolanului folosind trei agenți tensioactivi pentru decelularizare: Triton X-100, dodecil-sulfat de sodiu și polietilenglicol. În plus ei au folosit și metode pe bază de enzime, cum ar fi tripsina și acidul deoxicolic în prezența sării disodice a acidului etilendiaminotetraacetic (*EDTA-Na_2*). În cele din urmă, aceștia au descoperit că protocoalele experimentale bazate pe SDS, ca agent decelularizant, sunt cu mult superioare față de cele care au folosit PEG, Triton X-100 sau enzime [33, 34].

Tehnica inimii izolate *in vitro* a fost stabilită inițial în studiul fiziologiei cardiace de către Oscar Langendorff în anul 1895. Dacă inima este păstrată în condiții specifice, ea și-ar putea susține atât activitatea electrică, cât și cea contractilă pentru o perioadă de timp predeterminată.

De atunci, metoda Langendorff (numită după creatorul său) a rămas o tehnică eficientă folosită în cercetarea cardiacă și a contribuit la progresul semnificativ al științei medicale.

Scopul principal al metodei Langendorff este de a furniza o inimă izolată cu oxigen și metaboliți, printr-o canulă introdusă în aortă. Aceasta este o tehnică *in vitro* complexă, care este folosită în principal în cercetările farmacologice și fiziologice și permite evaluarea mai multor parametri hemodinamici cardiaci, dar fără a se limita la contractilitate și ritm cardiac. Cel mai important criteriu este să se stabilească o presiune de perfuzie, care să permită decelularizarea într-o perioadă de timp rezonabilă, dar concomitent să nu se supună rețeaua vasculară a biomatricii la o presiune hidrostatică prea mare, care să determine distrugeri ale arhitecturii acesteia.

Această metodă Langendorff presupune utilizarea mai multor pași. Primul pas constă în îndepărtarea inimii din corpul omului sau a animalului supus procesului, tăind vasele de sânge, apoi este perfuzat în mod invers prin aortă, de obicei cu o soluție oxigenată bogată în nutrienți (de exemplu, soluția Krebs – Henseleit sau soluția Tyrone).

BUPT

Supapa aortică este determinată să se închidă, datorită presiunii inverse, forțând soluția în vasele coronare, care sunt deobicei responsabile pentru alimentarea țesutului cardiac cu sânge. Ca urmare, mușchiul cardiac este alimentat cu nutrienți și oxigen, ceea ce îi permite să continue bătăile timp de câteva ore după îndepărtarea sa de la animal sau om. În cele din urmă, este un preparat util, deoarece permite adăugarea de medicamente (prin perfuzie) și observarea efectului acestora asupra inimii, fără complicațiile asociate cu impactul neurologic și hormonal de la animale vii sau umane [33].

Tehnicile actuale de decelularizare includ, în general, scufundarea țesutului într-una sau mai multe soluții de tratament și incubarea acestuia fie static, fie prin expunerea țesutului la o anumită formă de agitație [7]. Pentru a crea diverse posibilități de decelularizare a organelor, ingineria tisulară utilizează diferite metode fizico-chimice.

Ceea ce este foarte important în procesul de decelularizare este ca acesta să se realizeze, astfel încât să nu afecteze integritatea structurală a componentelor matricei extracelulare sau integritatea matricei vasculare. Dacă procesul este prea lung, este cunoscut faptul că, toți agenții de decelularizare pot afecta structura tridimensională a biomatricei obținute. Cunoscând acest lucru, putem afirma că provocarea obținerii biomatricelor cardiace este de a reduce durata decelularizării, pentru a ne asigura că procesul este complet [35]. Mai exact, la finalul procesului de decelularizare trebuie să se genereze o structură tridimensională stabilă a acelui organ și adecvată dintr-o perspectivă biomecanică.

Dispozitivele și metodele utilizate în aceste experimente se bazează pe principiul Langendorff, în care principala cerință este să se stabilească o presiune de perfuzie, care să permită decelularizarea într-un interval de timp rezonabil; dar concomitent, să nu se supună rețeaua vasculară a biomatricii la o presiune hidrostatică prea mare, care ar putea avea ca rezultat distrugerea arhitecturii sale.

Decelularizarea este un proces puțin studiat, astfel încât tehnologiile și dispozitivele asociate sunt în mare parte nestandardizate și limitate la dimensiuni mici, specifice laboratorului [36].

În momentul de față, există un interes deosebit de mare în obținerea de biomatrici pornind de la organe și țesuturi. Protocoalele de decelularizare au devenit foarte diversificate și optimizate pentru majoritatea situațiilor întâlnite în practica obișnuită.

Mulți cercetători utilizează diverse dispozitive în care sunt descrise mai mult metodele eficiente pentru acest proces. Dispozitivele realizate în acest scop se bazează în general pe sisteme de automatizare, care includ anumite echipamente automatizate (cum ar fi seringi semiautomatizate, rezervoare cu electrovalve controlate automat pentru alternarea automată a soluțiilor utilizate), software-uri achiziționate (Labchart Pro de la AD Instruments, LabVIEW de la National Instruments), o varietate de senzori de presiune, senzori optici, controlere pentru pompe peristaltice, scanare laser, microscopie electronică cu scanare și alte componente.

În concluzie, se poate afirma că dispozitivele folosite la ora actuală, pe plan mondial se bazează pe principiul aparatului pus la punct de către Langendorff, acestea fiind modificate și adaptate necesarului de perfuzie a organului supus decelularizării.

BUPT

Pentru a obține organe funcționale, care ar putea reduce necesitatea transplanturilor de organe alogene, până în prezent au fost realizate semnificativ mai multe cercetări privind decelularizarea organelor întregi, astfel încât fiind posibil ca acestea să fie folosite pentru recelularizare [37-39].

Datorită numărului limitat de bioreactoare accesibile comercial, care sunt special concepute pentru decelularizarea de organe și țesuturi, majoritatea sistemelor actuale sunt încă în curs de dezvoltare în cadrul mai multor institute de cercetare și utilizează echipamente specializate, ce nu au fost încă comercializate [40-43].

Sistemele de decelularizare pot fi grupate în două categorii principale:

- decelularizarea pe bază de perfuzie;
- decelularizarea prin imersie sau agitație (brută).

Pentru a îmbunătăți și pentru a optimiza procesul de decelularizare, sistemele astfel create, variază parametrii de control. Principalii parametri de control utilizați în procesul de decelularizare sunt:

- tipul de agent fizio-chimic utilizat, care ar avea un impact semnificativ asupra procesului de decelularizare;

De exemplu, utilizarea SDS (ionică) mai degrabă decât Triton X-100 (neionic) va elimina mai mult acid dezoxiribonucleic și acid ribonucleic într-un ritm mai rapid, dar provoacă mai multe daune ECM-ului [44].

- timpul de expunere la reactiv;
- concentrația agentului de decelularizare.

Există o diferență între utilizarea unui surfactant neionic spre deosebire de un surfactant ionic. În mod similar cu aceasta, o concentrație mai mare sau un timp de expunere mai lung poate crește îndepărtarea ADN-ului și liza celulară, dar dăunează microstructurii ECM-ului prin îndepărtarea colagenului și a altor componente cruciale ale ECM-ului. Prin urmare, optimizarea parametrilor este necesară pentru a echilibra îndepărtarea ADN-ului și a ARN-ului față de deteriorarea structurii ECM.

2.1 Sisteme de decelularizare bazate pe perfuzie

Primul sistem de automatizare prin perfuzie este focusat pe decelularizarea îmbunătățită a rinichilor întregi de porc. **Poornejad** și colaboratorii săi s-au concentrat asupra modului în care se aplică cel mai bine șocul osmotic țesutului pentru a maximiza procesul de decelularizare [45]. În acest proces s-au utilizat cicluri alternante între SDS, clorură de sodiu și apă deionizată pentru perioade scurte.

Alternarea acestor substanțe a putut fi realizată cu ajutorul unor supape solenoide, o pompă peristaltică și recipiente pentru soluții. Pentru a controla rata de perfuzie a valvelor solenoide a fost creată o aplicație software, folosind limbajul de programare LabVIEW, oferit de către cei de la National Instruments [45].

Această metodă a fost creată pentru a reduce expunerea organului la soluția SDS, care este foarte eficientă pentru liza celulelor și la denaturarea proteinelor. Prin urmare, reducerea la minim a acestei expuneri ar putea reduce pierderea funcției proteinei ECM-ului.

BUPT

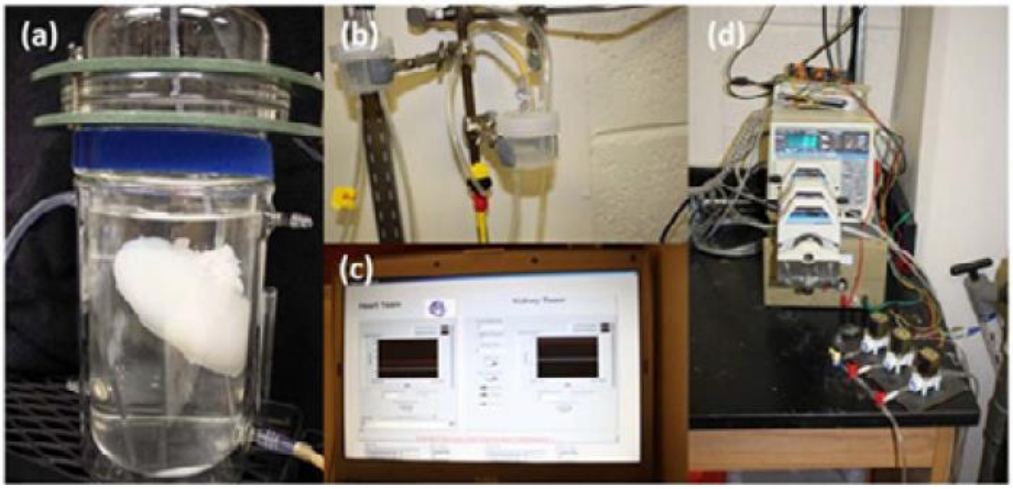


Figura 2-1. Configurare experimentală a sistemului de decelularizare prin perfuzie realizat din a–bioreactor, b–capcane de aer, c–program realizat în LabVIEW, d–pompă peristaltică și electrovalve *(după N. Poornejad și colab.) [45].*

Acest studiu științific demonstrează cum se poate obține o decelularizare completă cu o reducere a timpului de expunere la soluția SDS, de la 36 de ore la doar 5 ore.

Rinichiul de porc a fost spălat în cicluri de 30 de minute cu soluție de clorură de sodiu (soluție hipertonică), soluție de dodecil-sulfat de sodiu și apă deionizată. Viteza de perfuzie a fost, crescută treptat la fiecare 30 de minute pe parcursul spălării.

Un gradient osmotic constant a fost produs de ciclul reactanților utilizați, precum și de debitul mai mare, care a ajutat la o mai bună liză a membranelor celulare. Rinichii au fost apoi curățați timp de două zile, după ce au fost decelularizați.

Eficiența metodei îmbunătățite de decelularizare este influențată de aplicarea șocului osmotic pe membranele celulare între fiecare ciclu de spălare de 30 de minute. Acest lucru reduce timpul de expunere al ECM-ului la SDS, păstrând mai multă microstructură și alte componente esențiale ale matricei extracelulare.

Pentru o decelularizare îmbunătățită a organelor, utilizarea șocului osmotic împreună cu controlul fluxului pare promițătoare.

Un alt sistem complet automat de decelularizare a întregului organ (figura 2-2) a fost creat de **Price** și echipa sa [46].

Scopul proiectării acestui sistem a fost automatizarea completă a procesului de decelularizare a organelor cu sisteme vasculare intacte. Cu un timp estimat de doar 24 de ore, acest sistem automat poate decelulariza un plămân de porc de aproape 6 ori mai rapid decât procesul obișnuit de decelularizare manuală, care durează în medie 6-7 zile.

În acest studiu, a fost creat un program software pentru a gestiona un ansamblu de supape, care a fost conceput pentru a selecta și a sincroniza perfuzia fluidului de decelularizare prin sistemul vascular și căile respiratorii.

BUPT

Acest sistem a fost interfațat cu un prototip de cameră de bioreactor, care a fost conectată la un alt program software, dintr-o sursă comercială și care are rolul de a gestiona volumul și presiunea debitului fluidelor.



Figura 2-2. Configurare experimentală a sistemului de decelularizare automată *(după A.P. Price și colab.) [46].*

Matricea pulmonară, care a fost decelularizată prin metoda automată a fost comparată cu o metodă manuală folosită anterior de către autori, dar și de alți cercetători.

Acest sistem este configurat cu mai multe rezervoare, care conțin apa deionizată (Dl H_2O), Triton X-100, deoxicolat de sodiu, NaCl, dezoxiribonuclează și soluție salină tamponată (PBS), care sunt toate necesare procesului de decelularizare și sunt toate prezente în mai multe rezervoare ale acestui sistem.

Pentru a perfuza plămânii, un sistem automat cu supape conectează rezervoarele la o cameră de decelularizare. Potrivit analizei de organe decelularizate, această automatizare a procesului este mai fiabilă și mai eficientă decât metodele manuale.

În concluzie, acest sistem poate fi, de asemenea, utilizat pentru a decelulariza alte organe mari de animale și umane.

BUPT

Sullivan și colaboratorii săi au dezvoltat un sistem de mare debit pentru decelularizarea completă a organelor de dimensiuni mari (rinichi de porci), folosind camere individuale cu sisteme vasculare intacte (figura 2-3) [47].

Rezervoarele folosite în acest sistem sunt de capacitate mare, de 200 L. Acestea sunt pline cu substanțe reactive de decelularizare, cum ar fi SDS și PBS și alcătuiesc sistemul de mare capacitate.

Aceste rezervoare pot fi conectate utilizând un număr de 24 de linii de perfuzie și permit decelularizarea simultană a mai multor organe. Diferitele substanțe chimice folosite în acest protocol de decelularizare sunt pompate în camerele de decelularizare folosind un sistem de comandă pentru rezervoare, care de asemenea este antrenat și de pompe peristaltice, dar și de valve de sistem.

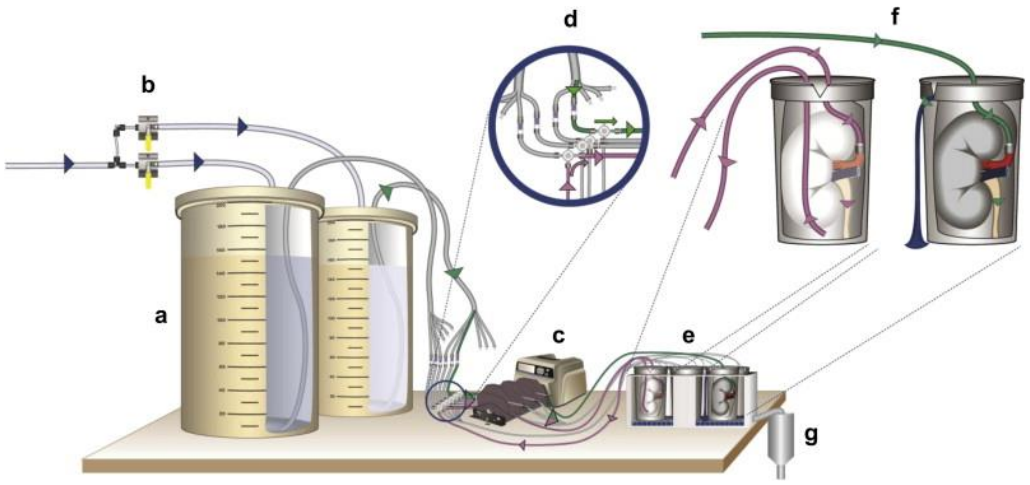


Figura 2-3. Schema sistemului de mare capacitate pentru decelularizarea organelor mari *(după D.C. Sullivan și colab.) [47].*

Aparatul, astfel creat, folosește o arteră intactă pentru perfuzarea detergenților și a tampoanelor de spălare pentru a îndepărta fizic și chimic materialul celular nativ din organele vascularizate în mod natural. Soluțiile tampon de spălare și detergentul concentrat sunt adăugate într-un rezervor și diluate la concentrațiile corespunzătoare cu apă deionizată (figura 2-3. b).

O pompă peristaltică care poate gestiona până la 8 linii de perfuzie independente pe o unitate este apoi utilizată pentru a pompa soluțiile (figura 2-3. c). Perfuzia este direcționată prin conectori interschimbabili (figura 2-3. d) și o supapă cu 3 căi pentru livrarea ușoară la schelele (figura 2-3. e) depozitate în containere individuale, într-un recipient de colectare a soluției generale.

Soluțiile (figura 2-3. f) intră în artera renală, părăsesc vena și ureterul și fie se revărsă în recipientul de colectare generală și ies printr-un drenaj atașat (figura 2-3. g), fie sunt recirculate înapoi într-un recipient specific.

Capacitatea acestui sistem de a schimba reactivii și durata de expunere a acestora oferă flexibilitate procesului. Principalul beneficiu al acestei abordări este că decelularizarea fiecărui organ are loc independent unul de celălalt, permițând izolarea unui organ, dacă este necesar. De asemenea, fiecare sistem stabilit conține

BUPT

și un dezavantaj semnificativ, ca și în cazul tuturor sistemelor create. Dacă este larg răspândit, volumul mare de reactivi necesar în această situație, împreună cu incapacitatea de a recicla reactivii, are ca rezultat costuri mai mari de reactiv și de gestionare a deșeurilor.

Cu toate acestea, acest sistem creat permite decelularizarea mai multor organe simultan și funcționează în mod consecvent și reproductibil.

Pentru a scurta timpul necesar pentru decelularizarea aortei porcine, **Casali** și colegii săi au folosit detergenți apoși cu $scCO_2$ supercritic [48].

Ei au creat această tehnică pentru a scurta timpul necesar procesului, precum și pentru a produce schele pentru ingineria tisulară, deoarece procedura tradițională de decelularizare durează de obicei între 4 și 7 zile. Autorii folosesc țesutul de aortă și sugerează dezvoltarea ulterioară a ingineriei tisulare bazate pe $scCO_2$.

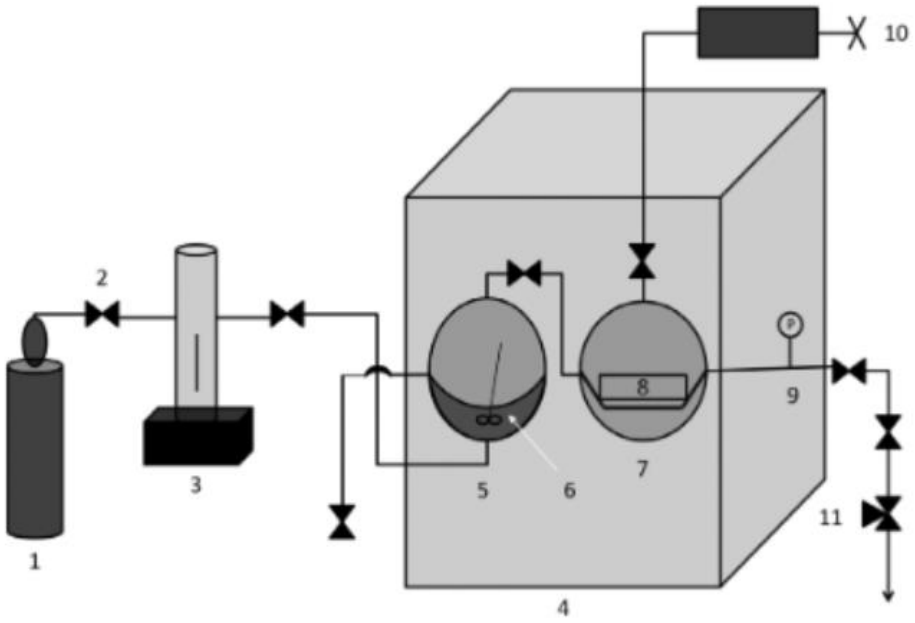


Figura 2-4. Schema sistemului hibrid de decelularizare cu $scCO_2$. 1–Cilindru CO_2; 2–Supapă de înaltă presiune; 3–Injectomat; 4–Camera de mediu; 5–Cameră de presaturare; 6 – Agitator și aditiv(i); 7–Cameră de tratament; 8–Biomaterial; 9–Manometru; 10–Pompă manuală; 11–Regulator de contrapresiune *(după D.M. Casali și colab.) [48].*

Procedura hibridă a implicat mai întâi decelularizarea țesutului folosind soluție SDS, apoi tratarea lui timp de 1 oră cu $scCO_2$ care a fost pre-saturat cu apă și etanol. Folosind o cameră presurizată ce conține $scCO_2$ le-a permis acestor cercetători împrăștierea rapidă cu $scCO_2$ asupra țesutului. Această difuziune rapidă cu $scCO_2$ permite dizolvarea și extragerea oricăror impurități.

Acest tratament folosit, a accelerat procesul de spălare de la o zi la doar o oră prin următoarele două mecanisme propuse:

BUPT

- extracția prin fluid supercritic a celulelor, resturilor celulare și particulelor SDS din țesut;
- îndepărtarea fizică a celulelor din țesut.

Aorta porcină a fost complet decelularizată ca urmare a tratamentului cu $scCO_2$ la presiune ridicată și s-au găsit doar 36ng/mg de ADN în țesut, ceea ce reprezintă un nivel destul de scăzut în comparație cu valoarea de referință de 50ng/mg.

În plus, s-a demonstrat că $scCO_2$ a fost cel mai eficient în eliminarea oricărei SDS rămase, doar 0,0034% din SDS fiind identificate după o oră, spre deosebire de 0,0045% după o spălare cu PBS de 24 de ore. În plus, tratamentul cu $scCO_2$ păstrează nivelul inițial de hidratare al biomaterialului colectat.

Pentru a elimina cu succes materialul celular din ficatul de șoarece [49] și de porc [50] într-un timp mai scurt, cu mai puține leziuni a structurii matricei celulare, **Struecker** și colaboratorii săi au decelularizat organele în condiții de presiune oscilante.

Structura dispozitivului brevetat, care a fost folosit pentru a decelulariza ficatul întreg de porc, este prezentată mai jos.

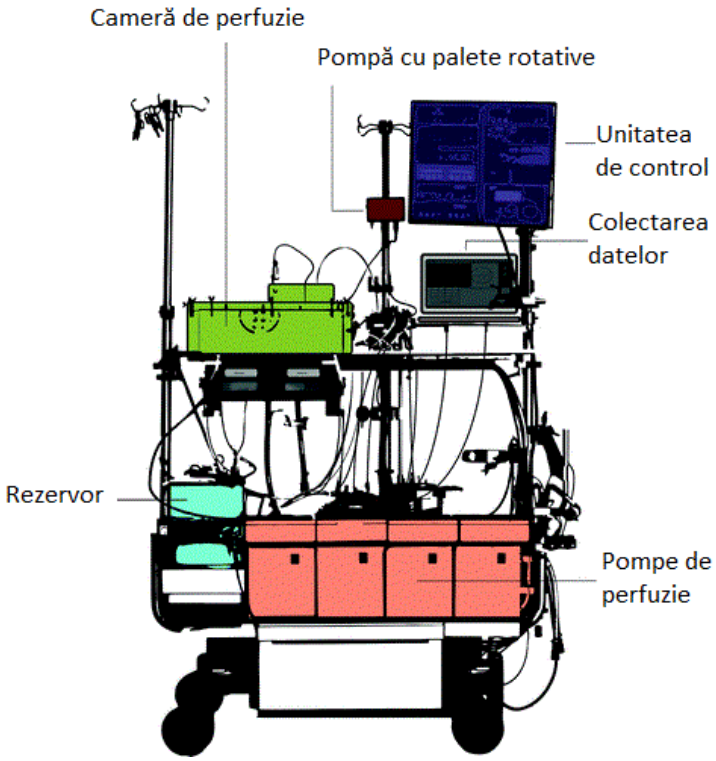


Figura 2-5. Diagrama configurației experimentale a dispozitivului *(adaptare după B. Struecker și colab.) [50].*

BUPT

Aceștia au realizat un dispozitiv, care permite pomparea reactivilor, inclusiv Triton X-100 și SDS în ficat prin vena portă și artera hepatică. Fiecare dintre cele patru tuburi sigilate verticale din acest dispozitiv conțin câte patru conectori pe placa de acoperire și un conector suplimentar pe placa de inferioară. Artera hepatică sau vena portă pot fi perfuzate selectiv folosind conexiunile plăcii de acoperire. Perfuzatul deșeurile poate fi îndepărtat prin intermediul conexiunii de pe placa inferioară. Un al cincilea tub (distribuitor de presiune) pentru distribuirea presiunii furnizate în camerele de perfuzie este situat în mijlocul celor patru camere de perfuzie.

O condiție de presiune oscilantă între P_{max}=20 mmHg până la P_{min}=0 mmHg, la o frecvență de 12 oscilații pe minut a fost produsă de dispozitivul de decelularizare. În plus, pentru a îmbunătăți perfuzia organului, ficatul respectiv a fost rotit manual cu capul în jos, la marcajul de 90 de minute și 270 de minute ale procesului.

Tehnica a condus la o decelularizare mai uniformă a organului, păstrând în același timp ECM-ul intact. În comparație cu decelularizarea ficatului sub presiune continuă, decelularizarea ficatului în condiții de presiune fluctuantă a dus la un ficat semnificativ mai alb, cu mai puține urme de țesut. Investigațiile histologice ulterioare au confirmat integritatea continuă a matricii extracelulare. Cu toate acestea, înțelegerea efectului presiunii oscilante asupra calității matricii extracelulare și a modului în care aceasta poate afecta supraviețuirea organoidelor recelularizate este una dintre constrângeri.

Potrivit acestui studiu, presiunea oscilantă îmbunătățește omogenitatea și rata de perfuzie a reactivilor hepatici prin simularea fluctuațiilor de presiune cauzate de respirația oamenilor.

În concluzie, ultimele două sisteme prezentate și sistemul de automatizare prin perfuzie (realizat de Poornejad și colaboratorii săi) sunt sisteme hibride cu abordări eficiente de decelularizare, ceea ce duce la un prejudiciu mai mic pentru matricea extracelulară rezultată, spre deosebire de celelalte două sisteme, care vizează să sporească eficiența decelularizării.

2.2 Sisteme de decelularizare bazate pe imersie și agitare

În această secțiune este oferită o prezentare generală a sistemelor create și utilizate de diferite grupuri de cercetare, care utilizează abordarea prin imersie și agitare.

Această metodă brută de decelularizare implică agenți fizici, cum ar fi tăierea sau tocarea organului de interes și scufundarea țesutului în reactivi și amestecarea acestora pentru a elimina conținutul celular. Ca rezultat, detergenții utilizați pot pătrunde în țesut mai rapid și pe o suprafață mai mare, accelerând rata procesului de decelularizare.

Studiul lui **Skardal** și echipa sa prezintă dezvoltarea unei biocerneli pentru construcții de țesut bioimprimat ce utilizează această metodă [51].

Țesuturile au fost feliate în bucăți mici înainte de a fi introduse în apă deionizată și agitate timp de 3 zile.

Soluția Triton X-100 a fost aplicată timp de 4 zile după spălarea cu apă deionizată, iar Triton X-100 și NH_4OH a fost aplicată timp de o zi. Țesutul a fost apoi

BUPT

curățat cu apă deionizată timp de încă două zile pentru a scăpa de orice reziduu de detergent.

Matricea extracelulară decelularizată a fost apoi dezagregată și hidrolizată pentru a crea o cerneală bio.

Obiectivul principal este de a prezenta crearea și dezvoltarea unui sistem versatil de biocerneală cu gel hidrosolubil pe care cercetătorii îl pot implementa într-o varietate de moduri în aplicațiile viitoare

Accentul pe caracteristicile biologice și fizice diferențiază această platformă de biomaterial de altele. În ciuda faptului că ambele categorii de factori au o importanță biologică documentată, puțini cercetători le-au combinat pentru a produce materiale cu adevărat asemănătoare țesuturilor pentru ingineria tisulară.

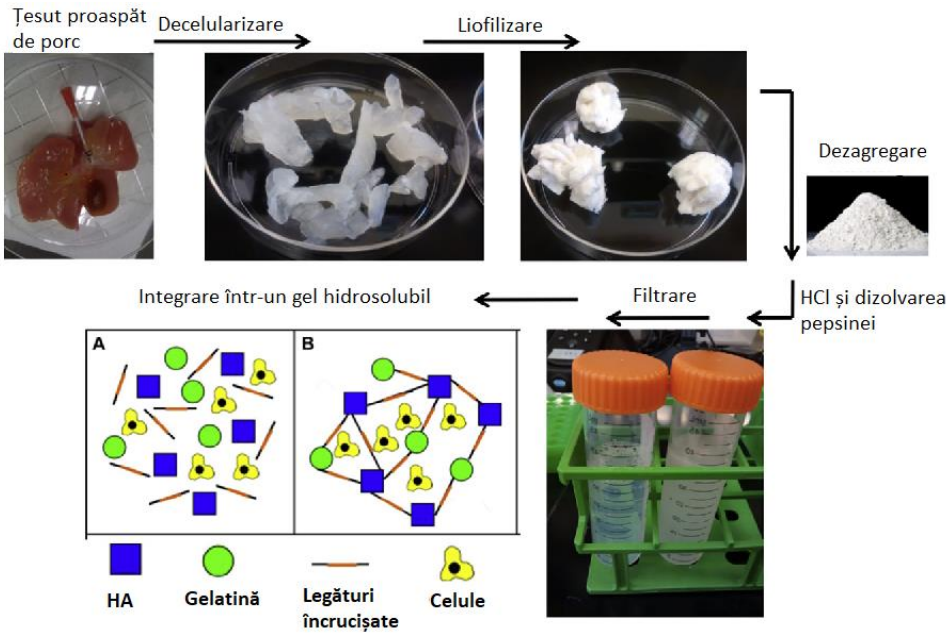


Figura 2-6. Flux de lucru pentru a crea soluții ECM specifice țesuturilor care pot fi încorporate în hidrogeluri *(adaptare după A. Skardal și colab.) [51].*

Deasemenea, **Pati** şi **Choi**, împreună cu colaboratorii lor au efectuat investigații similare folosind țesutul cardiac de porc și mușchii scheletici [52, 53]. **Pati** și colegii lui au produs structuri de dimensiuni relevante din punct de vedere anatomic, care au fost stabile *in vitro*, cu niveluri mai ridicate de viabilitate celulară. În plus, au imprimat și constructe de cartilaj și țesut adipos [53]. Acestea indică adaptabilitatea potențială a tipăririi țesuturilor și aplicării la diferite tipuri și forme de țesut.

Această abordare prin imersare și agitare permite o decelularizare completă și eficientă dacă macrostructura organului nu este necesară. În prezent, nu există evaluări aprofundate sau cercetări extinse, care să utilizeze aceste tehnici de decelularizare. Majoritatea studiilor de cercetare descriu crearea acestei biocerneli

BUPT

pentru matricea extracelulară decelularizată la scară de laborator. Ca urmare, orice protocoale standardizate sunt în mare parte indisponibile.

2.3 Dispozitive și sisteme de decelularizare comerciale

Deocamdată, nu există o documentație care să prezinte sistemele sau instrumentele comerciale de decelularizare.

Abordările și procesele utilizate în decelularizare sunt principalul obiectiv al companiilor comerciale, care au creat biomateriale bazate pe ECM. Acestea, fie nu folosesc sisteme automate specifice decelularizării, fie nu le dezvoltă în cadrul departamentelor.

Miromatrix, ADInstruments, Langendorff și Xylyx Bio sunt câteva exemple de astfel de companii comerciale.

Este cunoscut faptul că Miromatrix, ADInstruments și Langendorff au adaptat mai multe dispozitive de perfuzie [54–57]. În timp ce Langendorff și ADInstruments s-au concentrat pe metodologia lor pentru utilizarea în studii farmacologice și fiziologice, care permit evaluarea parametrilor hemodinamici cardiaci multipli, Miromatrix produce ECM decelularizat din întregul organ, folosit mai apoi în procesul de recelularizare [58].

Obiectivul principal de activitate al companiei Xylyx Bio este producerea de ECM atât pentru porci, cât și pentru oameni. Este bine cunoscut faptul că metodele și instrumentele utilizate pentru decelularizarea acestor organe nu au fost încă făute cunoscut.

Există câteva dispozitive care au fost dezvoltate de companii precum Harvard Apparatus și Ebers, care se concentrează pe dispozitive de decelularizare, camera tubulară Ebers fiind unul dintre puținele dispozitive existente acum pe piață.

Destinat inițial pentru cultivarea celulelor într-un cadru cilindric, **bioreactorul cu cameră tubulară Ebers** este acum utilizat pentru decelularizarea țesuturilor și organelor cu structuri în formă de tub (cum ar fi traheea și esofagul) [59].

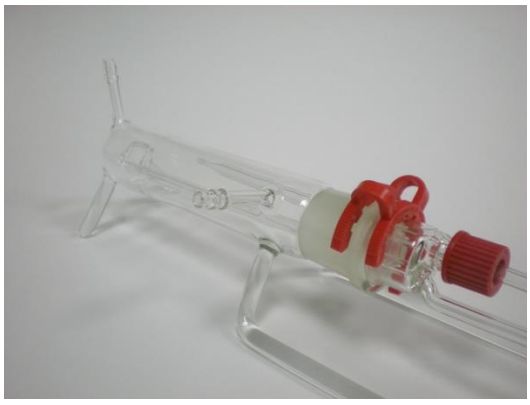


Figura 2-7. Bioreactor cu cameră tubulară Ebers *(după Ebers Medical) [59].*

BUPT

Camera tubulară este împărțită în două secțiuni, care formează circuite de curgere interne și exterioare.

Schela de țesut umple golul din circuitul intern, permițând pomparea mediului fluid în interiorul acestuia. Circuitul extern permite să circule mediul de cultură pe suprafața exterioară a schelei, astfel încât nutrienții să fie livrați pe suprafața exterioară. Acest bioreactor permite utilizatorului să modifice condițiile de curgere din interiorul camerei pentru a stimula fluxul.

Decelularizarea organelor sau decelularizarea țesuturilor tubulare este posibilă în această cameră prin înlocuirea mediului celular cu detergenți. O limitare a acestui dispozitiv la țesutul tubular îngust, îl face ineficient pentru perfuzarea organelor mai mari și mai complicate.

Deoarece cele două circuite nu sunt separate unul de celălalt și nu sunt interconectate, în fiecare circuit pot fi utilizate diverse medii de cultură. Cu utilizarea acestor camere, studiile de co-cultură folosind diferite medii pot fi efectuate cu ușurință.

Aparatul Harvard: HPC-3

Un dispozitiv comercializat de către Harvard Apparatus este camera de perfuzie hidrostatică pentru decelularizarea organelor și țesuturilor - HPC-3 [60].

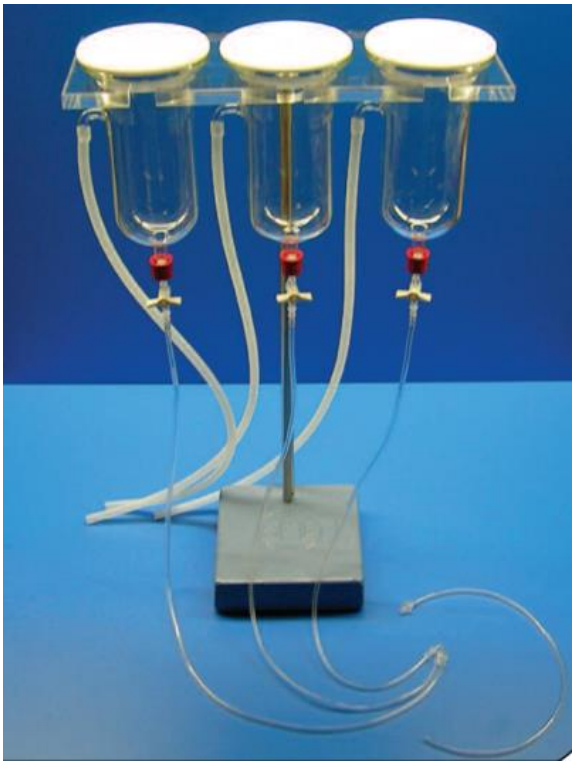


Figura 2-8. Camera de perfuzie hidrostatică pentru decelularizarea organelor și țesuturilor - HPC-3 *(după Harvard Apparatus) [60].*

BUPT

Pentru a produce o presiune de perfuzie hidrostatică necesară, acest dispozitiv este realizat din trei vase independente de sticlă, așezate pe un suport vertical robust. Reactivii pentru decelularizare pot fi de asemenea depozitați folosind dispozitivul sub presiune hidrostatică.

Fiecare cameră se deschide spre un sistem de tuburi contorsionate, care s-ar putea conecta la un organ. Aceste tuburi sunt construite din sticlă neîncălzită și au capace din teflon, care sunt complet autoclavabile pentru curățare și sterilizare simplă.

Acest dispozitiv permite decelularizarea convenabilă, la scară mică, a țesutului.

Harvard Apparatus: ORCA – a dezvoltat bioreactorul de control și achiziție de organe în 2013 [61].

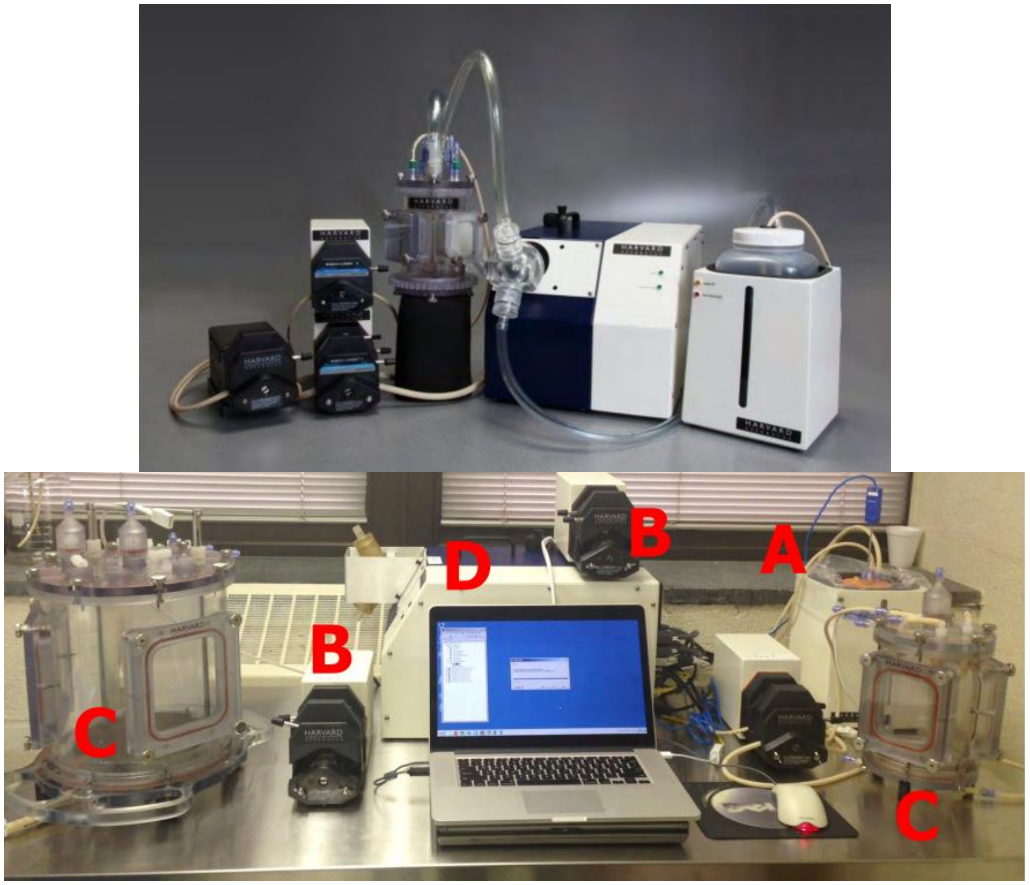


Figura 2-9. Bioreactor de regenerare și achiziție de organe a aparatului Harvard, (A) rezervor de încălzire și sistem de control al temperaturii, (B) pompe peristaltice, (C) camera organelor, (D) pompă pulsatilă *(după Harvard Apparatus) [61].*

BUPT

Acest echipament poate face față cerințelor de decelularizare și recelularizare pentru organele de diferite dimensiuni. Algoritmii de control care reglează debitele, profilurile și presiunile pot simula condițiile fiziologice.

Dispozitivul dispune de o platformă, ce conține mai multe camere de volum interschimbabile, care pot fi autoclavate. Contoarele de presiune, pH și debit sunt doar câțiva dintre senzorii integrați în acest bioreactor pe bază de perfuzie, care sunt utilizați pentru a monitoriza funcționarea. Un sistem de stocare a metodelor facilitează reproducerea metodelor și condițiilor în mai multe experimente. Capturile de imagini în timp real preluate de la camerele de monitorizare vizibile, IR, UV și fluorescență sunt posibile folosind un algortim software.

Acest bioreactor este unul dintre puținele disponibile până acum pe piață. Acesta a fost creat în scopul decelularizării și recelularizării de organe, dar se pare că activitatea sa a fost întreruptă, iar informațiile și resursele despre acest echipament sunt greu de găsit.

2.4 Lipsa standardelor pentru caracterizările materialelor decelularizate

Unul dintre considerentele cu care se confruntă procesul de decelularizare este lipsa standardelor universale pentru a evalua finalizarea decelularizării sau dacă un organ a fost decelularizat adecvat.

Complicațiile de a decide asupra unui standard s-ar putea datora diferitelor tipuri de organe și conținutului lor de ADN și țesut. Cantitatea de ADN din produsul decelularizat, servește drept criteriu principal de evaluare. Cantitatea de ADN rămasă în matricea extracelulară decelularizată poate fi măsurată prin colorare sau prin măsurarea lungimii reziduale.

Cele mai multe dintre sistemele folosite până acum în cercetare utilizează metode specializate și au o cantitate mică de bioreactoare, care sunt folosite exclusiv pentru decelularizare. La momentul actual, pe piață sunt doar câteva disponibile.

Diverse echipe de cercetare folosesc în prezent diverse metode pentru a evalua matricea extracelulară decelularizată. Spre deosebire de Price și colaboratorii săi, care utilizează un set diferit de colorații, imunofluorescență, teste ADN și imagistică pentru a evalua eficiența sistemului lor, Streucker și colegii acestuia folosesc analize histologice, analize macroscopice, evaluări biochimice și scanări CT.

În plus, față de evaluarea conținutului de ADN menționată mai sus, **Phillip** și echipa sa recomandă utilizarea următoarelor metode suplimentare:

- analiza histologică a componentelor ECM;
- analiza ultrastructurii;
- analiza cantitativă a conținutului de colagen și glicozaminoglicani;
- analiza proprietăților biomecanice [62].

Pentru a dezvolta un set de standarde și recomandări pentru utilizarea în siguranță a matricei extracelulare decelularizate, este de dorit să se ia în considerare aceste metode de evaluare.

BUPT

3. PROIECTAREA ȘI REALIZAREA UNUI DISPOZITIV EXPERIMENTAL FOLOSIT PENTRU DECELULARIZAREA INIMILOR DE ȘOBOLAN

Procesul de decelularizare poate oferi o platformă de țesut și organ acelular pentru regenerarea organelor și țesuturilor, care poate fi mai departe utilizată în repopularea cu celulele autologe. Cu toate acestea, compromisul care apare în acest proces se face între menținerea integrității biomecanice și eliminarea celulelor imunologe.

Obținerea biomatricilor ridică probleme atât pentru medic, dar și pentru inginerul biomedical, deoarece la ora actuală nu există un protocol de decelularizare standardizat și foarte bine optimizat. Toate protocoalele aplicate permit un grad avansat de decelularizare, dar produc și distrugeri în general reduse, care desigur se vor repercuta asupra calității viitorului organ ce urmează a fi transplantat. În acest fel, se evită fenomenele imune, care se știu că pot fi foarte severe și de cele mai multe ori necesită terapii cu medicamente agresive, care au serioase efecte secundare și în final pot duce la stări morbide sau chiar la decesul pacientului.

În prezent interesul pentru ingineria tisulară este foarte mare, medicina regenerativă fiind domeniul cel mai important de utilizare a acesteia.

Mulți cercetători din acest domeniu utilizează diverse dispozitive, care folosesc mai multe metode eficiente pentru acest proces de decelularizare, dar cu costuri ridicate.

3.1 Obiective generale propuse

La ora actuală, pe plan mondial, cercetarea vizează aspectele descrise în primul și cel de-al doilea capitol, inginerului biomedical revenindu-i sarcina de a optimiza echipamentele atât din punct de vedere hardware, dar și software pentru atingerea dezideratului prezentat.

În cadrul acestei cercetări au fost propuse mai multe obiective generale ce au ca scop procesul de decelularizare a inimilor de șobolan și găsirea unei căi de automatizare a acesteia.

Primul obiectiv reprezintă dezvoltarea, calibrarea și testarea unui dispozitiv experimental de tip Langendoff, controlat în presiune, care să fie folosit pentru decelularizarea inimii de șobolan. Pentru validarea metodei de decelurizare alese, respectiv a dispozitivului creat se va utiliza o metodă spectofotometrică pentru evaluarea evoluției procesului de decelularizare.

Deoarece decelularizarea este un proces în general de lungă durată, care necesită în prezent o mulțime de operațiuni manuale și supraveghere, scopul principal este de a proiecta un sistem automatizat pentru întregul proces de decelularizare, astfel încât să elimine colectarea de probe pentru metoda

BUPT

spectrofotometriei alese. Pentru îndeplinirea acestui scop se va realiza un dispozitiv experimental complex, de tip Langendorff pentru obținerea biomatricilor cardiace prevăzut cu un sistem de achiziție, prelucrare și analiză a imaginilor biomedicale obținute în cursul aplicării diverselor protocoale experimentale de decelularizare prin algoritmi matematici complecși.

Studiile realizate în acest domeniu vor prezenta optimizarea și validarea algoritmilor și metodelor propuse folosind într-o primă etapă inimi simulate, ce conțin colorant pentru a simula inima reală. Mai departe se vor folosi studii comparative de spectrofotometrie în ultraviolet, pentru determinarea momentului în care decolorarea este completă. Procesul de decolorare completă echivalând cu decelularizarea completă.

Un alt obiectiv luat în considerare este îmbunătățirea și optimizarea întregului dispozitiv experimental, de tip Langendorff controlat în presiune și prevăzut cu o coloană vibrantă de fluid, care scade timpul de decelularizare prin efectul mecanic aplicat direct asupra membranelor celulare.

În final, folosind dipozitivul experimental astfel conceput, se vor efectua experimente de control, cât și folosind coloana de fluid vibrator, utilizând diverse protocoale de decelularizare pentru inimile reale, recoltate de la șobolani. Metodele folosite, echipamentul realizat, materialele software, aparatele utilizate și modificările aduse de-a lungul experimentelor vor fi utilizate pentru a confirma și valida rezultatele obținute.

Această cercetare se realizează exclusiv între Facultarea de Electronică, Telecomunicații și Tehnologii Informaționale, Departamentul de Măsurări și Electronică Optică al Universității Politehnica Timișoara și Institutul de Cercetare OncoGen, din Timișoara.

3.2 Determinări folosind metoda spectrofotometriei în ultraviolet folosind NanoDrop ND-1000

Din experiență s-a constatat că amploarea distrugerilor în aplicarea protocoalelor experimentale folosite ce permit un grad avansat de decelularizare este proporțională cu durata de timp în care agentul decelularizant acționează asupra organului supus procesului. Prin urmare, inginerul biomedical va trebui să dezvolte un algoritm pentru identificarea momentului optim în care procesul de decelularizare să fie oprit (numărul de celule proprii restante minim, respectiv distrugeri minimale ale arhitecturii organului).

La ora actuală acest deziderat nu este atins deoarece deși se cunosc variate metode pentru cuantificarea evoluției procesului de decelularizare, majoritatea acestora nu sunt realizate în timp real (metode spectofotometrice, metode histologice, diverse tipuri de scanări 3D).

În această lucrare pentru validarea obiectivelor propuse se va folosi un spectrofotometru de volume foarte mici NanoDrop ND-1000.

Acest instrument are un spectru complet (220 nm – 750 nm) și utilizează o tehnologie de reținere a probei, care folosește numai tensiunea superficială pentru a menține proba pe loc [63].

BUPT

Fără a fi nevoie de reactivi suplimentari, dispozitivul efectuează măsurările direct pentru numeroase module de aplicație. Rezultatele obținute în acest mod sunt afișate în ng/µl pentru acizii nucleici, iar pentru proteine în mg/ml.

Ca și mod de lucru, este folosită o micropipetă automată pentru pipetarea probelor folosite pentru măsurare. Un volum mic de eșantion (1 µl) este pipetat cu precizie la capătul receptor al unui cablu de fibră optică, în timp ce un al doilea cablu de fibră optică (sursa) face contact direct cu proba lichidă.

Măsurările spectrale vor fi efectuate cu ajutorul programului software de operare (UV-VIS) de pe un calculator și a probei lichide, care va creea o punte între cele două capete ale fibrei optice.

Acest dispozitiv se bazează pe legea Lambert-Beer a absorbției moleculare, care specifică legătura dintre absorbanță, grosimea stratului absorbant al soluției și concentrația speciilor absorbante. În conformitate cu aceasta, absorbanța unei soluții crește liniar atât cu concentrația de specii absorbante prezente în soluție, cât și cu grosimea cuvei. Doar atunci când grosimea cuvei este constantă, absorbanța depinde liniar de concentrație [64].

Informațiile pe care dispozitivul le citește și le afișează pentru fiecare pas sau măsurare efectuată vor fi înregistrate într-un fișier arhivă pe calculator [63].

Pentru a reduce posibilitatea de a efectua măsurări eronate, precum și pentru a preveni acumularea de reziduuri și contaminarea probelor, se recomandă ștergerea soclului superior și a soclului inferior (suprafața optică a instrumentului) utilizate pentru citirea valorilor, cu apă deionizată, ultrapură după fiecare citire a valorilor probelor colectate.



Figura 3-1. Spectrofotometru NanoDrop ND-1000.

BUPT

4. PROIECTAREA ȘI REALIZAREA UNUI DISPOZITIV LANGENDORFF MODIFICAT PENTRU DECELULARIZAREA INIMII DE ȘOBOLAN

4.1 Scopul studiului

Pentru regenerarea organelor și țesuturilor, procesul de decelularizare poate oferi o platformă de țesut și organ acelular. Cu toate acestea, compromisul care apare în acest proces este îndepărtarea celulelor imunologe și păstrarea integrității biomecanice.

În prezent interesul pentru ingineria tisulară este foarte mare, medicina regenerativă fiind domeniul cel mai important de utilizare a acesteia.

Mulți cercetători din acest domeniu utilizează diverse dispozitive, care folosesc mai multe metode eficiente pentru acest proces de decelularizare, dar cu costuri ridicate.

În aceste studii [65-67], scopul principal a fost proiectarea și realizarea unui dispozitiv experimental de tip Langendoff, controlat în presiune, care să fie folosit pentru decelularizarea inimii de șobolan. Acest dispozitiv a fost dezvoltat cu un cost cât mai mic posibil, versatil și ușor de utilizat, capabil să decelularizeze orice inimă de șobolan.

Procesul de decelularizare a fost realizat folosind un protocol de perfuzie pe bază de detergent ionic. Această substanţă tensioactivă, SDS este foarte des folosit în acest moment în vederea obținerii biomatricilor cardiace. Această biomatrice cardiacă este constituită ca fiind un construct tridimensional realizat prin conservarea matricii conjunctive a miocardului [68, 69].

Calitatea acestor biomateriale se poate îmbunătăţi în vederea populării lor ulterioare *in vitro* cu celule derivate din celulele stem autologe, fiind asigurate astfel premisele obţinerii unor organe cu o bună capacitate funcţională.

Dispozitivul experimental realizat este format din două părți constructive. Prima parte este consituită din ansamblul hidraulic, care asigură prin intermediul unei pompe peristaltice și a unui traductor de presiune, perfuzia retrogradă prin aortă a cordului în regim presional constant. Ce de-a doua parte este realizată ca parte electronică de comandă a pompei peristaltice și reprezintă regulatorul dispozitivului experimental.

Soluția de decelularizare este recirculată pe parcursul acestui proces fizico-chimic, astfel încât folosind determinări spectrofotometrice seriate a concentrației de acid dezoxiribonucleic și proteine din această soluție să se poată determina cinetica decelularizării, respectiv momentul în care acesta este finalizată.

BUPT

4.2 Descrierea dispozitivului experimental

Dispozitivul experimental respectă principiul descris de Langendorff și din punct de vedere funcțional este un dispozitiv cu presiune controlată.

Acest dispozitiv menține presiunea constantă de perfuzie coronariană prin variația vitezei minime a volumului soluției de decelularizare care intră în aortă [70-73].

În figura 4-1. A se poate observa dispozitivul experimental în ansamblu, iar în figura 4-1. B diagrama bloc a acesteia [65-67].

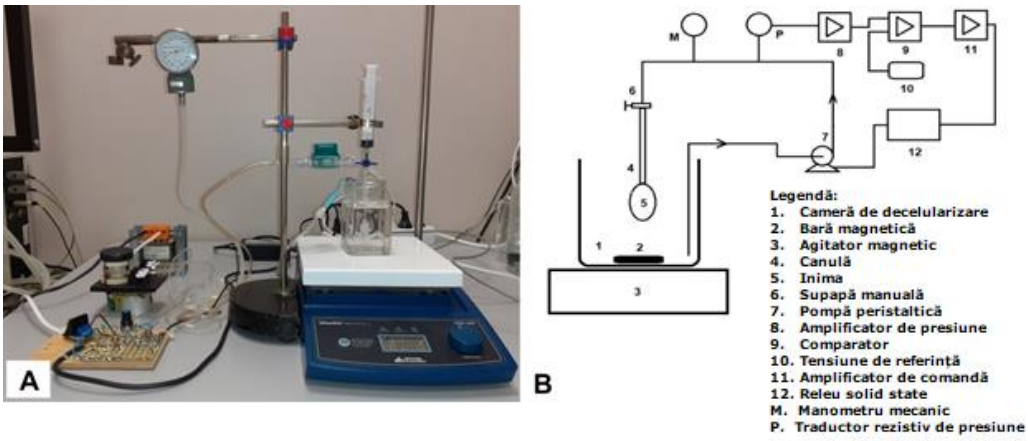


Figura 4-1. A. Dispozitiv experimental. B. Diagrama bloc *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [65].*

Camera de decelularizare (figura 4-1. B.1) este realizată din material plastic cu volumul de 100 de cm^3 și este concepută pentru a permite introducerea inimii (figura 4-1. B.5) pregătită pentru decelularizare. Aceasta este fixată de vârful unei canule speciale (AD Instruments) (figura 4-1. B.4).

Această cameră conține soluția de decelularizare: SDS 1% omogenizată în timpul experimentelor cu ajutorul unui agitator magnetic (figura 4-1. B.2 și B.3). Cu ajutorul acestuia compoziția soluției este constantă în orice punct al camerei la un moment dat, permițând astfel colectarea de probe pentru determinări biochimice.

Soluția de decelularizare este aspirată din camera de decelularizare și reintrodusă în inimă prin canulă de către pompa peristaltică (figura 4-1. B.7). Un transformator de rețea (230V/50Hz) asigură alimentarea acesteia. Secundarul acestui transformator coborâtor de tensiune asigură o tensiune de 24 VAC necesară pentru funcționarea motorului pompei peristaltice.

Canula este prevăzută cu o supapă manuală (figura 4-1. B.6), care este utilizată pentru umplerea inițială a circuitului hidraulic al dispozitivului experimental și eliminarea oricăror bule de aer.

Traductorul de presiune rezistiv (figura 4-1. B.P) monitorizează permanent presiunea de perfuzie a inimii, care este presiunea de pe ramura de refulare a

BUPT

pompei peristaltice. În plus, cercetătorul o poate citi de pe manometrul mecanic atașat dispozitivului (figura 4-1. B.M).

4.3 Componentele sistemului

Sistemul de automatizare controlează funcționarea pompei peristaltice și reunește următoarele module: amplificatorul de presiune (figura 4-1. B.8), modulul comparator (figura 4-1. B.9), amplificatorul de comandă (figura 4-1. B.11), releul solid state (figura 4-1. B.12).

Schema electronică a acestui dispozitiv experimental este ilustrată în figura de mai jos [74, 75].

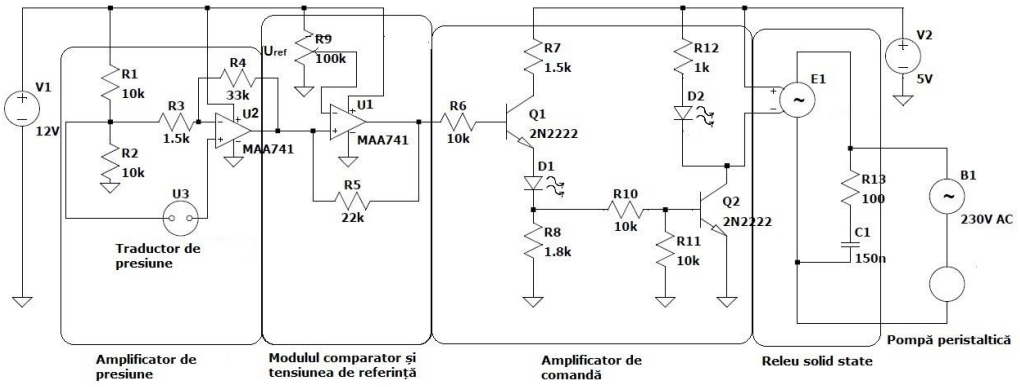


Figura 4-2. Schema electronică a dispozitivului experimental *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [67].*

Semnalul generat de traductorul de presiune rezistiv (figura 4-2. U3) este convertit într-un semnal electric (tensiune) de către amplificatorul de presiune (figura 4-2. U2). La cei doi pini (figura 4-2. U3) din schema electronică este conectat acest semnal. Domeniul de valori posibile pentru acesta este cuprins în intervalul 0,1÷1V.

Modulul comparator (figura 4-2. U1) primește atât semnalul amplificat de la traductorul de presiune, cât și o tensiune de referință ce poate fi reglată de cercetător de la un potențiometru. Acesta are rolul de a introduce o marjă asumată de eroare (histerezis), cu scopul de împiedica numărul de opriri sau de porniri repetate în intervale scurte de timp ale pompei peristaltice, ca urmare a oricăror zgomote ce pot apărea pe liniile tensiunilor de intrare. Scara sa este clasificată direct în mmHg, necesară măsurării presiunii sângelui, de la nivelul inimii.

Amplificatorul de comandă, realizat cu ajutorul tranzistoarelor 2N2222, de tip npn (figura 4-2. Q1 și Q2), are rolul de a amplifica ieșirea modulului de comparație și este conectat la intrarea releului Solid State (figura 4-2. E1).

Relelul Solid State cu triac este folosit pentru a controla funcția pompei peristaltice.

S-a preferat utilizarea acestui tip de releu, deoarece comparativ cu releele electromecanice acestea au o durată de funcționare/ciclu de viață mult mai mare. Pe

BUPT

lângă acest avantaj major, acesta prezintă o funcționare silențioasă, dar și o comutare mult mai rapidă, deoarece nu mai există contacte în mișcare, ci această comutare se realizează folosind lumina infraroșu drept ”contact”.

La comutarea unei sarcini inductive (în acest caz transformatorul coborâtor de tensiune utilizat pentru acționarea motorului pompei peristaltice – figura 4-3.B) se recomandă în foaia de catalog a acestui releu solid state, utilizarea unui circuit de amortizare pentru protecția la supratensiune a releului Solid State. Comutarea acestei sarcini inductive, determină ca tensiunea să se schimbe brusc (tranziție de tensiune), atunci când sarcina este cuplată sau decuplată și astfel poate avea ca rezultat defectarea circuitului integrat, datorită apariției vârfurilor de tensiune tranzitorii (supratensiuni). În acest circuit este folosit acest filtru realizat cu cele 2 componente pasive, RC (figura 4-2. R13, C1).

Schema realizată și descrisă mai sus a fost realizată pe o placă de test, aceasta fiind prototipul funcțional utilizat în testele realizate din cadrul centrului de cercetare OncoGen din Timișoara.

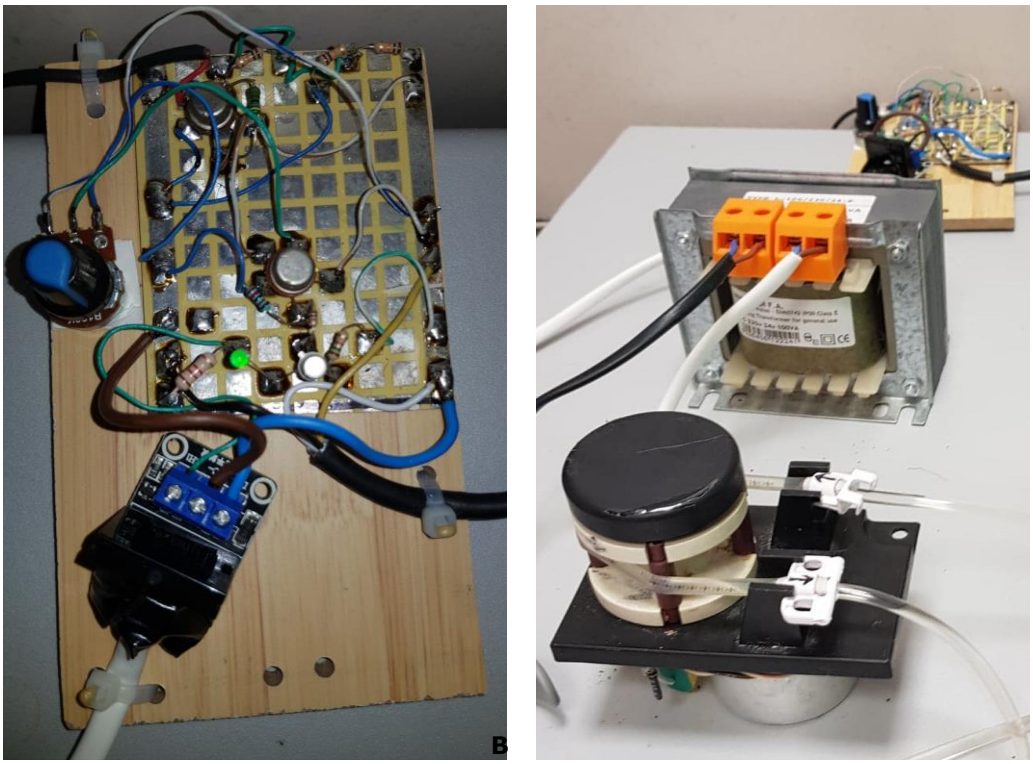


Figura 4-3. A. Circuitul funcțional. B. Partea electronică a dispozitivului.

BUPT

4.4 Protocol experimental

O primă validare și testare a acestui dispozitiv experimental a fost efectuată decelularizând inimile a cinci șobolani Sprague Dawley. Aceștia au avut o greutate cuprinsă între 350 și 400 g.

Inimile acestor șobolani au fost îndepărtate în conformitate cu legislația internațională (Ghidul pentru Îngrijirea și Utilizarea Animalelor de Laborator publicat de Institutul Național de Sănătate nr.85-23) și recomandările Comisiei de Etică a UMF „V Babeș" Timișoara.

În toate cazurile s-a folosit anestezia generală (VIMA) cu sevofluran, s-a efectuat inducția cu sevofluran 8% în oxigen într-o cameră specială, iar întreținerea s-a efectuat cu sevofluran 3,5% printr-o mască facială pentru șobolani până când inima a fost excizată.

În prima etapă se îndepărtează de pe întreaga zonă abdomino-toracică pilozitatea și se deschide cavitatea abdominală și se injectează heparina sodică în vena cavă inferioară 100 UI/Kg (figura 4-4).

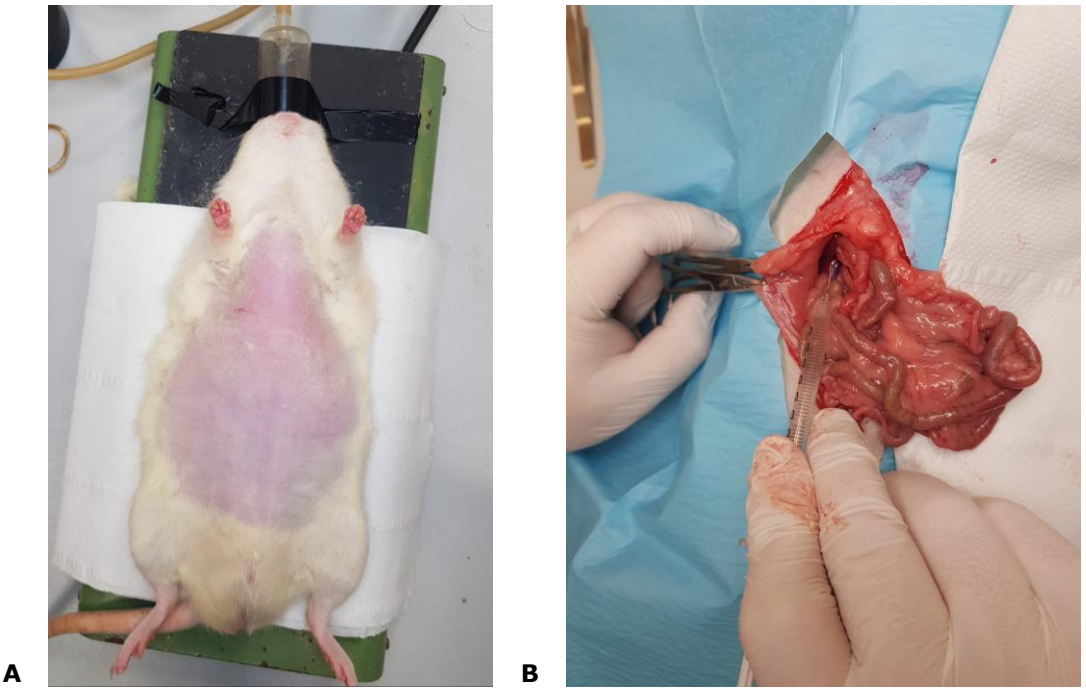
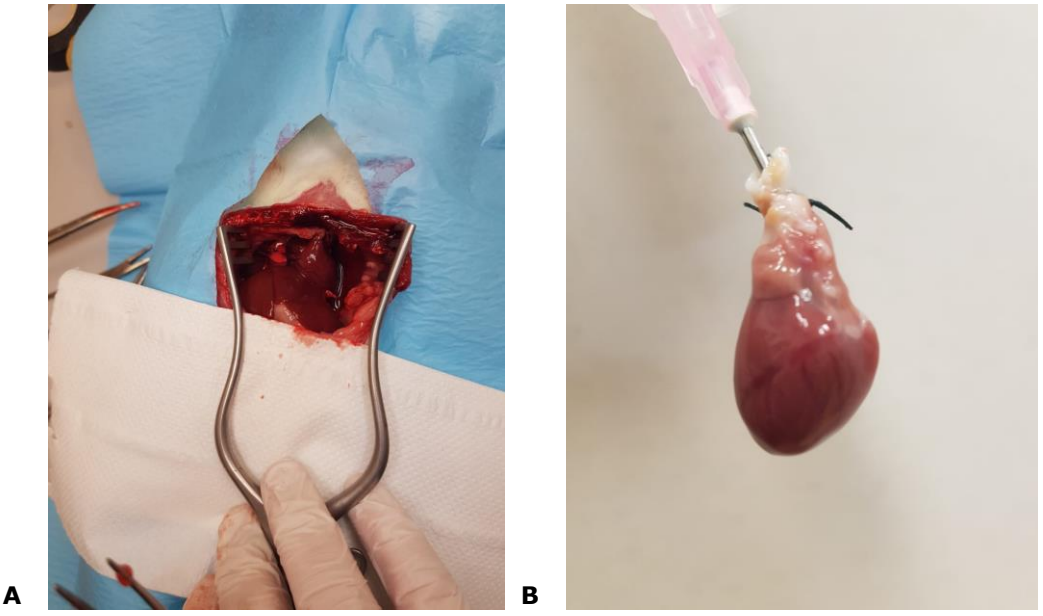


Figura 4-4. Îndepărtarea pilozității (A) și injectarea heparinei animalului (B).

După 4-5 minute, cavitatea toracică se deschide prin tăierea coastelor (figura 4-5. A) și inima se excizează rapid cu un fragment cât aorta (figura 4-5. B). Se introduce într-o cutie Petri cu o soluție rece de clorură de sodiu fiziologică heparinizată și se continuă disecția până când cordonul și un fragment de aortă de aproximativ 1 cm lungime sunt perfect izolate [76-78].

BUPT

În etapa următoare, inima astfel prelucrată, se fixează cu un fir chirurgical de mătase pe canula dispozitivului de tip Langendorff și se infuzează timp de 600 de minute cu o soluție SDS 1,5% [78]. Volumul soluției din dispozitiv a fost de 120 cm^3.



A B

Figura 4-5. Extracția inimii – deschiderea cavității toracice (A) și fixarea cordului pe canula dispozitivului de decelularizare (B).

La intervale de 30 min, au fost prelevate probe de 30 µl pentru a determina concentrația de acizi nucleici și proteine în soluția de decelularizare.

Aceste determinări au fost efectuate folosind metoda spectrofotometrică în ultraviolet. Proteinele au o absorbție maximă la 280 nm la pH neutru. Acizii nucleici în aceleași condiții au o absorbție maximă la 230 nm, astfel încât cei doi analiți pot fi determinați simultan fără separarea lor [79, 80].

4.5 Rezultate și discuții

După prelucrarea datelor experimentale, s-a putut stabili momentul final al decelularizării, considerat ca fiind momentul în care concentrația celor doi analiți determinați a devenit constantă.

Această abordare de stabilire a punctului de timp final al procesului de decelularizare este importantă pentru asigurarea unor rezultate consistente și fiabile în experimentele de cercetare din domeniul ingineriei tisulare.

Figura 4-6 prezintă grafic valorile medii ale concentrației de acid dezoxiribonucleic și respectiv a concentrației de proteine pentru cele cinci experimente efectuate.

BUPT

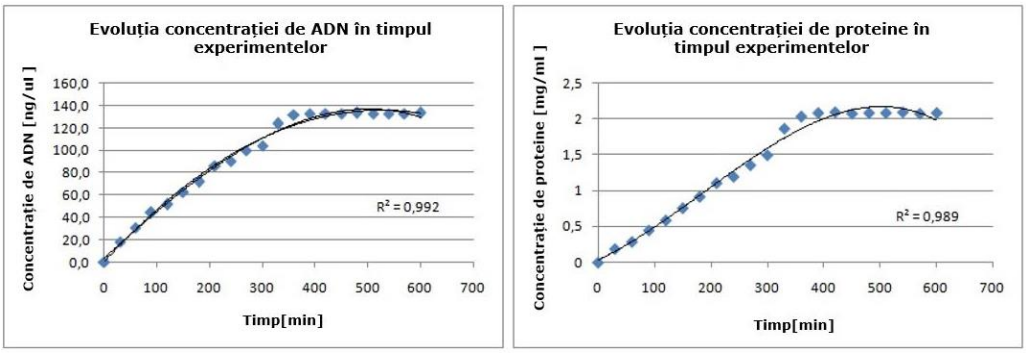


Figura 4-6. Evoluția concentrației de ADN și proteine în timpul decelularizării inimii (valori mediane) *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [65].*

Următoarele ecuații polinomiale de ordinul 3 (coeficient de corelație, R^2 > 0,95 în ambele cazuri) descriu foarte de bine creșterea concentrației celor doi analiți.

Putem afirma că, în circumstanțele date, aceste ecuații sunt valabile pentru fiecare experiment care implică decelularizarea inimii de șobolan.

$$C_{DNA}\ [ng/\mu l] = -4 \cdot 10^{-0,7} \cdot t^3 + -0,000 \cdot t^2 + 0,439 \cdot t + 3,007 \quad (1)$$

$$C_{Protein}\ [mg/ml] = -2 \cdot 10^{-0,8} \cdot t^3 + 10\text{-}0,5 \cdot t^2 + 0,003 \cdot t + 0,024 \quad (2)$$

Se poate observa că decelularizarea poate fi considerată finalizată la minutul 400 deoarece concentrația ambilor analiți atinge un maxim stabil, conform interpretării datelor experimentale.

Imaginea de mai jos ilustrează inima de la începutul experimentului (figura 4-7. A), precum și imaginea cu inima când procesul de decelularizare s-a încheiat (figura 4-7. B).

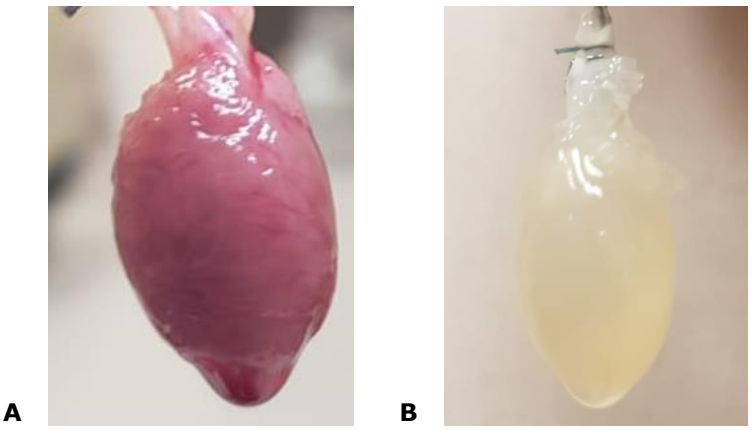


Figura 4-7. Inima înainte de decelularizare (A) și după decelularizare (B).

BUPT

4.6 Concluzii

Acest dispozitiv Langendorff modificat este aplicabil pentru inimile întregi de șobolan prin îndepărtarea conținutului celular și a ADN-ului. Matricea tridimensională rezultată oferă un instrument interesant pentru studiile viitoare din domeniul ingineriei tisulare.

Dispozitivul experimental propus și metoda prezentată sunt potrivite pentru decelularizarea inimii de șobolan în vederea obținerii de biomateriale, care pot fi apoi repopulate cu celule musculare cardiace autologe obținute prin diferențierea *in vitro* a celulelor stem mezenchimale.

4.7 Sumarul contribuțiilor

În acest capitol unul dintre obiective a fost atins și anume s-a putut concepe, realiza, calibra și testa un dispozitiv experimental de tip Langendoff, controlat în presiune, care să fie folosit pentru decelularizarea inimii de șobolan.

Aplicând suportul teoretic descris în capitolele 1 și 2 și folosind un protocol experimental de decelularizare pe inimi reale, cu o soluție tensioactivă, s-a reușit confirmarea primelor rezultate de decelularizare în acest domeniu al ingineriei tisulare.

Pornind de la stabilirea specificațiilor și nevoilor acestui proiect, am realizat schema bloc aferentă dispozitivului experimental folosit pentru decelularizarea inimilor de șobolan. Acesta este constituit din două părți constructive, prima parte este reprezentată de ansamblul hidraulic, iar cea de-a doua parte este formată din modulul hardware.

S-au prezentat componentele acestui sistem, am realizat schema electronică și am conceput necesarul de componente utilizate.

S-a realizat primul prototip, și deasemenea s-a testat funcționalitatea lui. Primele teste de decelularizare a inimilor de șobolan au constituit calibrarea dispozitivului, care a implicat un cuantum mare de ore folosite pentru acest proces de decelularizare de lungă durată.

În cele din urmă, după ce calibrarea a fost validată, s-a folosit un protocol experimental de decelularizare pentru cinci șobolani Sprague Dawley, utilizând o substanţă tensioactivă, dodecil-sulfat de sodiu, care este foarte des folosit în acest moment în procesele de decelularizare.

Durata unui astfel de protocol experimental a fost în medie 600 de minute. Pentru determinarea momentului optim de decelularizare, s-au prelevat probe la intervale orare egale și am folosit un spectrofotometru de volume foarte mici pentru a analiza datele experimentale.

Pe baza acestor informații, s-a observat că după 400 de minute, decelularizarea poate fi considerată finalizată, deoarece concentrația acidului dezoxiribonucleic și concentrația de proteine atinge un maxim stabil.

În concluzie, se poate afirma că dispozitivul experimental dezvoltat este adecvat pentru decelularizarea inimilor de șobolan și poate fi utilizat în viitoarele studii pentru automatizarea întregului proces, inclusiv pentru determinarea automată a momentului final al decelularizării inimii.

BUPT

5. PROIECTAREA UNUI SISTEM AUTOMATIZAT PENTRU PROCESUL DE DECELULARIZARE A INIMII DE ȘOBOLAN

5.1 Crearea aplicației software de achiziție, prelucrare și analiză a imaginilor biomedicale

Sistemul ideal de decelularizare ar trebui să producă o structură tridimensională a biomatricei, complet decelularizată cu eficiență și nivel de precizie maxime. Îmbunătățirea și dezvoltarea ulterioară, ar dovedi un avantaj semnificativ, în vederea succesului general al sistemului implementat.

Mai precis, această abordare ar putea, la rândul său, să faciliteze și dezvoltarea unor aplicații complexe și extrem de utile pentru medicina regenerativă.

Deoarece informațiile și resursele privind sistemele de decelularizare automată bazate pe componente hardware și/sau software sunt cu surse închise, brevetate, iar unele sunt greu de obținut, obiectivul cercetării actuale este de a dezvolta și valida un sistem de decelularizare automatizat cu sursă deschisă, care este, de asemenea, accesibil și pentru adoptarea și îmbunătățirea acestuia în alte studii de cercetare științifică

5.1.1 Scopul studiului

Etapa intermediară pentru automatizarea procesului de decelularizare este dezvoltarea unui dispozitiv experimental complex, de tip Langendorff pentru obținerea biomatricilor cardiace prevăzut cu un sistem de achiziție, prelucrare și analiză a imaginilor biomedicale obținute în cursul aplicării diverselor protocoale experimentale de decelularizare.

Acest studiu pilot va implementa un balon de latex, care simulează o inimă în care inițial se va introduce un colorant.

Cu ajutorul unui injectomat de uz clinic se va pompa apă distilată cu un debit controlat, așa că, în cele din urmă, acest colorant se va înlocui cu apă distilată.

Perspectiva acestei idei este echivalentă procesului de decelularizare completă a unei inimi reale cu decolorarea completă a inimii simulate.

Cu acest model, ne propunem validarea aplicației software prin detectarea automată a momentului în care inima simulată se va decolora complet și la final va opri întregul sistem.

BUPT

5.1.2 Obiectivele generale propuse

Pe baza cerințelor acumulate, pentru testarea și validarea software-ului, a fost luată în considerare o modalitate de simulare a procesului de decelularizare, cu un cost redus, pentru a evita sacrificarea inimilor reale preluate de la șobolani.

Ca rezultat, folosind această metodă, inima simulată conferă opacitatea unei inimi reale și permite ca algoritmul software să fie testat și modificat în timp real, permițând repetarea procesului după orice erori, care ar putea apărea sau îmbunătățirea acestora cu fiecare rulare de testare pentru a îndeplini cerințele și a fi pregătit pentru utilizarea în mediul real.

Această aplicație software preliminară, ce se va folosi în decelularizarea automată pentru inima de șobolan, presupune utilizarea unei camere video cu ajutorul căreia utilizatorul să poată vizualiza în timp real și poziționa inima în camera de decelularizare.

Scopul principal al utilizării acesteia este în special pentru achiziția de imagini pentru inimile simulate ce conțin colorant.

Pentru interacțiunea cu utilizatorul, aplicația software trebuie să conțină o interfață cu utilizatorul, în cadrul căreia să se poată observa în timp real acțiunile efectuate din fața camerei video. Totodată, aceasta trebuie să permită utilizatorului introducerea intervalului de timp pentru care se va realiza achiziționarea imaginilor, dar și posibilitatea de selectare a unei zone în care se regăsește inima pentru prelucrarea și analiza ulterioară a imaginilor achiziționate.

Pentru începerea procesului de achiziție, prelucrare și analiză a imaginilor biomedicale, un buton de Start trebuie implementat.

Imaginile achiziționate, dar și imaginile prelucrate vor trebui stocate intern pe sistemul conceput și utilizat. Datele colectate și rezultate din prelucrarea imaginilor vor trebui stocate și reprezentate grafic pentru vizualizarea evoluției colorantului din inima simulată.

5.1.3 Descrierea dispozitivului experimental

Automatizarea procesului de decelularizare presupune dezvoltarea unui dispozitiv experimental complex, care reunește cele două componene esențiale, partea fizică a sistemului (implementarea hardware), precum și partea logică (implementarea software).

5.1.4 Implementare Hardware

Acest dispozitiv experimental a fost creat pentru a valida aplicația software, care va permite obținerea biomaterialelor cardiace prevăzute cu un sistem de achiziție, procesare și analiză a imaginilor biomedicale [81].

Schema bloc aferentă acestui sistem de automatizare este ilustrată în figura următoare.

BUPT

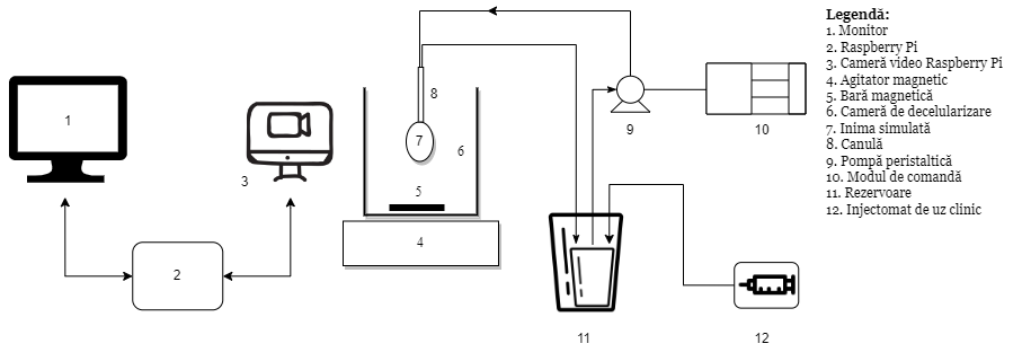


Figura 5-1. Schema bloc a sistemului *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].*

Un balon din latex, care simulează inima, a fost folosit pentru a valida această aplicație. Inițial, inima simulată (figura 5-1. 7) este introdusă în camera de decelularizare (figura 5-1. 6). Această inimă conține colorantul Azocarmin B în cantitate suficientă, astfel încât să îi confere opacitatea unei inimi reale.

Această cameră de decelularizare va conține de această dată apă distilată și omogenizată în timpul experimentelor cu ajutorul unui agitator magnetic (figura 5-1. 4 și 5) pentru a menține aceeași factori biologici ca și în cazul real.

Utilizând un injectomat de uz clinic (figura 5-1. 12) este introdusă apă distilată cu un debit constant setat de către cercetător, pentru a simula procesul de decelularizare a unei inimi reale. Astfel, în cele 2 rezervoare de dimeniuni diferite (figura 5-1. 11), colorantul, care este diluat treptat cu debitul de apă distilată ales, este aspirat de către pompa peristaltică (figura 5-1. 9) și introdusă în inima simulată.

Pompa peristaltică este comandată de modulul electronic de comandă (figura 5-1. 10), descris în capitolul 4.

Treptat, se va obține un gradient de culoare, care simulează foarte bine procesul de decelularizare al unei inimi adevărate, decolorarea completă echivalând cu decelularizarea completă.

Cu acest sistem se dorește simularea inimii și validarea sistemului de achiziție, procesare și analiză a imaginilor biomedicale, pentru ca ulterior să se poată folosi pentru a analiza evoluția procesului de decelularizare în cazul oricărei inimi supuse acestei proceduri.

Pentru automatizarea procesului de decelularizare, s-a utilizat o placă de tip SBC, denumită Raspberry Pi. Aceasta este produsă în UK de către Raspberry Pi Foundation. Placa Raspberry Pi reprezintă elementul de bază al noii arhitecturi hardware propuse în automatizarea acestui dispozitiv și este o alternativă accesibilă, cu costuri reduse, pentru înlocuirea unui PC. În comparație cu un PC, este mai lent, dar prezintă o serie de avantaje, cum ar fi: acces la o conexiune internet, implementare de jocuri video și audio educaționale, realizare de servere și automatizări folosind procesorul său puternic, cu un consum mic de energie.

BUPT

Configurația hardware pentru acest dispozitiv experimental implică conectarea părții de control la placa Raspberry Pi 3, model BCM2837 (figura 5-2. A), împreună cu modulul camerei video Raspberry (figura 5-2. B).

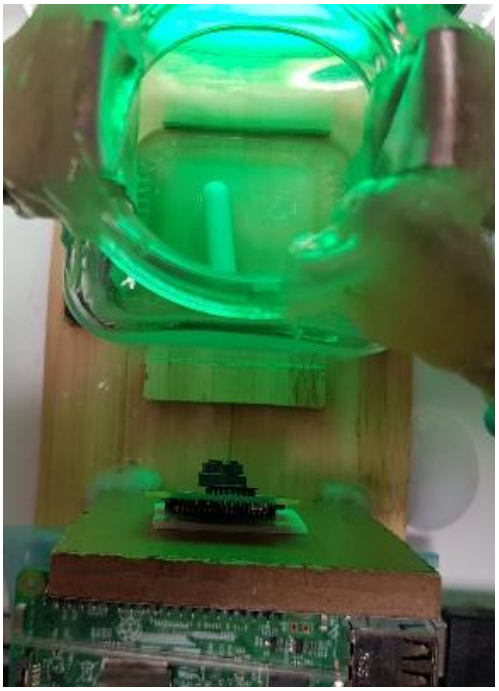
A  **B** 

Figura 5-2. Raspberry Pi 3, model BCM2837 (A) și Raspberry Pi camera (B) *(după D. D. Bonciog și colab.) [81].*

Partea experimentală a acestui ansamblu a fost realizată cu următoarele componente:

- Raspberry Pi 3, model BCM2837 și modulul camerei video Raspberry;
- sursă de alimentare Raspberry Pi;
- card micro SD de 64 GB folosit pentru sistemul de operare, dar și pentru stocarea de imagini;
- un monitor (figura 5-1. 1);
- un cablu HDMI-DVI folosit pentru conectarea monitorului la placa Raspberry Pi;
- tastatură;
- mouse.

În plus, se poate observa, că în fața camerei de decelularizare s-a utilizat un panou LED pătrat de culoare verde.

Se cunoaște faptul că cele două culori, roșu (culoarea mioglobinei din structura țesutului cardiac) și radiația de culoare verde emisă de sursa de lumină cu lungimea de undă aproximativ λ=530nm sunt absorbite puternic de către mioglobina (de culoare roșie) din țesutul cardiac. Astfel, se respectă legea de bază a fotometriei (Beer-Lambert) și se permite aproximarea semicantitativă a cineticii

BUPT

procesului de decelularizare. Legea Beer-Lambert susține că există o relație liniară între concentrația și absorbanța soluției și permite calcularea concentrației unei soluții prin măsurarea absorbanței acesteia [82].

În figura de mai jos se poate observa dispozitivul experimental în ansamblu.

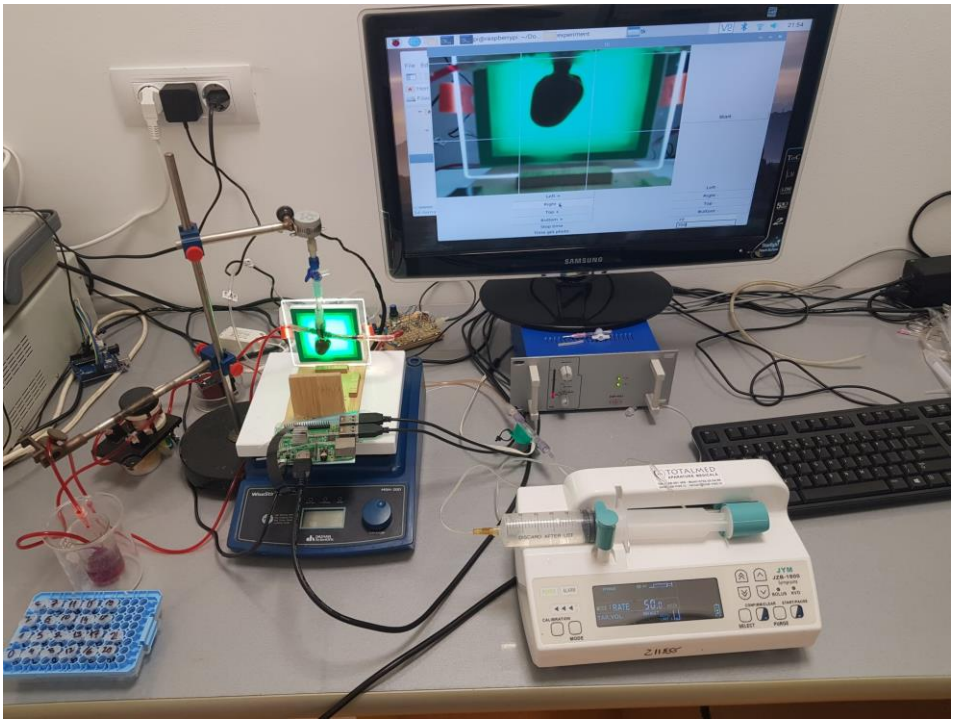


Figura 5-3. Dispozitivul experimental utilizat pentru automatizarea procesului de decelularizare *(după D. D. Bonciog și colab.) [87].*

5.1.5 Implementare Software

Aplicația software este construită folosind limbajul de programare Python.

În comparație cu alte limbaje grafice, precum LabVIEW, sarcina proiectantului software este cu mult simplificată și necesită mai puțin timp de dezvoltare în comparație cu Python, dar utilizarea limbajului LabView este permisă numai după plata unei licențe adecvate. Cu toate acestea, acest cost al licenței se poate modifica în funcție de tipul de sistem de operare utilizat pentru dezvoltarea aplicației. În schimb, este nevoie de mai mult timp pentru a crea noi aplicații folosind limbajul Python decât cu LabVIEW, deoarece Python este un limbaj de programare bazat pe text.

Cu toate acestea, Python este gratuit și portabil, permițând dezvoltatorilor de software să-l folosească în mai multe sisteme de operare fără a fi constrânși de cerințele de licență. De asemenea, este compatibil cu unele dispozitive SBC. În acest

caz aplicația software creată este rulată pe o placă Raspberry Pi, care acționează ca placă de control al arhitecturii hardware.

O gamă largă de pachete și biblioteci sunt, de asemenea, disponibile pentru Python, ceea ce facilitează procesul de dezvoltare. Datorită acestor proprietăți de optimizare, Python este ideal pentru proiecte și aplicații la scară largă.

Python este un limbaj de scriptare dinamic, ceea ce îl face mai puțin potrivit pentru scrierea de aplicații de la zero și este destinat în primul rând pentru conectarea diferitelor module de program. Interfețele dintre modulele de program și scripturi sunt clar definite, în timp ce modulele de program sunt create pentru a fi reutilizabile.

Aplicația software realizată pentru automatizarea sistemului folosit în procesul de decelularizare constă din două părți: interfața grafică și achiziția și procesarea imaginilor biomedicale.

Prima parte include pornirea camerei și afișarea imaginii în timp real.

Interfața cu utilizatorul permite vizualizarea în timp real a inimii, care conține colorantul. Această acțiune permite utilizatorului să poată încadra inima în camera de decelularizare.

Interfața grafică conține mai multe butoane și anume un buton de start pentru pornirea aplicației software situat în partea dreaptă și alte 8 butoane ce se vor utiliza pentru delimitarea zonei de interes în care vor fi procesate imaginile biomedicale achiziționate. Folosind aceste opt butoane (Left (Stânga) +/-, Right (Dreapta) +/-, Top (Sus) +/-, Bottom (Jos) +/-) utilizatorul delimitează o zonă, unde este încadrată doar inima pentru procesarea imaginilor, astfel încât precizia să fie una ridicată.

În figura 5-4 se poate observa inima simulată încadrată într-un chenar cu 4 linii albe. Acest chenar de delimitare a imaginii este marcat de către utilizator, la începul experimentului folosind cele opt butoane.

Interfața realizată mai conține încă două câmpuri, în care utilizatorul va introduce valorile dorite pentru fiecare experiment.

Primul parametru este denumit „time get photo” și permite utilizatorului setarea unui interval de timp în care să se achiziționeze imaginile. Această valoare va fi prelucrată în algoritmul matematic, în secunde, ca unitate de măsură utilizată.

Cel de-al doilea parametru este etichetat ca „stop-time”, și stabilește numărul de imagini achiziționate. Astfel, în figura 5-4 se poate observa că s-a ales valoarea 10, ceea ce înseamnă că experimentul se va opri automat când algoritmul software va detecta numărul ales de imagini (n=10), ca având aceleași valori.

Biblioteca „Tkinter” a fost folosită pentru a crea această interfață, iar metoda „cv2.line ()” din biblioteca „OpenCV” a fost folosită pentru a desena liniile. Tot din această bibliotecă, s-a folosit metoda „VideoCapture (0)”, pentru a realiza o captură video cu camera folosită.

Procesarea imaginilor constă din două procese, care rulează în paralel. Primul proces calculează valorile pentru grafic, iar al doilea va afișa graficul în timp real.

Biblioteca „Picamera” este folosită pentru procesarea imaginilor.

După achiziționarea unei imagini, se extrage zona de interes, care a fost conturată inițial de către cercetător în GUI și în care inima este încadrată. Această zonă va fi utilizată pentru procesarea pixelilor.

BUPT

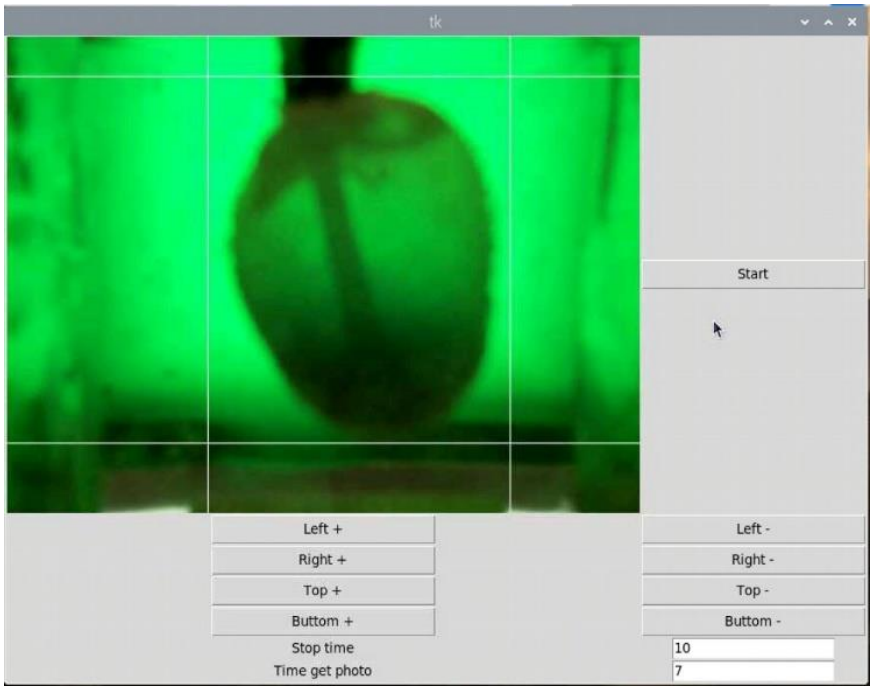


Figura 5-4. Interfața cu utilizatorul *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [81].*

Prelucrare zonei alese de cercetător constă în introducerea setării unei valori de referință, pentru una dintre nuanțele de negru.

Din experimentele repetate, s-a determinat valoarea de referință, astfel că această nuanță de culoare este aproximativ egală cu denumirea standard „night rider".

Următorul pas utilizat în algoritmul software, presupune determinarea numărului de pixeli, care s-au potrivit cu această nuanță de culoare. Zona astfel determinată, este mai departe colorată cu valorile standard pentru culoarea „negru".

În timpul experimentului, inima simulată va prezenta zone transparente, iar în final, va ajunge la o zonă exclusiv transparentă. Pe parcursul acestui proces, când inima simulată prezintă anumite zone transparente, acestea nu vor mai fi colorate cu culoarea neagră, astfel încât zona neagră/numărul maxim de pixeli de culoare neagră de la început, se va diminua treptat în timp, datorită înlocuirii colorantului de către debitul de apă introdus de injectomat.

Partea de inițializare implică detectarea valorii de referință, care este egală cu numărul maxim de pixeli din zona neagră pentru primele imagini. Aceasta este valoarea maximă calculată de către algoritmul software pentru inima supusă acestei proceduri.

Pe durata procesului, vor fi valori mai mici, astfel că, inițial valoarea maximă a numărului de pixeli din zona neagră va fi scăzută pentru a avea valoarea 0, acesta fiind primul moment de la începutul procesului experimental.

BUPT

Următoarele valori ale numărului de pixeli din următoarele zone în care inima devine treptat transparentă, vor fi scăzute din valoarea maximă inițială.

Această scădere a fost numită „variabila de proces” și va fi folosită în continuare în algoritmul sofware conceput. După introducerea unor operațiuni de filtrare, această variabilă va fi reprezentată grafic.

Datorită numărului mare de imagini achiziționate, respectiv a valorilor numărului de pixeli aferent fiecărei imagini achiziționate, a fost implementată o funcție de filtrare și aplicată acestor valori (variabilei de proces) înainte de a fi salvate într-un fișier data.txt. Funcția de filtrare implementată calculează media ultimelor 5 valori obținute.

Pentru a fi afișate pe grafic, valorile sunt citite din fișierul data.txt salvat. Deoarece există o oarecare neliniaritate a reprezentării, se aplică un filtru Gaussian pentru a netezi vârfurile.

Detectarea momentului final al experimentului presupune calcularea diferenței dintre ultimele valori ale fiecărei imagini, iar dacă aceasta este mai mică decât valoarea de referință de 0,1 (găsită cu ajutorul experimentelor realizate), pentru un număr pe care utilizatorul îl specifică în interfață la inițializarea valorilor (de exemplu în figura 5-4, parametru „stop-time” este 10), programul se va opri automat.

5.1.6 Rezultate și discuții

După prelucrarea datelor experimentale s-a putut stabili momentul final al decolorării, atunci când inima devine transparentă (proces echivalent cu inima decelularizată).

Evoluția intensității culorii inimii simulate poate fi reprezentată grafic ca o curbă sigmoidă [83-85]. Folosind algoritmul matematic descris mai sus, curba este reprezentată grafic.

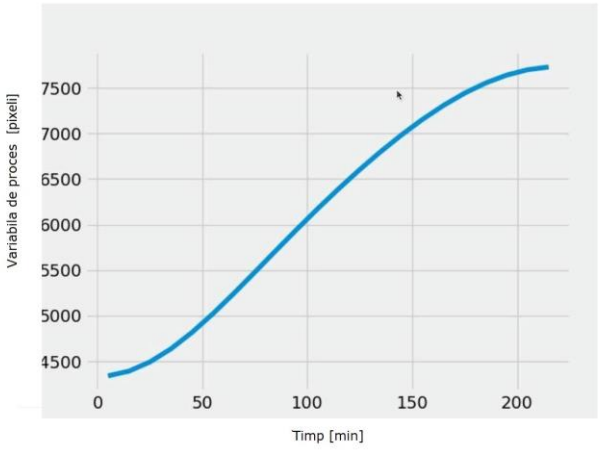


Figura 5-5. Dependența „variabilei de proces” în funcție de timp *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [81].*

BUPT

În acest timp, după ce aplicația este pornită, utilizatorul poate vizualiza graficul în timp real pentru fiecare imagine achiziționată. Acesta este actualizat la fiecare imagine capturată.

Folosind algoritmul software descris, momentul final al experimentului este determinat automat, deoarece din acel moment urmează o zonă, care marchează o valoare staționară pentru așa-numitul platou al curbei de intensitate a culorii.

Acest rezultat este susținut de faptul că la finalul procesului, organul simulat este complet transparent (Figura 5-6. B).

Se poate observa foarte clar că nivelul de colorant din inima simulată este înlocuit complet cu nivelul apei introduse de-a lungul experimentului.

Imaginea achiziționată (Figura 5-5. A) la începutul experimentului, precum și imaginea dobândită de la sfârșitul procesului, sunt ilustrate mai jos (Figura 5-6. B).

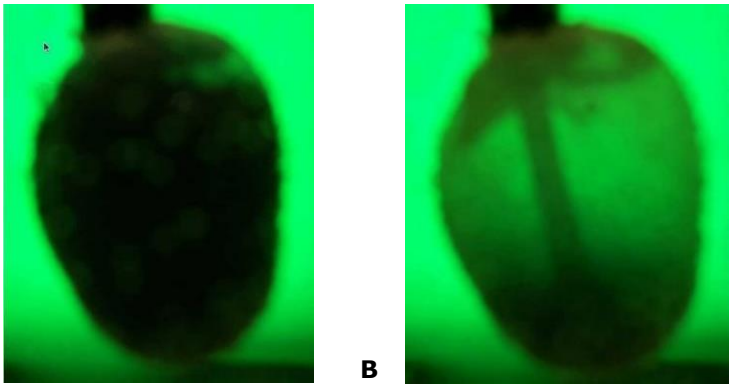


Figura 5-6. Organul simulat înainte (A) și după experiment (B) *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [81].*

5.1.7 Concluzii

În acest studiu, dispozitivul experimental Langendorff, deja descris [66-68] a fost îmbunătățit prin crearea unei aplicații software [81], care vizează achiziția, procesarea și analiza imaginilor biomedicale, care vor fi utilizate în automatizarea procesului de decelularizare a inimii de șobolan prin aplicarea diferitelor protocoale experimentale de decelularizare.

Aceste studii experimentale arată că metodele utilizate până acum pot oferi o modalitate eficientă de optimizare a procedurilor de decelularizare.

Validarea acestei aplicații software, precum și calculul nivelului de precizie, se vor efectua prin studii comparative de spectrofotometrie în ultraviolet. Totodată pot fi incluse diferite studii de cercetare ale procesului de decelularizare având o abordare reală a inimii de șobolan.

Spre deosebire de majoritatea sistemelor, care necesită o fabricație complexă și costisitoare, dispozitivul experimental a fost realizat cu un cost relativ redus, versatil și ușor de utilizat.

BUPT

5.2 Optimizarea algoritmului software pentru decelularizarea automată

5.2.1 Scopul studiului

O altă etapă a procesului de decolorare pentru inimile simulate de șobolan presupune optimizarea algoritmului software creat.

De-a lungul experimentelor s-a observat că algoritmul software de prelucrare poate fi îmbunătățit pentru a determina cu o precizie mai mare momentul final al decolorării inimilor simulate. În studiul precedent [81] s-a determinat numărul de pixeli pentru suprafața conturată la început de către utilizator, pentru o anumită nuanță de negru. Apoi această zonă a fost colorată cu valorile standard pentru culoarea „negru” și procesarea valorilor pentru determinarea momentului final de decolorare.

În următoarele studii preliminare [86, 87] s-a convertit această zonă delimitată pentru toate imaginile, în tonuri de gri pentru care s-a făcut procesarea pentru a determina momentul final al decolorarării.

S-a ales această abordare pentru a ne apropia cât mai mult de metoda spectrofotometrică clasică, care presupune existența unei singure lungimi de undă optime la care se face determinarea concentrației speciei chimice analizate [88].

Validarea acestei aplicații software, dar și calculul nivelului de precizie pentru aceste procese experimental se vor efectua prin studii comparative de spectrofotometrie în ultraviolet pentru probele de colorant preluate la un interval de timp identic.

5.2.2 Descrierea dispozitivului experimental

Modulul hardware, deja descris în capitolul anterior și îmbunătățirea aplicației software produse sunt necesare pentru optimizarea algoritmului software utilizat pentru decelularizarea automată.

5.2.3 Implementare Hardware

Acest dispozitiv experimental păstrează arhitectura hardware, descrisă deja în capitolul 5.1.4.

5.2.4 Implementare Software

Optimizarea algoritmului software creat este utilizat în scopul validării automate a procesului de decelularizare pentru o inimă simulată (ce conține colorant), folosind studii comparative de spectrofotometrie în ultraviolet pentru probele de colorant folosit.

BUPT

Arhitectura software a diagramei de funcționare a algoritmului este prezentată în figura 5-7.

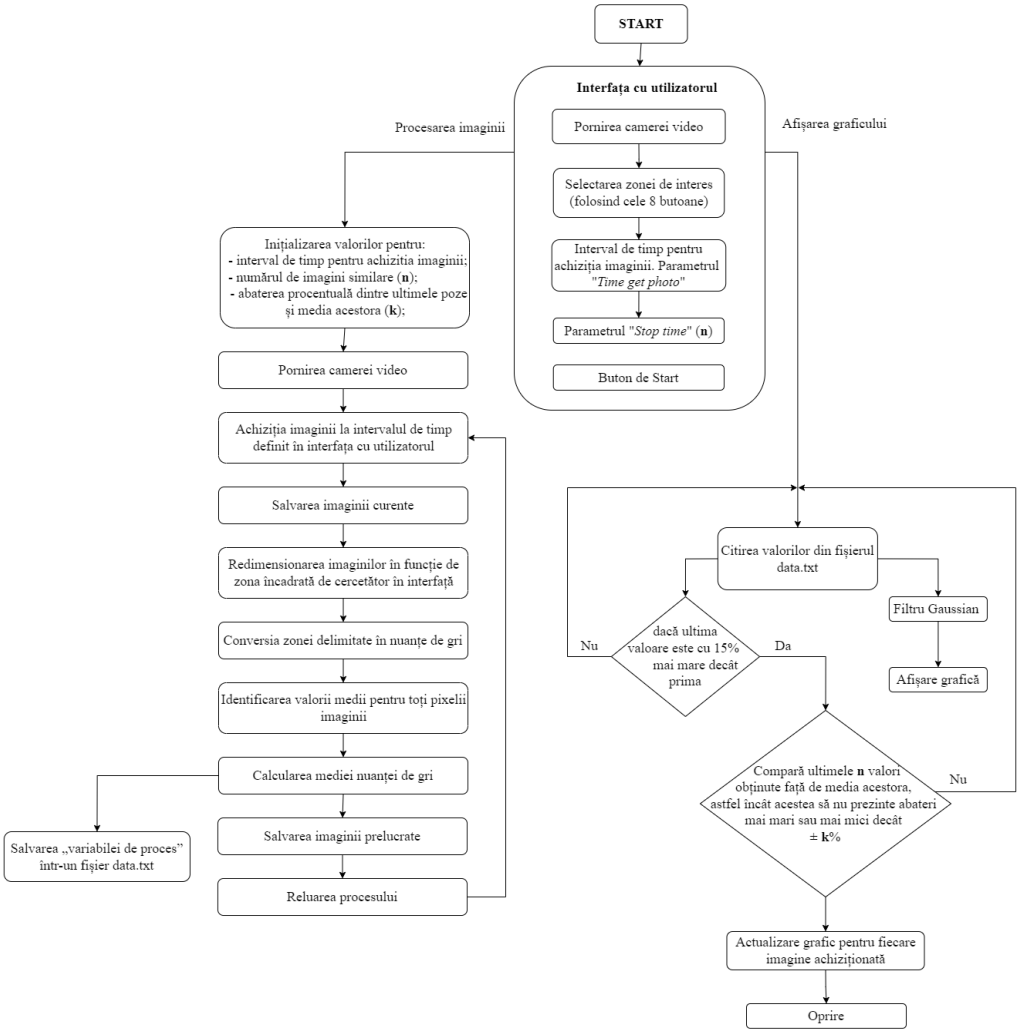


Figura 5-7. Diagrama de funcționare a algoritmului software *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [86].*

Acest algoritm software permite utilizatorului să contureze zona de interes pentru care vor fi procesate imaginile achiziționate.

Această zonă este definită de utilizator la începutul fiecărui experiment. Zona conturată folosind butoanele interfeței grafice cu utilizatorul nu se modifică în timpul procesului și este utilizată în continuare pentru procesarea sa folosind algoritmul software creat.

BUPT

În experimentele realizate pentru validarea aplicației software, achiziția imaginilor s-a făcut la un interval de 5 minute. Se poate observa în figura 5-8 că parametrul „Time get photo” este setat la 300 de secunde.

Cel de-al doilea parametru folosit în algoritmul software creat „Stop time” a fost setat 10 și stabilește numărul de imagini achiziționate. Totodată, imaginea este transmisă în timp real pe monitor. Acest lucru permite utilizatorului să poziționeze, să fixeze și să încadreze inima cât mai bine în fața camerei folosite. Deasemenea, se poate remarca conturul delimitat de cele 4 bare albe, în care se regăsește inima simulată. Această zona vă fi folosită pentru prelucrarea imaginilor achiziționate.

Un buton de Start este implementat pentru a permite începerea procesului.

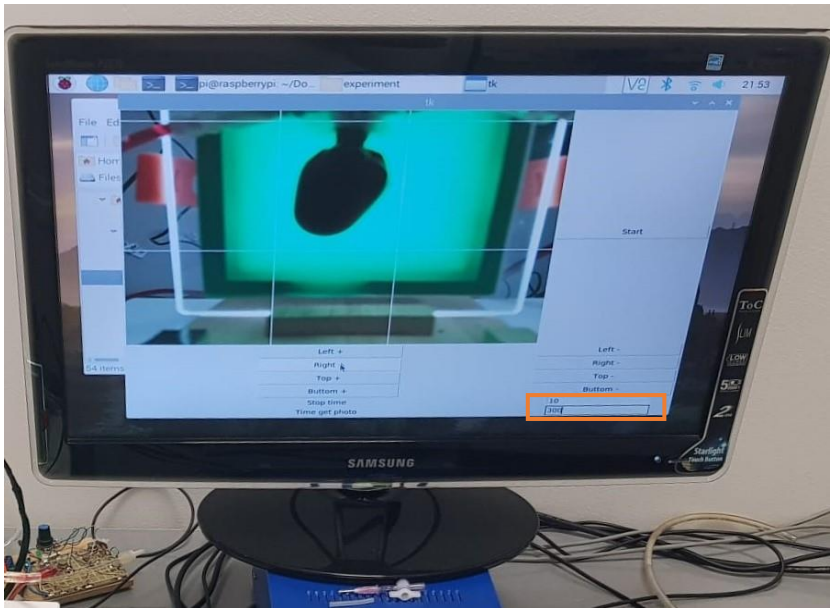


Figura 5-8. Interfața cu utilizatorul *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [86].*

Toate imaginile achiziționate prezintă o rezoluție de 1024 x 768 pixeli. Acestea sunt salvate într-un director, care se crează automat la pornirea aplicației. Directorul creat este denumit cu data zilei în care s-a făcut experimentul.

Pe lângă acest director, aplicația crează în mod automat un alt director unde se regăsesc imaginile cu zona delimitată de către utilizator și prelucrate de către aplicația software având următorii pași.

Primul pas pentru procesarea imaginilor constă în convertirea zonei delimitate de către utilizator în nuanțe de gri.

Următorul pas este identificarea valorii medii a tuturor pixelilor ce compun imaginea respectivă. Mai departe se analizează toți pixelii fiecărei imagini din punct de vedere al nuanței de gri, negru fiind 0, iar alb având valoarea 255.

Aplicația software calculează media nuanței de gri pentru fiecare imagine, ca fiind media aritmetică dintre suma tuturor nuanțelor de gri și numărul total de pixeli raportați. Această valoare medie a pixelilor fiecărei imagini, denumită în continuare

BUPT

„variabila de proces” se va salva într-un fișier data.txt și este transpusă în procente, într-un grafic.

Pentru afișarea grafică, valorile sunt preluate din fișierul salvat data.txt. Deoarece au fost detectate anumite diferențe între valori, s-a utilizat un filtru Gaussian pentru netezirea vârfurilor.

Din experimentele realizate anterior s-a detectat că numărul ales de imagini („stop time”) să fie egal cu 10 (figura 5-8). Aceasta înseamnă că pentru a detecta momentul decolorării complete, ceea ce este echivalent cu decelularizarea completă a unei inimi reale, algoritmul software va compara ultimele 10 valori obținute, astfel încât să nu aibă abateri mai mari de 3% (valoare găsită cu ajutorul experimentelor realizate) față de media celor 10 poze, pentru a considera procesul încheiat.

Atât imaginile achiziționate de la începutul experimentului (figura 5-9. A), dar și de la finalul acestuia (figura 5-9. B), precum și imaginile prelucrate, cu zona delimitată de către utilizator la începutul procesului și convertite în nuanțe de gri (figura 5-9. C), dar și de la finalul acestui proces (figura 5-9. D) sunt ilustrate mai jos.

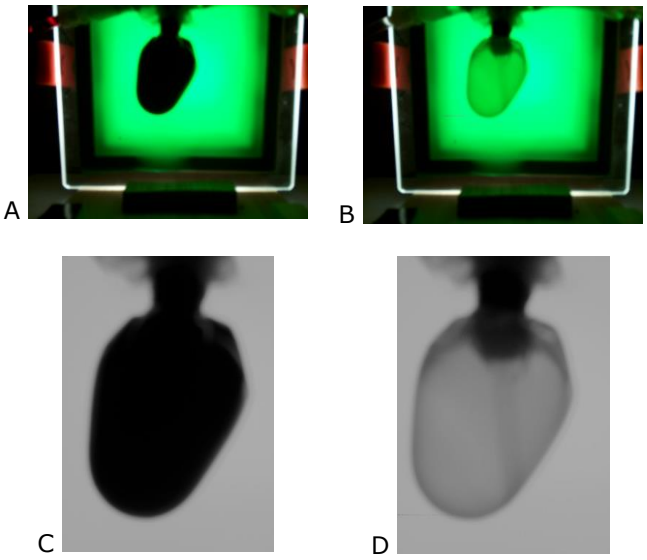


Figura 5-9. Imaginile reale cu organul simulat înainte (A) și după experiment (B), imaginile prelucrate înainte (C) și după experiment (D) *(după D. D. Bonciog și colab.) [86].*

Toate imaginile au fost salvate în cele două directoare de sesiune corespunzătoare.

În figura 5-10, se poate observa un număr mic de imagini selectate arbitrar din timpul unui experiment, care ilustrează modul în care algoritmul software le-a procesat aspectul. În mod normal, un număr mare de imagini este prelucrat de algoritmul software pentru a obține o imagine completă și precisă a inimii simulate.

Imaginile selectate în figura 5-10 sunt cele mai semnificative și relevante pentru a arăta cum funcționează algoritmul software.

BUPT

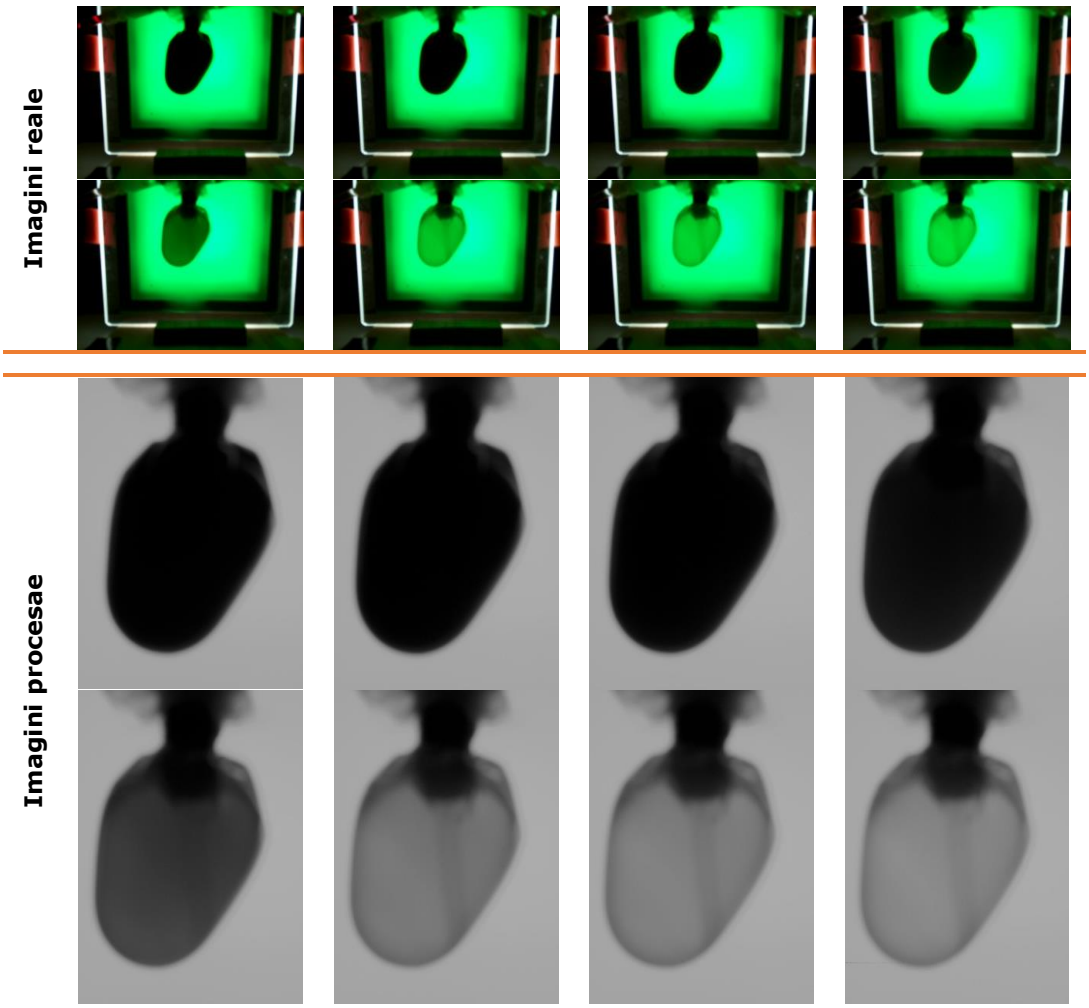


Figura 5-10. Serii de imagini aleatorii ale procesului de decolorare *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].*

S-a putut constata faptul că procesul poate fi declarat încheiat atunci când inima este decolorată. În acest sens, aspectul vizual al inimii încetează să se schimbe, iar valorile determinate ating un platou. În plus, timpii de decolorare obținuți au fost, de asemenea, normalizați la debitul constant stabilit injectomatului de uz clinic pentru fiecare inimă implicată în experimente.

Momentul final al decolorării nu a putut fi validat cu ochiul uman, fiind imposibil să se găsească diferențele dintre ultimele fotografii, așa cum se poate observa în seriile de imagini pentru un experiment ales aleator.

BUPT

5.2.5 Sistemul de monitorizare

Valorile obținute pentru fiecare imagine achiziționată în timp real sunt citite din fișierul data.txt și sunt reprezentate grafic. Astfel, cu fiecare imagine achiziționată, graficul este actualizat. Utilizarea graficelor pentru a reprezenta evoluția unui proces, poate fi foarte utilă în general, deoarece poate oferi informații clare și ușor de interpretat despre progresul unui proces.

La finalul procesului, când inima simulată devine transparentă, aplicația software încheie automat procesul și afișează un mesaj de încheiere utilizatorului. Graficul actualizat se salvează în directorul creat automat la începutul procesului experimental.

Evoluția intensității culorii inimii simulate este reprezentată grafic. Rezultatul final a subliniat o formă sigmoidală, așa cum este ilustrată de linia albastră din graficul de mai jos [83-85]. Această curbă în formă de S, sugerează o creștere lentă la început, o creștere rapidă în mijlocul procesului, urmată de o încetinire și stabilizare a intensității culorii la un nivel minim. Această formă sigmoidală a fost observată în toate cazurile inimilor simulate și a confirmat că procesul de decolorare a fost complet.

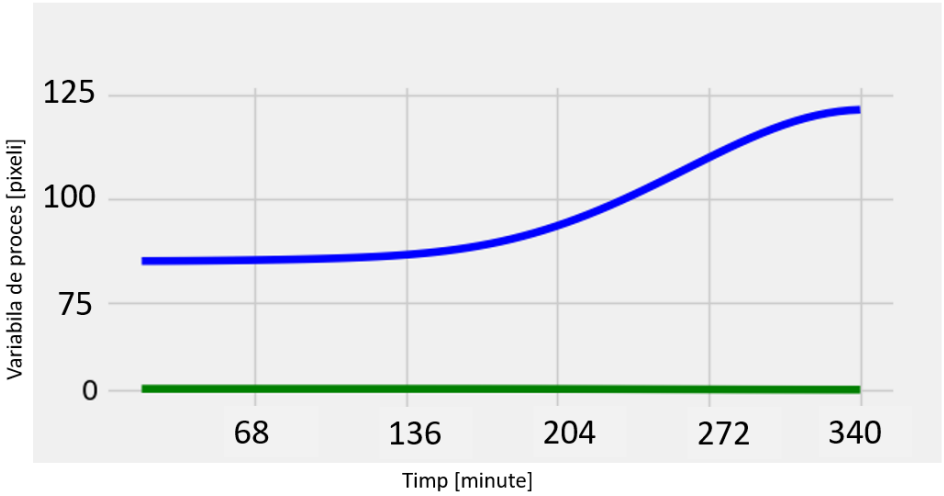


Figura 5-11. Evoluția colorantului în timpul experimentelor, realizată automat cu aplicația software (culoare albastră) *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [86].*

Așa cum se poate observa în figura 5-11, un astfel de proces a durat în medie în jur de 340 de minute. Se poate observa că inițial, intensitatea culorii inimii a fost constantă, dar odată cu începerea procesului de decolorare, a scăzut treptat. Intensitatea culorii s-a diminuat treptat până a atins o valoare minimă, moment în care s-a stabilizat la un platou.

Utilizând injectomatul de uz clinic a fost introdusă apa distilată cu un debit constant de 50 ml/h, pentru a putea decolora treptat inima simulată (figura 5-9. A,

C), astfel încât la finalul procesului de decolorare, aplicația software creată să detecteze momentul final al decolorării (figura 5-9. B, D).

5.2.6 Test spectrofotometric

În timpul experimentelor realizate s-a utilizat o măsurare spectrofotometrică a evoluției concentrației colorantului utilizat în acest proces experimental.

Astfel, la intervale de 30 de minute au fost prelevate 10 µl din rezervorul de colorant folosind o micropipetă automată. După ce aplicația s-a oprit automat, s-a continuat procesul de decolorare încă 1 oră, pentru a avea mai multe probe folosite pentru validarea aplicației.

În acest proces de validare am utilizat un spectrofotometru de volum mic pentru măsurări (figura 2-10).

Pentru prevenirea riscului de a avea măsurări eronate, după fiecare citire a valorilor monstrelor, a fost citită valoarea apei distilate. S-a constat că zgomotul de fond a absorbanței apei distilate a fost în medie 0.008 nm.

Valorile medii ale evoluției concentrației de colorant sunt prezentate în figura de mai jos.

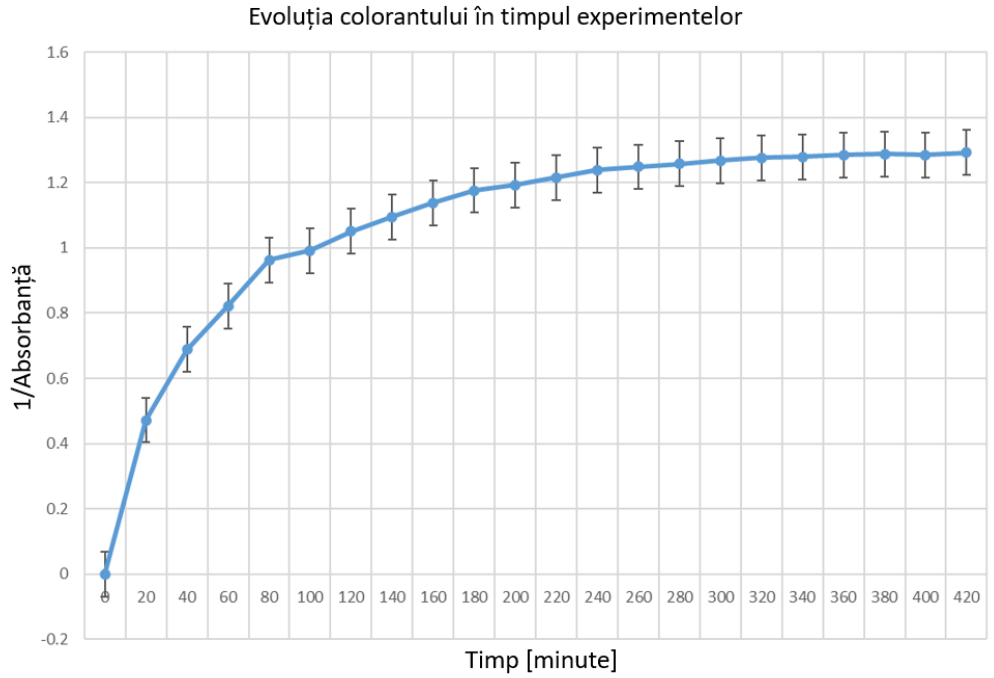


Figura 5-12. Evoluția colorantului (valori medii) utilizând spectrofotometrul *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [86].*

BUPT

Se identifică momentul în care variația concentrației de colorant devine nesemnificativă, prin metoda diferențelor succesive.

Metoda diferențelor succesive este o tehnică utilizată în acest caz pentru a obține o aproximare a concentrației de colorant printr-un proces iterativ. Se începe cu o valoare inițială a concentrației de colorant și se continuă cu aplicarea repetată a unei relații de recurență până când se obține o aproximare suficient de precisă. Această relație de recurență exprimă relația dintre valoarea curentă și cea anterioară a concentrației de colorant, iar procedura continuă până când diferența dintre valoarea curentă și cea anterioară devine suficient de mică, ceea ce indică o aproximare satisfăcătoare.

Astfel, în acest caz se consideră procesul finalizat în momentul în care diferențele succesive înregistrează o valoare minimă și constantă, așa cum se observă în figura 5-13.

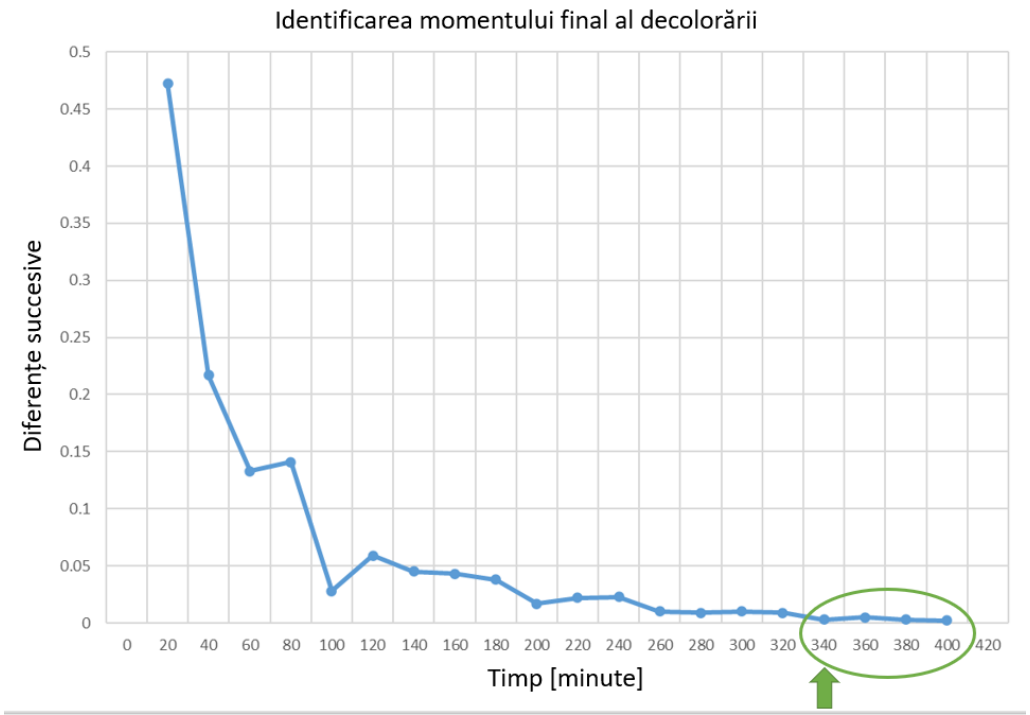


Figura 5-13. Evoluția colorantului în timpul experimentelor *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [86].*

Se observă că începând cu minutul 340, concentrația de colorant devine minimă și constantă, deci procesul este finalizat.

Comparând durata procesului determinată cu ajutorul algoritmului software propus (figura 5-11) și durata determinată prin metoda spectrofotometrică prelucrată matematic (figura 5-13), nu se constată diferențe, de unde se poate concluziona că aplicația software creată răspunde cerințelor experimentale.

BUPT

Rezultatele obținute utilizând aplicația software creată și optimizată în acest studiu sunt promițătoare, sugerând că algoritmul propus poate fi folosit cu succes în experimente ulterioare pentru a monitoriza procesul de decelularizare a inimilor reale recoltate de la șobolani.

Utilizarea acestei aplicații poate oferi o metodă rapidă și convenabilă pentru monitorizarea procesului de decelularizare, eliminând nevoia de a efectua teste spectrofotometrice și simplificând astfel procedura experimentală.

5.2.7 Concluzii

În acest studiu s-a optimizat și validat aplicația creată, cu ajutorul datelor prelevate periodic din concentrația de colorant și furnizate de spectrofotometru.

Rezultatele obținute în studiile utilizate pentru optimizarea algoritmului software arată că dispozitivul proiectat și metoda folosită oferă o metodă de optimizare sigură pentru o predicție mai eficientă a momentului optim de decelularizare a inimii.

De asemenea, experimentele repetate și de lungă durată au permis găsirea valorilor de referință utilizate în aplicația software dezvoltată, fapt ce a contribuit la minimizarea erorilor și la obținerea unei precizii cât mai ridicate.

Conform datelor experimentale, dispozitivul creat, algoritmul software îmbunătățit, precum și metodele utilizate în acest proces, pot oferi o predicție eficientă a momentului optim de decelularizare a inimii.

S-a demonstrat că utilizarea algoritmului software îmbunătățit, în monitorizarea procesului de decolorare, este precisă și fiabilă, deoarece rezultatele acestuia se potrivesc cu cele obținute prin metoda spectrofotometrică, care este o metodă frecvent utilizată pentru evaluarea succesului procesului de decelularizare. Acest lucru indică faptul că algoritmul software îmbunătățit, îndeplinește criteriile experimentale necesare într-un mediu fiziologic și poate fi considerat un instrument valid pentru procesul de decelularizare.

Această abordare poate avea implicații semnificative în ingineria tisulară și medicina regenerativă, unde țesuturile și organele decelularizate sunt folosite ca schele pentru a produce țesuturi și organe de înlocuire funcționale.

5.3 Sumarul contribuțiilor

Pentru a proiecta un sistem automatizat pentru întreg procesul de decelularizare s-a dezvoltat un program software prevăzut cu un sistem de achiziție, prelucrare și analiză a imaginilor biomedicale.

Pe baza cerințelor stabilite, s-au ales componentele hardware, astfel încât aplicația software să poată fi concepută. Totodată, pe lângă componentele esențiale pentru realizarea algoritmului software, a fost adaptat dispozitivul Langendorff modificat pentru decelularizarea inimii de șobolan, descris în capitolul 4, astfel încât să poată fi folosit pentru a simula inima, folosind un balon de latex în care a fost introdus un colorant în cantitate suficientă, astfel încât să îi confere opacitatea unei inimi reale. În acest fel, s-a reușit conceperea, modificarea, actualizarea și testarea

BUPT

prototipului inițial al algoritmului software, fără a sacrifica inimi reale, preluate de la șobolani.

Pe baza obiectivelor propuse de la început, a fost concepută diagrama bloc a arhitecturii software. Limbajul de proiectare care a fost utilizat pentru dezvoltarea algoritmului software este Python, iar sistemul de operare care rulează pe Raspberry Pi este 10.3.

Pentru interacțiunea cercetătorului cu elementul hardware folosit s-a dezvoltat o interfață de comandă pentru acesta, pentru a-i permite vizualizarea inimii în timp real și poziționarea acesteia cât mai bine în fața camerei, alegerea intervalului de timp pentru care se va face achiziția de imagini, delimitarea unei zone de interes pentru inima simulată pentru care se va face procesarea, folosind anumite butoane prestabilite, precum și un buton de Start pentru începerea procesului. Odată ce toți parametrii au fost setați și zona a fost delimitată, algoritmul software rulează până la detectarea automată a decolorării complete sau întreruperea acestuia din fereastra terminalului.

După realizarea acestui prim prototip, respectiv testarea funcționalității acestuia s-a putut demonstra că acest sistem detectează momentul final al decolorării inimilor simulate.

În subcapitolul 5.2 a fost prezentată optimizarea algoritmului software prin găsirea unei validări mai precise a acestui prim prototip, precum și determinarea nivelului de precizie, folosind măsurări ale concentrației de colorant, recurcând și de această dată la metoda spectrofotometrică. În acest caz, a fost optimizat algoritmul software optimizat, pentru a atinge un grad ridicat de asemănare cu metoda spectrofotometrică clasică.

În final nu am constatat diferențe între rezultatele obținute folosind metoda spectrofotometrică și rezultatele furnizate de către algoritmul software, ceea ce indică faptul că aplicația software creată îndeplinește criteriile experimentale.

Această etapă intermediară permite optimizarea dispozitivului experimental creat, datorită sistemului de analiză a imaginilor biomediale, care oferă o metodă de optimizare sigură pentru o predicție mai eficientă a momentului optim al decelularizării inimilor reale.

BUPT

6. ÎMBUNĂTĂȚIREA DISPOZITIVULUI EXPERIMENTAL CONTROLAT ÎN PRESIUNE PREVĂZUT CU O COLOANĂ VIBRANTĂ DE FLUID

6.1 Scopul studiului

Studiile realizate până în prezent au demonstrat că aproximativ 40-50% din organele și țesuturile, care sunt transplantate se pierd în decurs de 10 până la 12 ani, iar un procent mare din restul suferă de afecțiuni de suprimare a activității sistemului imunitar [89, 90]. Acest factor, pe lângă alti factori de ordin religios și moral a direcționat studiile de cercetare către decelularizarea de organe și țesuturi, luând naștere domeniul ingineriei tisulare.

Astfel, procesul de decelularizare a fost dezvoltat nu doar pentru asigurarea de organe pentru transplanturi, ci și pentru a rezolva problema imunității de respingere imediată.

Din literatură se constată faptul că cercetătorii sunt interesați de dezvoltarea și proiectarea diverselor dispozitive experimentale, care utilizează o combinație de mecanisme ale decelularizării, astfel încât atât pentru organe mari, dar și mici decelularizarea să se realizeze cu un timp de expunere a organului respectiv cât mai mic, dar păstrând în final o structură tridimensională stabilă a acelui organ și adecvată dintr-o perspectivă biomecanică.

Scopul acestui studiu a constat în proiectarea și implementarea unui dispozitiv experimental de tip Langendorff controlat în presiune și prevăzut cu o coloană vibrantă de fluid.

Prin exercitarea unei forțe mecanice directe asupra membranelor celulare, aplicarea unei presiuni de perfuzie, care oscilează rapid poate grăbi procesul de decelularizare, deoarece se crează unde mecanice de presiune, care pot distruge membranele celulare și componentele matricei extracelulare.

Azhim și echipa sa au folosit vibrații de frecvență ultrasonică pentru a ilustra acest fenomen [91-94]. Obiectivul major al acestui studiu este de a evalua cinetica procesului de decelularizare, care are loc în inima șobolanului sub influența unei presiuni de perfuzie oscilante de joasă frecvență.

Utilizarea ultrasunetelor în electrochimie, nanotehnologie, tehnologia alimentară, sinteza chimică și extracția materialelor este în prezent urmărită de către organizații de cercetare și întreprinderi cu expertiză într-o gamă mult mai largă de activități [95].

BUPT

Aceste abordări diferite au potențialul de a accelera procesul de decelularizare și de a îmbunătăți calitatea schelelor rezultate, care ar putea avea implicații semnificative pentru utilizarea acestor schele în ingineria tisulară și medicina regenerativă.

6.2 Descrierea dispozitivului experimental

În această direcție, a fost proiectat și construit un dispozitiv de tip Langendorff cu presiune controlată.

Dispozitivul propus oferă posibilitatea suprapunerii unei presiuni oscilante, cu o frecvență de 18Hz, peste presiunea de perfuzie. Practic, se generează o coloană de lichid vibrator, determinând ca vibrațiile asociate să fie transmise inimii [96].

Un beneficiu al utilizării ultrasunetelor de joasă frecvență pentru decelularizare este viteza. Acest lucru se datorează faptului că aceste dispozitive, care sunt realizate în acest scop, pot accelera procesul în comparație cu tehnicile mai convenționale, cum ar fi metodele chimice și fizice, și pot reduce timpul necesar pentru decelularizarea celulelor. Evitarea utilizării de către această metodă a substanțelor chimice dure sau a valorilor de presiune ridicată, care ar putea dăuna părților constitutive ale matricii extracelulare și ar putea compromite integritatea schelei decelularizate este un alt beneficiu important.

6.2.1 Componentele sistemului

Dispozitivul experimental urmează principiul descris de Langendorff. Dispozitivul menține presiunea constantă de perfuzie coronariană prin varierea fluxului de soluție de decelularizare.

În figura de mai jos se observă diagrama bloc a acestui dispozitiv experimental.

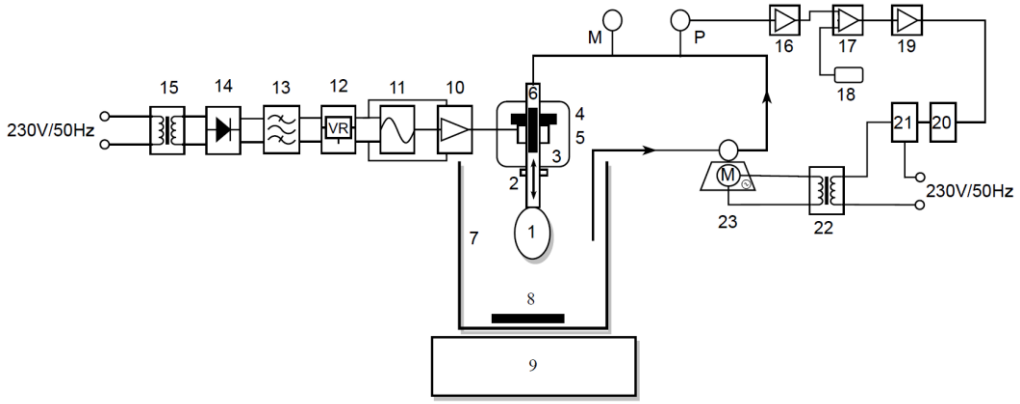


Figura 6-1. Schema sistemului propus *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].*

Pentru interpretarea diagramei bloc prezentată în figura 6-1, mai jos este prezentat un tabel ce conține legenda acesteia.

BUPT

Tabel 6-1. Legenda diagramei bloc *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].*

1	Inima	14	Redresor bilaternanță
2	Canulă	15	Transformator cu priză mediană
3	Ansamblu electromagnetic	16	Amplificator de presiune
4	Magnet permanent	17	Comparator
5	Bobină	18	Tensiune de referință
6	Bară feromagnetică	19	Amplificator de comandă
7	Cameră de decelularizare	20	Releu solid state
8	Bară magnetică	21	Circuit de amortizare
9	Agitator magnetic	22	Transformator coborâtor de tensiune
10	Amplificator de putere	23	Pompă peristaltică
11	Oscilator Wien	M~	Motorul de curent alternativ al pompei peristaltice
12	Stabilizator de tensiune	M	Manometru
13	Filtru	P	Traductor de presiune

Inima (figura 6-1. 1), pregătită pentru decelularizare este prinsă de vârful unei canule speciale (AD Instruments) (figura 6-1. 2) și este conectată la ansamblul electromagnetic (figura 6-1. 3), care generează coloana vibrantă de fluid.

Folosind o cameră de decelularizare (figura 6-1. 7) ce conține soluția de lizare a celulelor (SDS, cu o concentrație cuprinsă în intervalul 0,5% – 1,5%) inima va fi supusă procesului de deceluarizare. Se utilizează un agitator magnetic (figura 6-1. 9) și o bară magnetică (figura 6-1. 8) pentru a omogeniza soluția în timpul experimentelor, ceea ce permite ca în orice moment al timpului și al volumului camerei, compoziția soluției să fie constantă. Acest pas este important pentru colectarea de probe utilizate pentru determinări biochimice.

Ansamblul electromagnetic este format dintr-un magnet permanent sub forma unui disc perforat (figura 6-1. 4), de care este fixată o bobină cu impedanța $Z=8\Omega$ (figura 6-1. 5). Aceasta este străbătută de un tub de sticlă cu diametrul de 1cm, în interiorul căruia se află o bară feromagnetică cilindrică învelită în teflon (figura 6-1. 6). Atâta timp cât bobina nu este alimentată, bara este ținută într-o poziție fixă de câmpul magnetic produs de magnetul permanent.

Când bobina este alimentată cu o tensiune alternativă, bara va începe să oscileze în jurul poziției de echilibru.

Amplitudinea maximă a acestor oscilații, pentru o anumită intensitate a curentului, depinde de caracteristica constructivă a aparatului și a fost determinată experimental, pentru o frecvență de 18 Hz, la aproximativ 9 mm.

Măsurările au fost făcute după ce dispozitivul a fost umplut cu soluție de decelularizare. Soluția de decelularizare este aspirată din camera de decelularizare de către pompa peristaltică (figura 6-1. 23). Aceasta este mai apoi reintrodusă în inimă prin ansamblul electromagnetic și canulă.

Datorită capabilităților scăzute ale transferului căldurii ale ansamblului electromagnetic raportate în timpul procesului de decelularizare a fost aleasă o metodă de răcire, folosind un ventilator, ce este alimentat la o tensiune de 12VDC cu ajutorul unui alimentator comercial.

BUPT

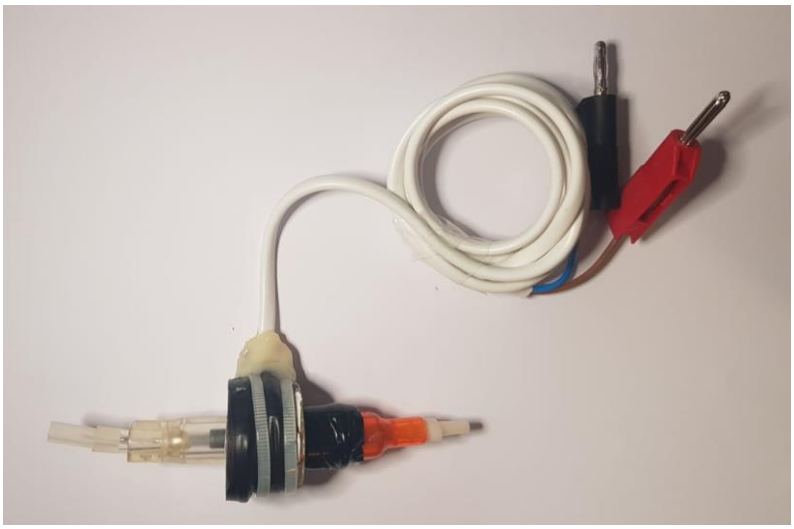


Figura 6-2. Ansamblul electromagnetic *(după D. D. Bonciog și colab.) [87].*

Presiunea de perfuzie a inimii este presiunea pe ramura de refulare a pompei peristaltice și este monitorizată permanent de traductorul de presiune (figura 6-1. P). În plus, poate fi citită de către cercetător de pe manometrul mecanic (figura 6-1. M).

Funcționarea pompei peristaltice este controlată de sistemul de automatizare, care reunește amplificatorul traductorului de presiune (figura 6-1. 16), care prelucrează semnalul generat de traductorul de presiune și comparatorul (figura 6-1. 17), care primește atât semnalul amplificat de la traductorul de presiune, cât și o tensiune de referință reglată de la un potențiometru (figura 6-1. 18). Ieșirea acestui comparator ajunge la amplificatorul de comandă (figura 6-1. 19) utilizat pentru releul Solid State cu triac (figura 6-1. 20), care controlează funcția pompei peristaltice. Pentru acționarea motorului pompei peristaltice (figura 6-1. M~) este nevoie de un transformator coborâtor de tensiune (figura 6-1. 22). Pentru comutarea unei sarcini inductive (transformatorul coborâtor de tensiune) este recomandată utilizarea unui circuit amortizare, folosit pentru protecția triacului (figura 6-1. 21).

Alimentarea ansamblului electromagnetic se realizează cu ajutorul unui amplificator de putere (figura 6-1. 10), care să ofere destulă putere pentru a produce oscilații barei feromagnetice [97, 98].

Schema acestui amplificator realizat cu componente ușor de procurat, de tip THD și care nu necesită reglaje deosebite și cu o bună funcționare, este reprezentată mai jos.

Se poate observa că valorile componentelor electrice au fost astfel alese încât amplificatorul să poată funcționa la o impedanță de sarcină de valoare Z=8Ω și o frecvență de 18Hz.

În acest caz, considerând tensiunea electromagnetului, notată cu V_{elmg} ca fiind egală cu V_{elmg}=16VAC, se poate calcula valoarea amplitudinii maxime a semnalului sinusoidal de ieșire (V_{amp}) și valoarea curenților la amplitudine maximă (I_{elmg} și I_{amp}), după cum urmează:

BUPT

$$V_{amp} = V_{elmg} \times \sqrt{2} = 16V \times \sqrt{2} = 22.62V \quad (1)$$

$$I_{elmg} = \frac{V_{elmg}}{R_{elmg}} = \frac{16V}{8\Omega} = 2A \quad (2)$$

$$I_{amp} = I_{elmg} \times \sqrt{2} = 2.82A \quad (3)$$

Datorită căderilor de tensiune de pe traseul sarcinii inductive se va alege folosirea unei tensiuni de alimentare diferențială V_{alim}= ± 24VDC.

$$V_{alim} = V_{amp} + V_{CEsat} + V_{shunt} = 22.62V + 1V + (2.8A \times 0.15\Omega) \approx 24V \quad (4)$$

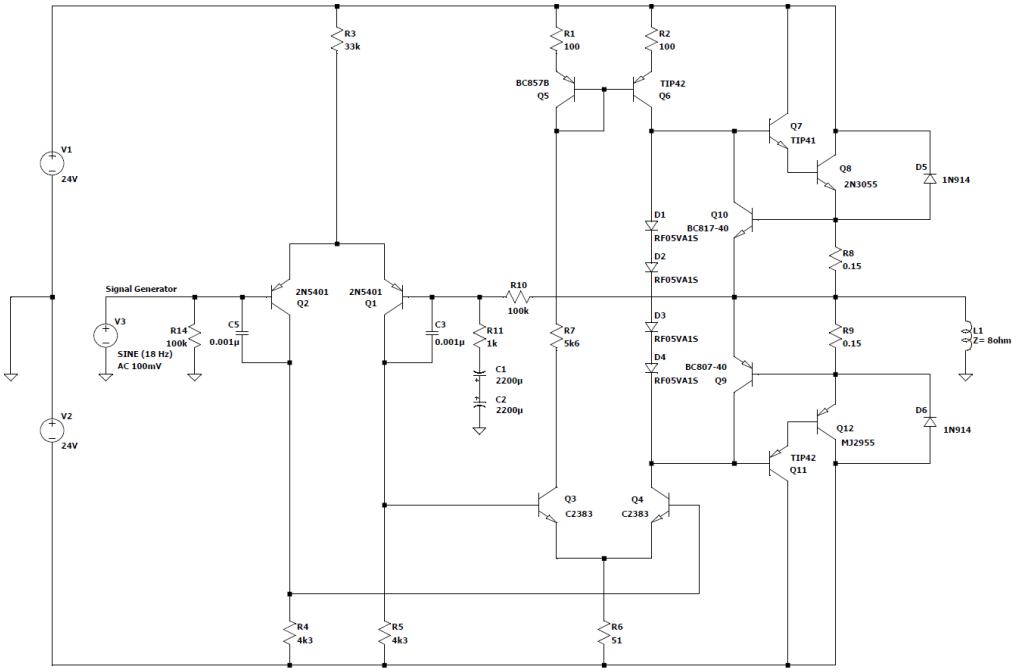


Figura 6-3. Schema electrică a amplificatorului de putere *(după D. D. Bonciog și colab.) [87].*

Din punct de vedere al specificațiilor pentru un circuit atât de simplu, acest amplificator se prezintă foarte bine. Tensiunea de alimentare a fost aleasă, deoarece tensiunea de 24V poate fi produsă folosind diferite surse de alimentare, care pot fi mai ușor accesibile. De exemplu, o baterie de 12V cu un convertor DC-DC, care dublează această tensiune poate fi folosită pentru a alimenta acest amplificator, sau un transformator coborâtor de tensiune, ce poate fi folosit pentru a furniza tensiunea necesară utilizând o punte redresoare cu diode Schottky.

BUPT

Dimensionarea acestei scheme (figura 6-3) s-a făcut în condiții de repaus, considerând amplitudinea semnalului de intrare 0mV, dar luând în considerare și vârfurile de sarcină, ce pot apărea în regim normal de funcționare.

Pentru a obține un curent de 2.8A prin tranzistorul Q_8, la un factor de amplificare tipic β = 20, e nevoie de un curent de bază de aproximativ:

$$I_{b\ Q8} = \frac{I_{load}}{\beta} = \frac{2.8A}{20} = 140mA \tag{5}$$

La rândul său tranzistorul Q_7, cu un factor de amplificare tipic β = 200, pentru a furniza un curent de emitor de 140mA are nevoie de un curent de bază de aproximativ:

$$I_{b\ Q7} = \frac{I_{b\ Q8}}{\beta} = \frac{140mA}{200} = 0.7mA \tag{6}$$

În acest caz pentru protecția la scurtcircuit a amplificatorului realizat au fost introduse atât tranzitorul Q_9, cât și tranzitorul Q_{10}.

Cum curentul de bază pentru cele două perechi repetoare pe emitor din etajul final Q_7, Q_8 și Q_{11}, Q_{12} este preluat din al doilea etaj diferențial în mod alternativ, o pereche pentru alternanța pozitivă, cealaltă pentru cea negativă, curentul de repaus prin oglinda de curent se alege în medie de 8 - 10 ori mai mare.

$$I_{oglinda} = 10 \times I_{b\ Q7} = 7mA \tag{7}$$

Pentru obținerea unui potențial simetric față de masă asupra colectorului celor două tranzistoare Q_6 și Q_4 din etajul median, alegerea rezistențelor R_1, R_2 și R_6 presupune situația în care potențialele sunt cât mai apropiate de emitor, respectiv de bază.

$$V_{e\ Q6} = -V_{e\ Q4} \tag{8}$$

$$V_{b\ Q6} = -V_{b\ Q4} \tag{9}$$

$$V_{c\ Q6} = 2 \times V_{be} = 2 \times 0.65V \approx 1.3V \tag{10}$$

$$V_{c\ Q4} = 2 \times V_{be} = 2 \times (-0.65V) \approx -1.3V \tag{11}$$

Așadar, folosirea grupului de diode $D_1 \div D_4$, utilizat în acest etaj va creea o cădere de tensiune constantă, aproximativ egală de 2.6V, necesară prepolarizării tranzistoarelor din etajul de ieșire. Prin aducerea acestora într-o clasă de funcționare AB și asigurarea unui curent de mers în gol, în jur de 40 mA – 50mA, se reduc considerabil distorsiunile de trecere de la o alternanță la cealaltă. Deoarece curentul de colector prin Q_6 reprezintă oglinda curentului de referință al oglinzii de curent, putem admite faptul că:

$$I_{c\ Q5} = I_{oglinda} = 7mA \tag{12}$$

Pentru a obține o dinamică cât mai bună pe etajul diferențial (excursie largă a tensiunii de comandă) potențialul colectorului lui Q_5 trebuie să fie cât mai apropiat de linia de alimentare.

Alegând în mod arbitrar o valoare de $V_{c\ Q5}$ = 22.6V, R_1 se poate calcula astfel:

BUPT

$$R_1 = \frac{V_{alim} - V_{c\,Q5} - V_{be}}{I_{oglinda} \times \left(1 + \frac{1}{\beta}\right)} = \frac{24V - 22.6V - 0.65V}{0.007A \times \left(1 + \frac{1}{200}\right)} \approx 106{,}60\Omega => R_1 = 100\Omega \quad (13)$$

În acest caz, valoarea rezistenței este $R_2 = R_1$ și $V_{b\,Q6} = V_{c\,Q5}$. Pentru calculul rezistenței R_6 se va lua în considerare valoarea dublă a curentului din oglinda de curent.

$$R_6 = \frac{V_{b\,Q4} + V_{be} - V_{alim}}{2 \times I_{oglinda} \times \left(1 + \frac{1}{\beta}\right)} = \frac{-22.6V - 0.65V + 24V}{2 \times 0.007A \times \left(1 + \frac{1}{200}\right)} \approx 53.30\Omega => R_6 = 51\Omega \quad (14)$$

Datorită faptului că emitorul tranzistorului Q_3 are același potențial ca și tranzistorul Q_4, tensiunea de bază a acestuia se poate considera de asemenea identică: $V_{b\,Q3} = V_{b\,Q4} = -22.6V$, rezistența R_7 trebuie să suporte diferența de tensiune raportată la curentul de oglindă, fără a forța însă intrarea în saturație a tranzistorului Q_3, condiție impusă de $V_{c\,Q3} > V_{b\,Q3}$. Schimbând referința în colectorul lui Q_3, se obține R_7:

$$R_7 < \frac{V_{c\,Q5} + V_{b\,Q3}}{I_{oglinda}} < \frac{22.6V + 22.6V}{0.007A} < 6457\Omega => R_7 = 5.6k\Omega \quad (15)$$

Această valoare aleasă este sensibil mai mică și va conferi o oarecare rezervă până la saturarea trazistorului Q_3. Așadar, rezultă un potențial pentru colectorul lui Q_3 care va avea valoarea de:

$$V_{c\,Q3} = V_{c\,Q5} - I_{oglinda} \times R_7 = 22.6V - 0.007mA \times 5600\Omega = -16.6V \quad (16)$$

Etajul de intrare este de tipul amplificatoarelor diferențiale de tensiune, conținând tranzistoarele Q_1 și Q_2 identice (2N5401). Acesta permite amplificarea în tensiune, cu un procent minim de distorsiuni, a semnalului de intrare.

Semnalul amplificat este preluat din colectorul tranzistorului Q_2 și aplicat în baza tranzistorului Q_4. Acesta este amplasat în cadrul montajului pentru a îndeplini funcția etajului pilot.

Dimensionarea etajului diferențial de intrare se face tot în condiții de simetrie, tensiunile de bază și de colector fiind identice cu semnalul de intrare nul. Astfel, curenții prin rezistențele R_4 și R_5 se pot considera tot identici. Spre deosebire de etajul median al cărui curent a fost impus de perechile de putere în configurație Darlington, la etajul diferențial de intrare curentul comun este forțat de curentul de bază al tranzistoarelor Q_3 și Q_4. Considerând factorul de amplificare tipic de $\beta = 200$, R3 rezultă:

$$I_{R3} = 10 \times 2 \times \frac{I_{oglinda}}{\beta} = 10 \times 2 \times \frac{0.007A}{200} = 0.7mA \quad (17)$$

$$R_3 = \frac{V_{alim} - V_{be}}{I_{R3}} = \frac{24V - 0.65V}{0.0007A} \approx 33k\Omega \quad (18)$$

BUPT

Ținând cont de faptul că în repaus curentul se împarte în mod egal pe cele două ramuri ale etajului diferențial și curenții prin rezistențele R_4, R_5 se pot considera identici, se poate calcula valoare rezistenței R_4 și R_5, după cum urmează:

$$R_5 = \frac{V_{b\,Q3} - V_{alim}}{\frac{I_{R3}}{2} \times \left(\frac{\beta}{\beta + 1}\right)} = \frac{-22.6V - (-24V)}{\frac{0{,}7mA}{2} \times \left(\frac{200}{200 + 1}\right)} = 4020\Omega => R_5 = 4.3k\Omega = R_4 \quad (19)$$

Amplificarea generală a montajului este dată de raportul:

$$Câștig = \frac{R_{10}}{R_{11} + 2 \times \left(\frac{1}{\omega \times C}\right)} = \frac{100k\Omega}{1k\Omega + 2 \times \left(\frac{1}{2 \times \pi \times f \times C}\right)} \quad (20)$$

$$Câștig = \frac{100k\Omega}{1k\Omega + 2 \times \left(\frac{1}{2 \times \pi \times 18\text{Hz} \times 0.0022\text{F}}\right)} = 99.20 \quad (21)$$

Etajul final este realizat cu ajutorul perechilor de tranzistori complementari de tip Darlington (figura 6.3) ce include tranzistoarele Q_7, Q_8 (bipolar, de tip NPN) și Q_{11}, Q_{12} (bipolar, de tip PNP).

Tranzistorii bipolari aleși (Q_8 – 2N3055 și Q_{12} – MJE2955) sunt de frecvență joasă. Aceștia oferă în același timp stabilitate și sunt potriviți în astfel de aplicații de amplificare.

Alegerea acestor tranzistori a fost făcută după găsirea unui optim intre fiabilitate și cost, deoarece aceștia sunt fabricați într-o capsulă metalică de putere TO-3, astfel realizându-se o transmisie substanțial mai rapidă a căldurii către un radiator de aluminiu, acesta fiind din același material.

Pentru a transfera căldura departe de dispozitiv și de restul circuitului s-au folosit două radiatoare din aluminiu de tipul celor cu aripioare de răcire separate printr-un strat izolator (figura 6-4).

În figura de mai jos se regăsește prototipul amplificatorului de putere realizat și folosit pentru testele efectuate în cadrul centrului de cercetare OncoGen din Timișoara.

A



B

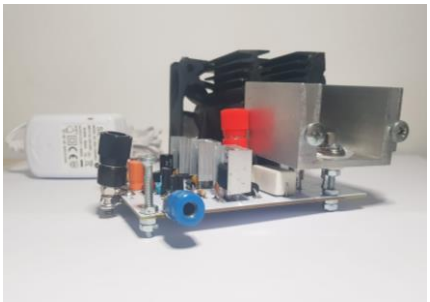


Figura 6-4. Circuitul funcțional (A. Vedere de sus, B. Vedere din dreapta).

BUPT

Datorită capabilităților scăzute ale transferului căldurii raportate în timpul procesului de testare (mult mai mic în comparație cu timpul necesar unui proces de decelularizare) a fost aleasă o metodă substanțială de răcire, folosind un ventilator, ce este alimentat la o tensiune de 12VDC cu ajutorul unui alimentator comercial (230VAC – 12 VDC, 400mA).

În general, fiecare dispozitiv electric utilizează un oscilator sau un generator de forme de undă. Orice dispozitiv sau instrument de măsurare, care inițiază procese sau măsurări, are nevoie de o sursă de oscilații regulate, în afară de cazurile evidente ale generatoarelor de semnal, de funcții și de impulsuri. Acestea sunt utilizate într-o gamă largă de dispozitive electronice, cum ar fi osciloscoapele, multimetrele digitale, receptoare de radiofrecvență, perifericele calculatorului, instrumentele digitale, telefoanele mobile și multe altele.

În acest caz pentru intrarea amplificatorui de putere (figura 6-1. 10), a fost conceput un oscilator cu punte Wien cu amplificator operațional (figura 6-1. 11), care produce un semnal sinusoidal cu o amplitudine constată de 100mV.

Figura de mai jos prezintă schema electrică a oscilatorului cu punte Wien, în care s-a folosit amplificatorul operațional LT6015.

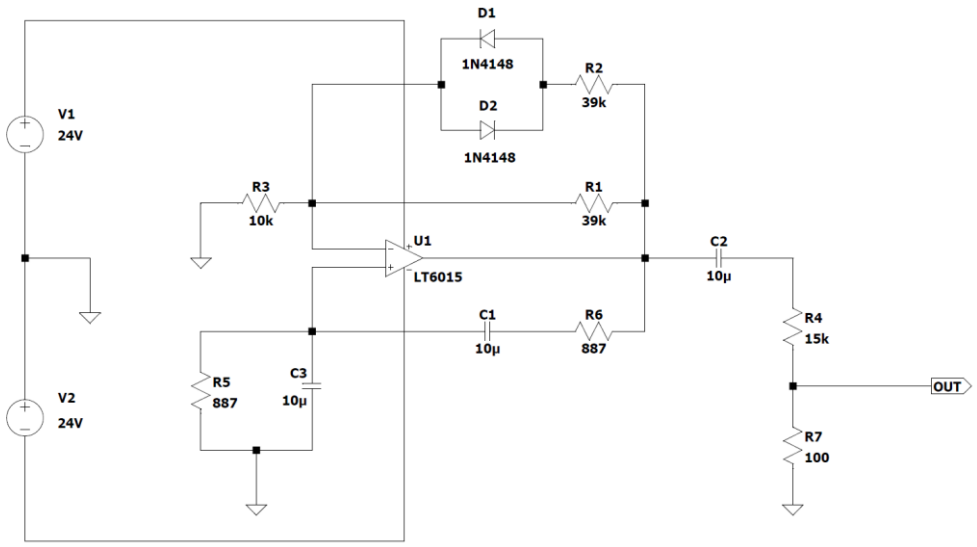


Figura 6-5. Oscilator cu punte Wien realizat cu amplificator operaţional *(după D. D. Bonciog și colab.) [87].*

În această aplicație a fost utilizat amplificatorul operațional LT6015, de la Analog Devices. Acesta este folosit în conexiune de amplificator neinversor, al cărui semnal de intrare este conectat mai departe la ieșire printr-o rețea Wien, formată din 2 perechi, o pereche de rezistențe și o pereche de condensatoare. Această rețea este conectată ca buclă de reacție pozitivă, care determină frecvența de oscilație și atenuarea [99, 100].

Acest oscilator cu punte Wien cu amplificator operațional prezintă un circuit de limitare a amplitudinii de oscilație, realizat cu o pereche de diode, atunci când

BUPT

este determinată o creștere a amplitudinii de oscilație, menținând un punct stabil de oscilație. Acest circuit este conectat în circuitul de reacție negativă și are rolul de a regla automat amplificarea, deoarece la o amplificare prea mică circuitul nu va oscila, iar la o amplificare prea mare semnalul de ieșire va fi dreptunghiular cu o amplitudine maximă.

Puntea Wien este realizată din două circuite de defazare, care reprezintă un filtru trece bandă. Perechea C_3 și R_6 reprezintă circuitul de defazare înainte și R_5 - C_1 circuitul de defazare înapoi.

Semnalul de ieşire din punte (conectat la intrarea neinversoare a AO) și circuitul de defazare înainte, la frecvențe joase este defazat în faţa semnalului de intrare în punte (cel care iese din AO), iar la frecvenţe înalte lucrează circuitul cu defazare înapoi şi semnalul de ieşire este defazat în urma semnalului de intrare.

La frecvenţa de rezonanţă, acest defazaj care apare dintre tensiunea de intrare şi tensiunea de ieşire este 0, iar tensiunea de ieşire are un vârf în care atenuarea este:

$$A = \frac{1}{3};\ V_{out} = \frac{1}{3} V_{in} \tag{22}$$

Așa cum se observă, în figura 6-5, $R_5 = R_6 = R$ și $C_3 = C_1 = C$, deci frecvența de rezonanță se poate calcula utilizând următoarea formulă:

$$f_{rez} = \frac{1}{2\pi RC} \approx 18Hz \tag{23}$$

Valorile rezistențelor R_1, R_2 și R_3 au fost alese astfel încât să se îndeplinească condiția pentru câștigul în tensiune de-a lungul buclei (A_O), care este produsul dintre câștigul amplificatorului în buclă închisă (A_V) și atenuarea introdusă de circuitul de reacție (A_R):

$$A_O = A_v \times A_R = 1 \tag{24}$$

$$V_{out} = \frac{1}{3} V_{in} \Rightarrow A_v = \frac{R_1 + R_2 \parallel R_3}{R_1} = \frac{10k + \frac{39k \times 39k}{39k + 39k}}{10k} \approx 3 \tag{25}$$

Alegerea valorilor rezistențelor R_4 = 15kΩ și R_7 = 100Ω stabilește valoarea amplitudinii semnalui sinusoidal de aproximativ 130mV necesară intrării amplificatorui de putere.

Alimentarea ansamblului realizat cu amplificatorul de putere și oscilatorul cu punte Wien cu amplificator operațional se face cu ajutorul unui redresor bialternanță (figura 6-1. 14) cu transformator cu priză mediană (figura 6-1. 15) și filtru (figura 6-1. 13) [101].

Schema redresorului bialternanță cu transformator cu priză mediană este ilustrată în figura următoare.

BUPT

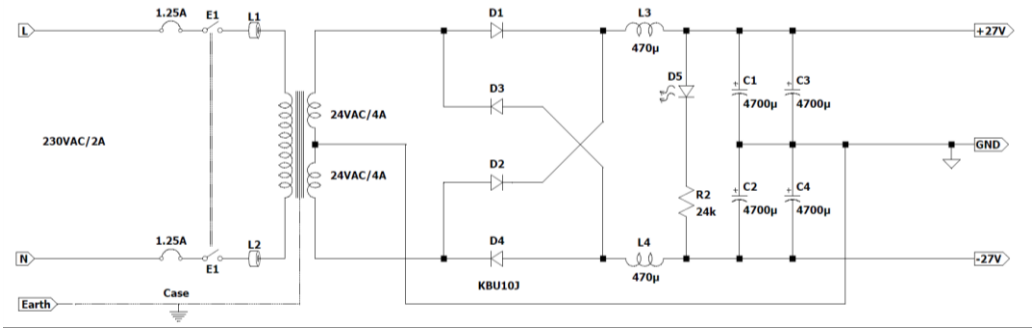


Figura 6-6. Redresor bialternanță cu transformator cu priză mediană *(după D. D. Bonciog și colab.) [87].*

Transformatorul folosit este unul de tip toroidal, cu o tensiune primară de 230VAC, cu priză mediană, care prezintă atât în secundarul 1 și 2 o tensiune de 24V, cu capabilitate de curent de 4A.

Tensiunea efectivă U_{ef}/U_{RMS} este definită de către Storr Wayne ca fiind valoarea de curent continuu, care produce același efect caloric (aceeași putere consumată pentru o sarcină) ca mărimea de curent alternativ luată în considerație [102].

Formula pentru calcul este redată mai jos:

$$V_{ef} = \sqrt{\frac{1}{T}\int_0^T x^2(t)dt} \tag{26}$$

Pentru o formă de undă pur sinusoidală, această valoare efectivă/RMS va fi întotdeauna:

$$V_{ef} = \frac{1}{\sqrt{2}} U_{max} \tag{27}$$

În acest caz tensiunea maximă va fi egală cu Umax ≈ 34V.

În schema din figura 6-7 au fost alese 2 bobine de inductanță 470µH (L_3 și L_4), rezistente la un curent de lucru de 4A pentru a limita curentul de încărcare al condensatorarelor electrolitice C_1, C_2, C_3 și C_4 la aplicarea tensiunii. Totodată, se va avea în vedere folosirea a 2 ferite L_1 și L_2 montate pe cablul de alimentare, care se vor conecta la intrarea amplificatorului de putere pentru a reduce interferența electromagnetică.

Cele două siguranțe fuzibile de 1.25 A de pe liniile de alimentare au fost plasate la intrarea acestui circuit pentru a-l proteja. Când curentul electric depășește această valoare pentru o anumită perioadă de timp, circuitul este întrerupt.

Pentru a demonstra buna funcționare a circuitelor electronice, ansambul D_5 și R_2 este utilizat ca indicator luminos.

Mai departe se vor calcula căderile de tensiune care apar în această schemă:

- Căderile de tensiune pe diodele redresoare (tensiune conducție maximă = 1.1V)

$$V_D = 2 \times 1.1V = 2.2V \tag{28}$$

BUPT

- La frecvența f = 50Hz,

$$X_L = 2 \times \pi \times \mathrm{f} \times \mathrm{L} = 0.148\Omega \quad (29)$$

și produce o cădere de tensiune la 3A, $V_L \approx 0.44V$.

- Căderea de tensiune pentru riplul ce apare la descărcarea condensatorului electrolitic:

$$U_{riplu} = \frac{0.007s \times 3A}{4700uF} \approx 4.47V \quad (30)$$

Tensiunea rămasă va fi:

$$U_{ieşire} = 34V - 2.2V - 0.44V - 4.47V \approx 27V \quad (31)$$

Tensiunea diferenţială rezultată, va fi apoi utilizată pentru a construi un stabilizator de tensiune (figura 6-1. 12), cu rol în menţinerea tensiunii constante a sursei indiferent de cauzele care pot apărea [103].

Utilizarea componentelor pasive pentru construcția acestui stabilizator de tensiune a fost preferată datorită costului de construcție mai mic în comparație cu circuitele integrate dedicate. Această abordare a fost aleasă și datorită faptului că durata de funcționare a acestui proces este de lungă durată și cu un consum de curent considerabil.

De asemenea, este necesar să se limiteze puterea disipată pe un element serie la 8-12W din considerente termice, atunci când se utilizează acest tip de stabilizator. Această restricție are de obicei ca rezultat un număr limitat de elemente de serie pe polaritate.

Pentru a menține efectul de stabilizare chiar și în sarcină maximă, tensiunea de intrare trebuie să rămână cu 4-5V mai mare decât tensiunea de ieșire, caz în care puterea totală disipată la un curent maxim de 4A este de aproximativ:

$$P_{totală} = 5V \times 4A = 20W \quad (32)$$

Folosind acest rezultat, putem determina că se vor folosi două elemente de putere în serie, fiecare dintre ele putând gestiona un curent de 2A.

Din fișa tehnică a amplificatorului operațional, curentul de ieșire a acestuia este de 14mA, la o cădere de tensiune internă de 1V. Tot din considerente termice, se optează pentru un curent de comandă a elementelor serie cât mai mic posibil (≈1mA). Din acest raport al curenților reiese un factor de amplificare global (≈4000) care este necesar elementelor serie pentru a produce un curent de 4A, la un curent de comandă de 1mA.

Elementele de putere serie au fost alese (acestea fiind MJ15022G pentru alternanța pozitivă, respectiv MJ15023G pentru cea negativă, montate pe un radiator), cu un factor de amplificare de doar 40, unde se impune și înserarea a încă unui element. De această dată, acest element este de putere medie, în montaj Darlington cu cel de putere, cu un factor de amplificare minim:

$$\beta_{minim} = \frac{4000}{40} = 100 \quad (33)$$

la un curent de colector de:

BUPT

$$I_c = \frac{4A}{40} = \ 0.1A \tag{34}$$

Puterea disipată maximă va rezulta:

$$P_{max} = 5V \times 0.1A = 0.5W \tag{35}$$

Din elementele ce respectă condiția impusă s-a optat pentru folosirea tranzistoarelor MJE15030, respectiv MJE15031G, ce au un factor de amplificare constant de 150 pe intervalul 0-2A.

Separarea curentului de sarcină pentru cele două elemente de putere serie, implică utilizarea unor rezistențe șunt pentru egalizarea curenților de emitor. Valoarea acestora stabilește, de altfel și limita curentului la care se activează protecția în cazul unui eventual scurt-circuit.

Considerând curentul maxim de sarcină 4A, se alege în mod arbitrar ca limită de activare a acestei protecții să fie la un curent de 6A, valoarea șuntului rezultând astfel:

$$R_{șunt} = \frac{0.65V}{6A} = \ 0.1\Omega \tag{36}$$

Curentul maxim de colector al tranzistorului de protecție rezultă din condiția de scurtcircuit și nu trebuie să depășească limita maximă a curentului de ieșire a amplificatorului operațional, în condiții normale de funcționare (I_{OUT} = 14mA).

Tensiunea calculată este aproximată, luând în considerare o reducere notabilă a tensiunii redresate la curentul de scurtcircuit de 6A, care este cauzată în principal de caracteristica căzătoare a transformatorului. Din fișa tehnică a acestuia se poate alege estimativ valoarea de 26V. Ținând cont de tranzistorul în saturație și neglijând căderea de tensiune colector-emițător se poate calcula rezistența serie de limitare:

$$R_{limitare} = \frac{26V - 1V}{14mA} = \ 1.78k\Omega \tag{37}$$

În acest caz, valoarea standard apropiată de valoarea calculată va fi 1.8kΩ.

Tensiunea de referință este preluată de pe o diodă Zenner alimentată de la un generator de curent constant. Curentul prin diodă este, de asemenea ales arbitrar ca un compromis între zona de tensiune constantă și puterea disipată, adică în jur de 4mA. Puterea disipată pe dioda Zenner va fi:

$$P_{Zenner} = 24V \times 4mA = 0.096W \tag{38}$$

Generatorul de curent constant preia variațiile de tensiune redresate, lăsând dioda Zenner supusă unei tensiuni relativ constantă, îmbunătățind astfel considerabil stabilitatea celei stabilizate. O diodă compensează căderea de tensiune bază emițător, în timp ce a doua constituie sursa de alimentare pentru generatorul de curent constant. Rezistența din emitor determină valoarea reală a curentului:

BUPT

$$R_E = \frac{0.65V}{4mA} = \ 162.5\Omega \tag{39}$$

Valoarea standard, care se apropie de valoarea calculată, în acest caz va fi 180Ω.

Puterea disipată pentru dioda Zener rezultă în funcție de noua valoare a curentului stabilită de generator, astfel:

$$I_{Zenner} = \frac{0.65V}{180\Omega} = \ 3.6mA \tag{40}$$

$$P_{Zenner} = 24V \times 3.6mA \approx 87mW \tag{41}$$

Curentul prin cele două diode este de obicei ales să fie de 10-15 ori mai mare decât cel al bazei tranzistorului. La un factor de amplificare mediu de 100 considerat pentru un tranzistor de mică putere, rezultă:

$$I_{diode} = \frac{3.6mA \times 15}{100} = \ 0.54mA \tag{42}$$

Tensiunea minimă de intrare se calculează din suma căderilor de tensiune pe elementele implicate în lanțul de stabilizare. Astfel, se poate determina căderea de tensiune pe șunt, căderile de tensiune bază-emitor ale elementelor serie, dar și căderea de tensiune pe rezistența de ieșire serie, din amplificatorul operațional:

$$V_{șunt} = 0.1\Omega \times 2A = 0.2V \tag{43}$$

$$V_{be} = 2 \times 0.65V = 1.3V \tag{44}$$

$$V_{R\ limitare} = 1mA \times 1.8k\Omega = 1.8V \tag{45}$$

Rezistența înseriată cu cele două diode se poate estima astfel:

$$R_{diode} = \frac{27V - 2 \times 0.65V}{0.54mA} = \ 47.59k\Omega \tag{46}$$

În acest caz, valoarea standard apropiată de cea calculată va fi de 47kΩ.

Curentul maxim pentru un vârf de tensiune acoperitor, ales arbitrar de valoare 40V se poate calcula ca fiind:

$$I_{max} = \frac{40V - 2 \times 0.65V}{47k\Omega} = \ 0.82mA \tag{47}$$

Iar puterea maximă disipată pe tranzistor, neglijând curentul de bază al acestuia rezultă:

$$P_{Tmax} = (40V - 0{,}65V - 24V) \times 3.6mA = 55mW \tag{48}$$

Schema circuitului de stabilizare, astfel conceput este ilustrată în următoarea figură.

BUPT

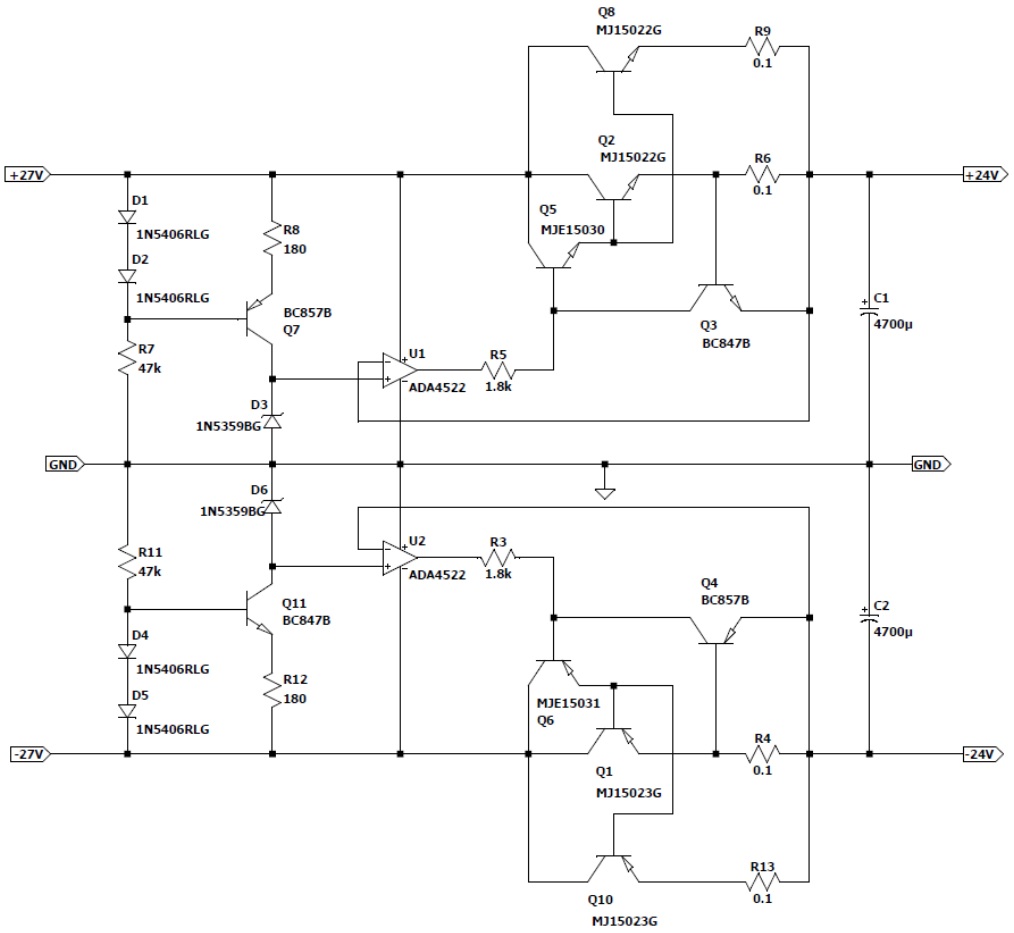


Figura 6-7. Stabilizator de tensiune *(după D. D. Bonciog și colab.) [87].*

6.2.2 Sistemul de monitorizare

Testarea și validarea dispozitivului experimental a fost efectuată prin decelularizarea inimilor a șase șobolani Sprague Dawley, cu o greutate de aproximativ 300 și 400g. Aceștia au fost împărțiți în două loturi egale.

Tehnica recoltării inimilor folosită și în aceste experimente a fost descrisă în capitolul 4.4 și respectă legislația și recomandările actuale în ceea ce privește etica și bunăstarea animalelor de laborator.

Întregul ansamblu experimental se poate observa în figura următoare.

BUPT

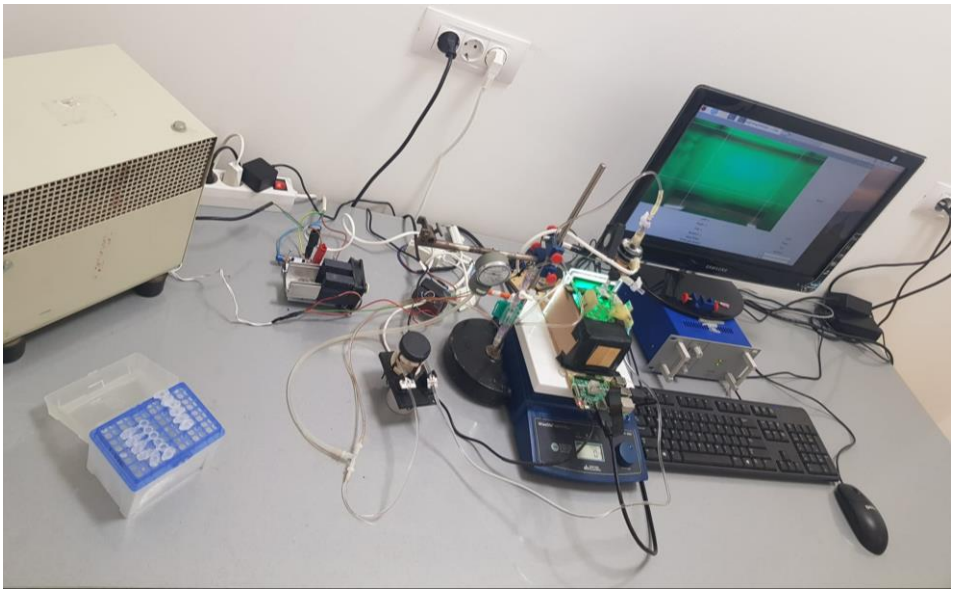


Figura 6-8. Dispozitivul experimental îmbunătățit pentru automatizarea procesului de decelularizare *(după D. D. Bonciog și colab.) [87].*

În aceste experimente realizate, achiziția imaginilor a fost făcută la un interval de 10 secunde („Time get photo" setat la 10 secunde), iar parametrul „stop-time" a fost păstrat 10. S-a ales folosirea unui interval de timp mai mic pentru crearea unei baze de date solide cu imagini biomedicale din cursul experimentelor de decelularizare *in vitro*.

În cadrul acestui studiu inimile șobolanilor au fost împărțite în două loturi:

- Lotul A (n=3 inimi) în cadrul căruia a fost utilizat dispozitivul experimental prevăzut cu o coloană vibrantă de fluid ce realizează suprapunerea unei presiuni hidrostatice oscilatorie cu frecvența de 18Hz peste presiunea de perfuzie;
- Lotul B (n=3 inimi) în cadrul căruia această coloană de fluid vibrantă este nealimentată; acest lot constituind grupul de control pentru validarea datelor experimentale.

Aceste 2 protocoale experimentale sunt prezentate în tabelul de mai jos.

Tabel 6-2. Protocol experimental *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].*

	Coloană vibrantă de fluid
Lotul A (E1)	Da
Lotul B (E2)	Nu (Control)

BUPT

Cinetica procesului de decelularizare de la începutul până la sfârșitul unui experiment utlizând dispozitivul prevăzut cu o coloană vibrantă de fluid, precum și modul de procesare folosit în algoritmul software descris, pot fi examinate din fotografiile aleatorii de mai jos (figura 6-9).

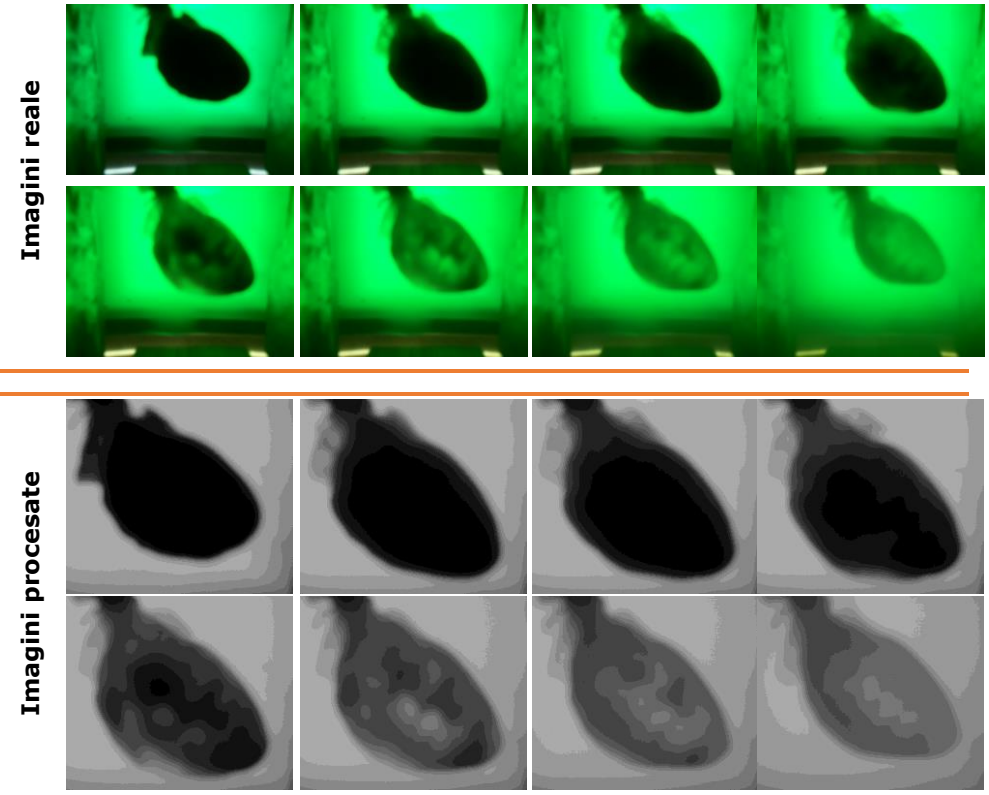


Figura 6-9. Serii de imagini aleatorii ale procesului de decelularizare *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].*

Sistemul de monitorizare a urmărit progresul procesului de decelularizare în timp real, atât pentru lotul de control (E2), cât și pentru primul lot prevăzut cu coloana vibrantă (E1).

Acest sistem a permis evaluarea progresului decelularizării în timp, permițând monitorizarea eficacității metodei și compararea ratelor de decelularizare între cele două loturi.

Rezultatele astfel obținute, au fost apoi prezentate sub formă de valori medii, pentru a putea fi comparate și analizate într-un mod mai precis. Această abordare permite identificarea eventualelor diferențe semnificative între cele două loturi și determinarea efectivității coloanei vibrante ca metodă de accelerare a procesului de decelularizare.

BUPT

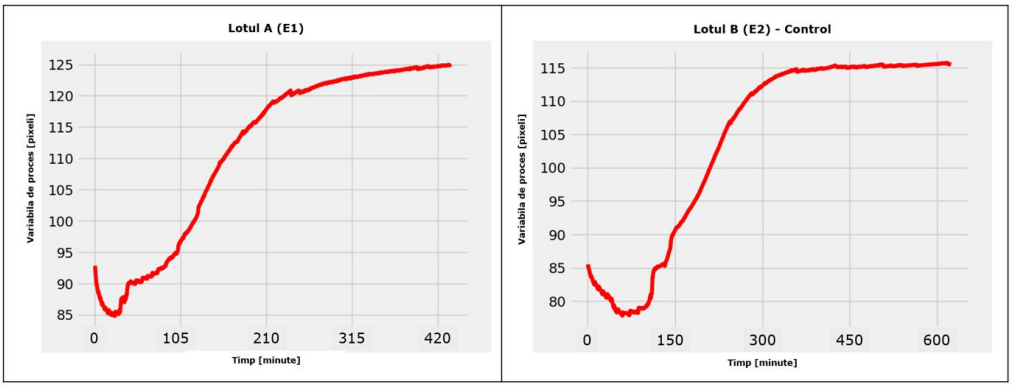


Figura 6-10. Dependenţa „variabilei de proces" în funcţie de timp pentru lotul A și lotul B *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].*

După cum se poate observa, în cazul lotului de control, sistemul de monitorizare al algoritmului software conceput a identificat momentul final al procesului de decelularizare în jurul minutului 600. În schimb eficienţa decelularizării în cazul aplicării vibraţiilor coloanei lichide este ușor determinată în jurul minutului 420.

În acest caz, putem afirma cu încredere faptul că utilizarea unei coloane vibrante de fluid ca instrument pentru decelularizare a arătat rezultate promițătoare în reducerea timpului de decelularizare, care a fost redus cu aproximativ 30% (procent determinat cu ajutorul datelor din figura 6-10).

Pentru a valida aceste rezultate automate ale algoritmului software și pentru a determina gradul de precizie a calității schelelor decelularizate se vor efectua studii comparative de spectrofotometrie în ultraviolet.

6.2.3 Test spectrofotometric

În cadrul acestui dispozitiv experimental volumul soluției de decelularizare a fost de 120 cm^3.

Concentrația de acizi nucleici și proteine din soluția de decelularizare a fost determinată folosind probe de 30µl colectate manual la fiecare 30 de minute ale procesului de decelularizare. Pentru a face aceste determinări a fost folosită tehnica spectrofotometrică în ultraviolet.

Mai jos sunt prezentate rezultatele obținute în urma aplicării protocoalelor experimentale propuse.

Așa-numitul platou al curbei de concentrație sau momentul în care concentrația analitului (fie acid nucleic, fie proteină) atinge o valoare staționară a fost întotdeauna determinat folosind abordarea grafică (figura 6-11), în timp ce tehnica diferențelor succesive (figura 6-12) poate fi deasemenea folosită pentru a indica momentul exact, atunci când se înregistrează o valoare minimă și constantă în care tipul de concentrație (fie ADN, fie proteină) devine semnificatică.

Figura de mai jos ilustrează modul în care concentrația ambilor analiți (proteine și acid dezoxiribonucleic) s-a schimbat pe parcursul experimentelor desfășurate. Graficul arată modul în care concentrația analiților s-a modificat în

BUPT

timp, atingând un platou la un anumit punct. Valoarea platoului poate fi folosită ca indicator al finalizării procesului de decelularizare.

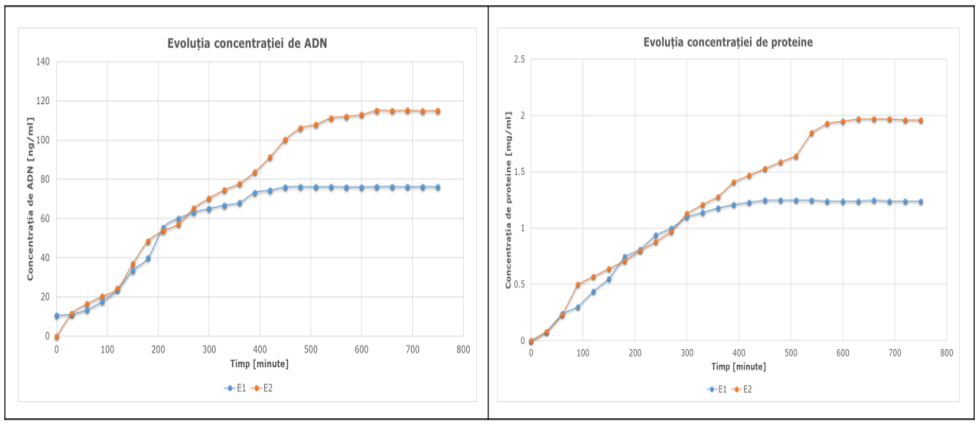


Figura 6-11. Evoluția concentrației de ADN și de proteine (valori medii) *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].*

Algoritmul matematic, care calculează diferențelele dintre două măsurări consecutive pentru fiecare experiment este utilizat pentru a determina momentul final al decelularizării.

Identificarea punctului final de decelularizare pentru fiecare experiment folosind acest algoritm este prezentată mai jos.

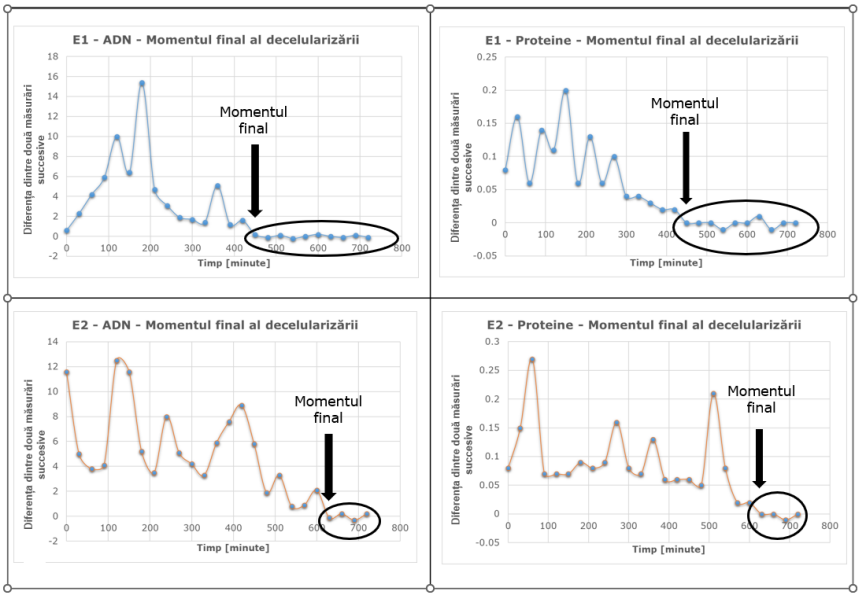


Figura 6-12. Identificarea punctului final de decelularizare pentru fiecare experiment *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].*

BUPT

Eficienţa decelularizării este determinată prin comparație în cazul aplicării vibraţiilor coloanei lichide (E1) faţă de situaţia în care acestea nu sunt aplicate (E2).

În figura de mai jos se poate observa durata medie a fiecărui experiment, ca studiu comparativ.

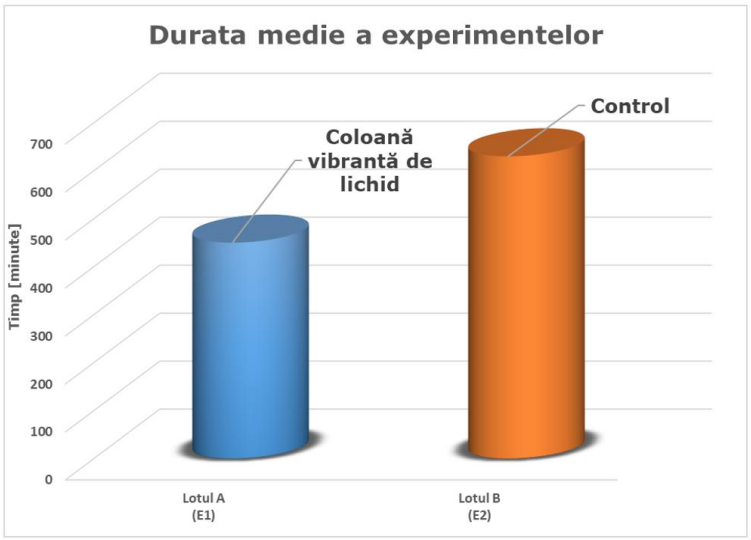


Figura 6-13. Durata medie a fiecărui experiment (studiu comparativ) *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [87].*

În cazul lotului B - E2 (control), se poate observa că momentul final al procesului de decelualarizare a avut loc în 630 de minute. Pentru lotul A – E1, concentrația de ADN/proteine a devenit constantă în 450 de minute de funcționare cu coloana vibrantă de fluid.

Astfel, se poate susține că aplicarea vibrațiilor de joasă frecvență și de amplitudine constantă la coloana de fluid din dispozitiv, reduce durata timpului de decelularizare cu aproximativ 29% (procent determinat și validat cu ajutorul informațiilor furnizate de metoda spectrofotometrică în ultraviolet utilizată).

6.2.4 Concluzii

Utilizarea algoritmului software îmbunătățit, în monitorizarea procesului de decelularizare s-a dovedit a fi precis și de încredere, deoarece rezultatele sale se potrivesc cu cele obținute prin metoda spectrofotometrică, care este o metodă precisă și des folosită pentru evaluarea succesului decelularizării. Acest lucru, indică faptul că algoritmul software îmbunătățit îndeplinește criteriile experimentale necesare într-un mediu fiziologic și poate fi considerat un instrument valid pentru procesul de decelularizare.

Acest studiu prezintă un instrument experimental folosit pentru decelularizarea inimii de șobolan *in vitro*, în prezența unei coloane vibrante de lichid. Dispozitivul experimental dezvoltat s-a dovedit a fi foarte eficient în reducerea timpului necesar decelularizării și asigurarea consistenței procesului. Caracteristica

BUPT

automatizată a dispozitivului, care asigură momentul final al decelularizării inimii este, de asemenea, un avantaj semnificativ, deoarece elimină necesitatea prelevării manuale a probelor și reduce riscul de eroare umană.

Rezultatele acestui studiu sugerează că folosind această legătură între dispozitivul experimental și algoritmul software, poate oferi o metodă eficientă și fiabilă pentru decelularizarea inimilor de șobolan. Această abordare poate avea implicații semnificative în ingineria tisulară și medicina regenerativă, unde țesuturile și organele decelularizate sunt folosite ca schele pentru producerea de țesuturi și organe de înlocuire funcțională.

6.3 Sumarul contribuțiilor

Pornind de la ideea actualizării dispozitivului experimental de tip Langendorff controlat în presiune și prevăzut cu o coloană vibrantă de lichid, care poate grăbi procesul de decelularizare, a fost dezvoltat schema bloc pentru configurația experimentală utilizată pentru decelularizarea inimilor de șobolan.

Ca urmare, s-a adăugat un ansamblu electromagnetic la nivelul canulei, care realizează mișcarea oscilatorie a coloanei de lichid de decelularizare la dispozitivul, care a fost construit anterior.

Funcționarea acestui ansamblu electromagnetic a fost realizată cu ajutorul proiectării unui amplificator de putere. Sursa de alimentare a acestor componente, împreună cu un oscilator/generator de semnal, au fost proiectate în așa fel încât cercetătorul sau medicul va trebui pur și simplu să conecteze cablul de alimentare la o priză pentru a utiliza dispozitivul.

Pornind de la schema bloc, s-au realizat schemele electronice, s-a conceput necesarul de componente, s-a realizat primul prototip și s-a efectuat testarea funcționalității lui.

În cele din urmă, s-a folosit un protocol experimental de decelularizare, utilizând aceeași substanţă tensioactivă (dodecil-sulfat de sodiu). În această etapă de validare a fost utilizat și algoritimul software optimizat.

Durata unui astfel de protocol experimental a fost în medie 630 de minute. Pentru determinarea momentului optim de decelularizare, s-au prelevat probe la intervale orare egale și s-a folosit un spectrofotometru de volume foarte mici pentru a analiza datele experimentale.

Pe baza acestor informații, s-a observat că după 450 de minute, în care s-a folosit coloana vibrantă de lichid, decelularizarea poate fi considerată finalizată, deoarece concentrația acidului dezoxiribonucleic și concentrația de proteine atinge un maxim stabil.

Constatările produse de algoritmul software și cele obținute folosind metoda spectrofotometrică au fost identice, demonstrând că programul software îndeplinește criteriile experimentale într-un mediu fiziologic.

În concluzie, putem afirma că acest dispozitiv conceput experimental este potrivit pentru decelularizarea inimilor de șobolan, deoarece reduce timpul de decelularizare și poate face automat cunoscut momentul final al decelularizarii inimii.

BUPT

7. OPTIMIZAREA PROCESULUI DE DECELULARIZARE PRIN INTERMEDIUL UNEI REȚELE NEURONALE

7.1 Introducere

Cercetarea dinamică a imagisticii medicale se extinde rapid, iar aceasta include algoritmii de învățare profundă (deep learning) și învățare automată (machine learning). Pentru ca un sistem informatic să fie instruit mai târziu, ca un expert care poate fi utilizat pentru predicție și luarea deciziilor, algoritmii de învățare profundă și învățare automată joacă un rol esențial.

Odată cu utilizarea acestor algoritmi, în prezent se fac eforturi semnificative pentru îmbunătățirea aplicațiilor de imagistică medicală [104, 105]. Scopul acestor studii este de a identifica defectele sistemelor de detectare a bolilor, care ar putea duce la terapii/tratamente medicale extrem de ambigue. Algoritmii de învățare profundă și învățare automată sunt esențiale pentru a identifica și prezice cu exactitate semnele bolii precoce. Pentru a evalua imaginile medicale și a extrage date utile care pot sprijini diagnosticul și terapia, aceste abordări folosesc algoritmi de inteligență artificială.

Algoritmii de învățare profundă sunt folosiți frecvent în domeniul imagisticii medicale pentru a finaliza sarcini, inclusiv segmentarea imaginilor, clasificarea și identificarea anomaliilor.

Se pare că o influență semnificativă asupra procesului decizional o are procesarea digitală a imaginilor. Evaluarea funcțională este un proces provocator, cu o gamă largă de caracteristici complexe [106, 107]. În mai multe sisteme informatice diferite, au fost încorporate metode digitale de procesare a imaginilor. Ca urmare, deciziile și acțiunile sunt aduse pe baza metodelor din imagistica medicală, în care domeniul principal este inteligența artificială, care include algoritmi de învățare profundă și învățare automată [108-110]. De exemplu, algoritmii de de învățare profundă pot fi antrenați să recunoască și să evidențieze caracteristici particulare dintr-o imagine, cum ar fi tumori sau artere de sânge, prin procesul de segmentare a imaginii. Aceștia pot fi deasemenea antrenați pentru a diferenția diferite tipuri de imagini, cum ar fi țesutul sănătos și bolnav, dar și pentru a identifica constatări neobișnuite sau anormale în imaginile medicale [111].

Algoritmii de învățare profundă și învățare automată pot fi, de asemenea, utilizate pentru aceste aplicații suplimentare, precum și pentru a îmbunătăți calitatea imaginii, pentru a reduce nevoia de adnotări manuale și pentru a facilita integrarea imaginilor medicale cu alte date ale pacientului. Utilizarea inteligenței artificiale în imagistica medicală are un potențial enorm de a îmbunătăți îngrijirea pacientului, dar și rezultatele.

BUPT

Evaluarea diagnostică a bolii este o sarcină provocatoare în domeniile medicale de astăzi. Înțelegerea diagnosticului precis al unui pacient prin examinare și evaluare medicală este o misiune complicată. Industria medicală generează o mulțime de informații despre evaluările medicale, declarațiile pacienților, tratamente, suplimente, prescripții etc. Problema fundamentală o constituie calitatea acestor rapoarte, care creează impresia de asociere, ca urmare a gestionării necorespunzătoare a datelor [112]. Pentru a extrage și analiza aceste dosare medicale în mod atractiv și eficient, sunt necesare actualizări ale datelor. Există mai multe tehnici de învățare automată disponibile, care folosesc anumiți clasificatori pentru a distribui datele în funcție de aceste calități.

Rețelele neuronale convoluționale sunt frecvent utilizate în abordările de învățare profundă pentru segmentarea și clasificarea problemelor de analiză a imaginilor, cum ar fi detectarea, prognoza și diagnosticarea leziunilor histologice, în timp ce rețelele adversare generative au o abordare diferită, care îmbunătățește setul de antrenament al imaginilor înainte de clasificare, acestea fiind folosite doar ocazional în anumite studii [113].

Rețelele neuronale convoluționale sunt utilizate în mod obișnuit în sarcinile de clasificare și recunoaștere a imaginilor; acestea fiind concepute pentru a procesa și analiza imagini. Așadar, imaginea de intrare este procesată printr-o succesiune de straturi convoluționale și de grupare, în care straturile convoluționale aplică filtre imaginii de intrare pentru a extrage caracteristici, iar straturile de grupare eșantionează imaginea pentru a-i reduce dimensiunea și pentru a păstra cele mai importante părți. Straturile complet legate alcătuiesc ultimele niveluri ale unei astfel de rețele, iar aceste straturi folosesc caracteristicile extrase pentru a efectua operația de clasificare. Pentru aplicații, care includ segmentarea imaginilor, clasificarea și înregistrarea în imagistica medicală, se folosesc astfel de rețele, deoarece relațiile dintre structurile din imagini sunt adesea complexe și dificil de definit manual. Așadar acestea sunt potrivite pentru sarcini în imagistica medicală, datorită capacității lor de a învăța automat reprezentările ierarhice ale datelor vizuale.

Este cunoscut faptul că AlexNet și GoogleNet sunt cele mai răspândite topologii de rețele neuronale convoluționale, care au deschis calea pentru dezvoltarea de astfel de rețele mult mai complexe și mai avansate.

Arhitectura rețelei AlexNet constă din opt straturi cu ponderi. Primele cinci sunt convoluționale, iar celelalte trei sunt complet conectate [114]. Prin ultimul strat complet conectat, rețeaua generează o distribuție pentru cele 1000 de clase de etichete. Această rețea maximizează obiectivul regresiei logistice multinomiale, care măsoară cât de bine se potrivește distribuția predicției etichetelor corecte cu datele de antrenare.

Kernelurile (filtrele) din al doilea, al patrulea și al cincilea strat convoluțional sunt conectate doar la anumite hărți de kerneluri din stratul anterior, toate aflate pe același GPU. În schimb, kernelurile din al treilea strat convoluțional sunt conectate la toate hărțile de kerneluri din stratul anterior. Neuronii din straturile complet conectate sunt conectați la toți neuronii din stratul anterior (figura 7-1).

Rețeaua folosește straturi de normalizare a răspunsului după primul și al doilea strat convoluțional, iar straturile de max-pooling, care reduc dimensiunea

BUPT

datelor, urmează după aceste straturi de normalizare, precum și după cel de-al cincilea strat convoluțional.

Non-linearitatea ReLU este aplicată la ieșirea fiecărui strat convoluțional și complet conectat. Aceasta permite rețelei să învețe și să modeleze mai eficient relații complexe între date. Mai concret, primul strat convoluțional aplică 96 de filtre pe o imagine de intrare de dimensiune 224x224x3. Al doilea strat convoluțional primește ieșirea stratului anterior și aplică 256 de filtre de dimensiune 5x5x48. Al treilea, al patrulea și al cincilea strat convoluțional sunt conectate direct între ele, fără straturi de agregare sau normalizare intermediare. Al treilea strat convoluțional utilizează 384 de filtre de dimensiune 3x3x256, conectate la ieșirea celui de-al doilea strat convoluțional. Al patrulea strat convoluțional folosește 384 de filtre de dimensiune 3x3x192, iar al cincilea strat convoluțional folosește 256 de filtre de dimensiune 3x3x192. Straturile complet conectate au fiecare 4096 de neuroni.

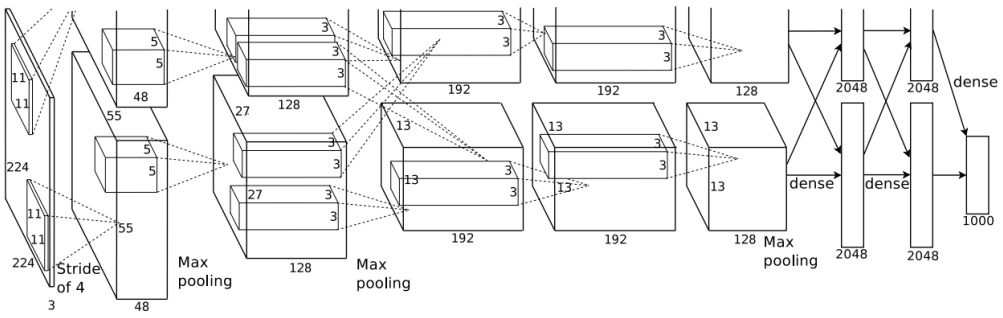


Figura 7-1. Arhitectura rețelei AlexNet *(după Alex Krizhevsky și colab.) [114].*

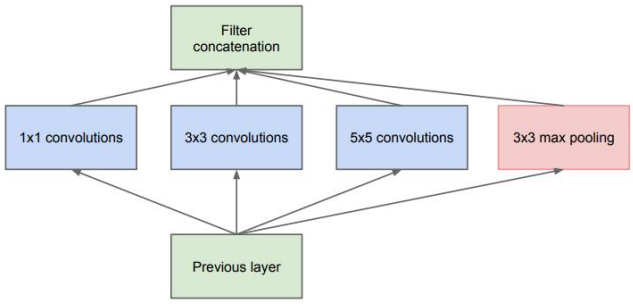
În schimb arhitectura GoogleNet, cunoscută și sub numele de Inception v1, reprezintă un model de rețea neuronală convoluțională dezvoltată de cercetătorii de la Google [115]. GoogleNet este cunoscută pentru soluția descoperită în privința gestionării complexității și eficienței sale, care a dus la obținerea unor performanțe remarcabile în sarcini de clasificare a imaginilor.

Această arhitecură se bazează pe conceptul de grupare a unităților cu corelații înalte din straturile anterioare și conectarea lor la unitățile din straturile următoare. Aceste grupuri de unități reprezintă filtrele pentru straturile ulterioare. În straturile inferioare, unitățile corelate sunt concentrate în regiuni locale, ceea ce permite acoperirea lor cu straturi de convoluții 1×1 în etapele următoare. În primul rând, se utilizează convoluții 1×1 pentru a reduce dimensiunea datelor înainte de convoluțiile costisitoare 3×3 și 5×5, pentru a evita o creștere necontrolată a complexității computaționale. În al doilea rând, se adaugă căi alternative de pooling în fiecare etapă pentru a spori eficiența și pentru a permite prelucrarea informațiilor vizuale la mai multe scale.

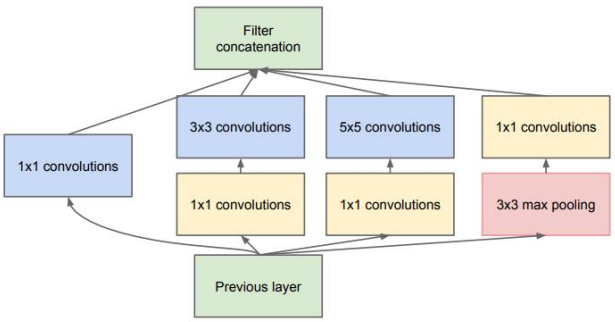
Fiecare modul Inception conține grupuri de unități cu corelații înalte, care sunt conectate la straturile următoare prin convoluții 1×1, 3×3 și 5×5 (figura 7-2. A). În plus, se adaugă căi de pooling paralele în fiecare etapă.

Rezultatul final al arhitecturii prezintă modulele care sunt conectate în cascadă (figura 7-2. B). În straturile superioare, se observă o diminuare a concentrării spațiale a caracteristicilor, ceea ce sugerează o creștere a raportului dintre convoluțiile 3×3 și 5×5 în straturile superioare.

BUPT



a) Modulul de Inception, versiunea naivă



b) Modulul Inception cu reducerea dimensionalității

Figura 7-2. Modul Inception *(adaptare după C. Szegedy și colab.) [115].*

Această arhitectură prezintă un avantaj distinct, acordând posibilitatea de a crește numărul de unități la fiecare etapă fără o creștere explozivă a complexității computaționale, datorită reducerii judicioase a dimensiunii înainte de convoluțiile costisitoare. În plus, abordarea facilitează prelucrarea informațiilor vizuale la multiple scale, conducând astfel la o îmbunătățire a performanței rețelelor de viziune convoluțională.

Cu o abordare inovatoare în dezvoltarea rețelelor de viziune convoluțională, această arhitectură își propune să optimizeze structura locală rară și să faciliteze prelucrarea informațiilor vizuale la diverse scale. Folosind convoluții 1×1 și căi alternative de pooling, se obțin îmbunătățiri semnificative în eficiența computațională și performanța generală a rețelelor de viziune convoluțională.

Influența acestor rețele poate fi observată în creșterea rapidă a învățării profunde, în viziunea computerizată și în adoptarea sa pe scară largă într-o varietate de aplicații, inclusiv imagistica medicală. În timp ce pregătirea lor este o procedură solicitantă din punct de vedere computațional și consumatoare de timp, aceste arhitecturi ating o precizie foarte mare în provocările de clasificare. Există acum o mare varietate de modele VGG, ResNet, DenseNet, Inception.v3, etc., care au fost prezentate, funcționând bine în diferite condiții și parametri [116, 117].

O formă de arhitectură de învățare profundă numită rețele adverse generative constituie ce-a de-a doua abordare aplicată pentru analiza imaginilor digitale [118]. Chiar dacă sunt construite pe concepte de învățare automată

BUPT

nesupravegheată, acestea reprezintă o tehnică inteligentă de a antrena un model pentru o sarcină de învățare supravegheată. Tipic, acestea utilizează două rețele neuronale, un discriminator și un generator, pentru a concura una împotriva celeilalte. În timp ce discriminatorul lucrează pentru a separa aceste mostre sintetice de cele reale, generatorul realizează noi eșantioane cu caracteristici similare, precum imagini. Deci, obiectivul generatorului este să creeze mostre identice cu cele autentice, în timp ce obiectivul discriminatorului este să identifice corect eșantioanele reale.

GAN-urile au avansat rapid, în special în domeniile procesării și clasificării imaginilor, și oferă acum o metodă sofisticată de simulare a imaginilor pentru antrenamentul rețelelor neuronale convoluționale, prevenind în același timp supraantrenamentul și supraadaptarea.

În domeniul ingineriei tisulare, rețelele neuronale convoluționale și rețelele adversare generative pot fi utilizate în mai multe scopuri, cum ar fi:

- Asigurarea calității: CNN-urile pot fi învățate să examineze imagini ale țesuturilor și organelor decelularizate și să prezică calitatea acestora pe baza păstrării arhitecturii matricei extracelulare [119-121].
- Segmentare: pentru a oferi informații precise despre structura țesutului, CNN-urile pot fi antrenate pentru a segmenta diferite zone ale imaginilor țesuturilor decelularizate [122-124].
- Mărirea setului de date: GAN-urile pot genera imagini sintetice ale țesuturilor decelularizate, care pot fi utilizate pentru a suplimenta datele limitate, care sunt disponibile pentru antrenarea unei rețele neuronale convoluționale [125-129].
- Reconstrucția matricei extracelulare: utilizând modelele și proprietățile matricei obținute din țesuturile decelularizate, rețelele adversare generative pot fi folosite pentru a crea structuri artificiale de matrici extracelulare [130-132].

Utilizarea rețelelor neuronale convoluționale și a rețelelor adversare generative în domeniul ingineriei tisulare poate ajuta la îmbunătățirea eficienței și acurateței proceselor de control al calității, segmentării, reconstrucției și poate permite dezvoltarea de aplicații noi și inovatoare în acest domeniu.

7.2 Scopul studiului

Scopul utilizării învățării profunde pentru imagistica medicală este de a automatiza și îmbunătăți analiza complexă a seturilor de imagini biomedicale achiziționate în cursul experimentelor de decelularizare *in vitro*.

Acest studiu își propune analiza cineticii procesului de decelularizare, identificând stadiul procesului de decelularizare, utilizând o rețea neuronală construită cu ajutorul datelor achiziționate în cursul fiecărui experiment.

Din punct de vedere imagistic, gradul de decelularizare a țestului cardiac se corelează întotdeauna cu nivelul de „transparență” a organului studiat și totodată cu concentrația de ADN și proteine, măsurată spectrofotometric în lichidul de decelularizare. Acești parametri vor fi folosiți în proiectarea acestei rețele neuronale.

Această abordare, folosind rețele neuronale pentru evaluarea gradului de decelularizare a inimii este relativ nouă în acest domeniu, dar prezintă un mare potențial pentru îmbunătățirea procesului de decelularizare și mai ales în obținerea de țesuturi/organe cu o funcționalitate cât mai apropiată de cea a organelor umane sănătoase.

BUPT

Totodată, aceasta ar putea fi folosită și pentru a evalua rapid și precis gradul de decelularizare a țesutului cardiac, ceea ce ar putea ajuta la îmbunătățirea calității țesuturilor și organelor bioartificiale produse.

Aplicarea rețelelor neuronale poate permite o analiză mult mai rapidă și mai precisă a datelor colectate din imagini, ceea ce poate duce la o optimizare a procesului de decelularizare.

7.3 Descrierea arhitecturii rețelei neuronale convoluționale

Rețelele neuronale sunt un tip de model de învățare automată utilizat pentru a rezolva diverse probleme de prelucrare a datelor, cum ar fi clasificarea și regresia. Deși au arhitecturi similare, scopul lor diferă semnificativ.

Rețelele neuronale pentru clasificare sunt utilizate pentru a atribui datele de intrare la o anumită clasă dintr-un set de clase predefinite. Aceste rețele se utilizează pentru a rezolva probleme de recunoaștere de obiecte, clasificare de imagini, categorizare de texte etc. Exemple cunoscute de rețele neuronale pentru clasificare includ:

- VGG - acesta este un model de rețea profundă, cu o arhitectură simplă, care a fost utilizat cu succes în concursul ImageNet pentru clasificarea imaginilor în peste 1000 de clase [133].
- ResNet - o arhitectură inovatoare care introduce blocuri reziduale pentru a facilita antrenarea rețelelor extrem de profunde [134].
- DenseNet - o rețea în care fiecare strat este conectat direct la toate straturile din fața sa, ceea ce permite o reutilizare mai eficientă a informațiilor și o îmbunătățire a gradientului [135].
- Inception v3 - o versiune avansată a arhitecturii Inception care folosește convoluții de dimensiuni variate pentru a captura caracteristici la mai multe scale [136].

În schimb, rețelele neuronale pentru regresie sunt utilizate pentru a prezice o valoare numerică continuă ca rezultat, în funcție de datele de intrare. Aceste rețele sunt utile în probleme precum estimarea prețurilor, prognozarea numerică și predicția valorilor continue. Exemple notabile de rețele neuronale pentru regresie includ:

- MLP - acesta este un tip de rețea neuronală cu mai multe straturi ascunse, care este frecvent folosită pentru regresia simplă [137].
- LSTM - o arhitectură de rețea recurentă, potrivită pentru analiza secvențială și regresie în probleme temporale [138].
- GRU - similar cu LSTM, GRU este o altă rețea recurentă eficientă pentru regresie și analiza secvențială [139].
- AlexNet adaptată pentru regresie – folosită pentru pentru a prezice valori continue în loc de clase discrete [140].

Rețelele neuronale pentru clasificare și rețelele neuronale pentru regresie sunt două abordări importante ale învățării automatizate. În timp ce rețelele de clasificare atribuie datele la clase prestabilite, rețelele de regresie prezic valori continue.

În cadrul acestei cercetări, referitoare la analiza concentrațiilor de ADN și proteine, s-a optat pentru adaptarea arhitecturii AlexNet în vederea realizării

BUPT

predicțiilor regresive. Acestă decizie a permis aplicarea tehnicilor de învățare profundă într-un mod adecvat, astfel încât rezultatele să fie optimizate și să ofere predicții precise, asigurând o înțelegere mai profundă a procesului biologic.

Arhitectura rețelei neuronale dezvoltată este inspirată de modelul inițial creat de Alex Krizhevsky și colaboratorii săi, cunoscut sub numele de AlexNet [114], inițial conceput pentru clasificarea imaginilor [141-144]. Însă în contextul specific al acestei cercetări, arhitectura a fost adaptată pentru a soluționa problema specifică menționată, în care imaginile sunt corelate cu valorile de concentrații de ADN și proteine la anumite intervale de timp.

În esență, arhitectura AlexNet a fost simplificată și adaptată pentru regresie, permițând astfel predicția valorilor continue în locul clasificării imaginilor în categorii distincte [145].

O sesiune a unui proces de decelularizare a conținut până la 16,000 de imagini achiziționate, ce prezintă o rezoluție de 1024 x 768 pixeli. Pe durata procesului de decelularizare, intervalele de 30 de minute în care s-au prelevat probe pentru determinările biochimice (concentrațiile de ADN și proteine) au fost notate și corelate cu ora aferentă imaginilor achiziționate.

Pentru a ne asigura că datele de intrare sunt standardizate și comparabile între ele, valorile concentrației de ADN și de proteine pentru fiecare experiment, au fost normalizate și remapate între 0 și 1. Această operațiune de normalizare a datelor ajută la prevenirea efectelor dimensiunii inimii asupra performanței modelului.

În acest caz, modelul creat a fost instruit pe 46938 de imagini. Pentru a îmbunătăți performanța modelului, au fost utilizate tehnici de creștere a datelor, cum ar fi rotirea, răsturnarea și mărirea imaginilor. Aceste metode ajută la creșterea numărului de imagini de antrenament și la prevenirea supraajustării.

În figura de mai jos se poate observa structura arhitecturii rețelei neuronale realizate.

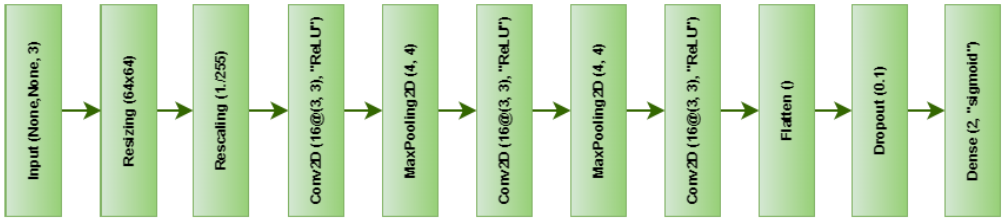


Figura 7-3. Arhitectura rețelei neuronale convoluționale *(după D. D. Bonciog și colab.) [145].*

Această arhitectură de rețea neuronală începe cu un strat de intrare (Input) cu dimensiunea variabilă pentru a permite alimentarea cu imagini de diferite dimensiuni. Următorul strat folosit este cel de redimensionare (Resizing), care modifică dimensiunea imaginilor de intrare la 64x64 pixeli. Apoi, stratul de redimensionare este urmat de un strat de redimensionare a culorii (Rescaling), care normalizează pixelii imaginii între 0 și 1 pentru a ajuta la antrenarea mai rapidă și la îmbunătățirea stabilității modelului. După aceasta, urmează trei straturi consecutive Conv2D și două de MaxPooling2D, care au rolul de a extrage trăsături importante din imagine, prin aplicarea de filtre și reducerea dimensiunii imaginilor. Fiecare strat

BUPT

Conv2D are 16 filtre de dimensiune 3x3 și funcția de activare ReLU, care ajută la eliminarea valorilor negative și la adăugarea de non-linearități.

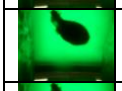
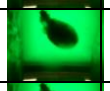
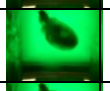
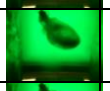
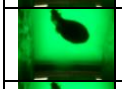
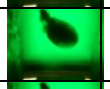
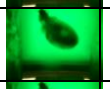
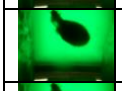
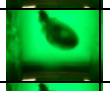
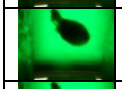
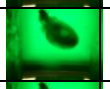
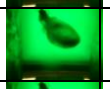
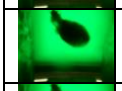
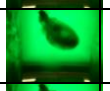
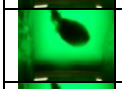
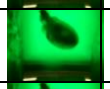
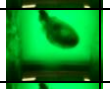
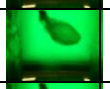
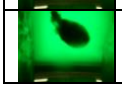
Straturile MaxPooling2D reduc dimensiunea imaginilor cu un factor de 4, astfel încât numărul de parametri ai modelului să nu fie prea mare. După cele trei straturi Conv2D și MaxPooling2D urmează un strat Flatten, care transformă datele într-o formă liniară, pentru a putea fi utilizate de straturile ulterioare. După stratul Flatten, este aplicat un strat Dropout cu o rată de abandon de 0,1, care ajută la prevenirea supraajustării prin eliminarea aleatorie a unor conexiuni între neuroni în timpul antrenării. În final, este adăugat un strat Dense cu 2 neuroni și funcția de activare sigmoid, care produce valorile prezise pentru cele două clase de ieșire.

În cele din urmă, a fost utilizată o funcție de activare (sigmoid) pentru ultimul strat de regresie. Această funcție de activare este ideală pentru problemele de regresie, deoarece limitează valorile prezise între 0 și 1, ceea ce este util la predicția valorilor de tip probabilitate sau la normalizarea valorilor prezise.

7.4 Rezultate și discuții

Modelul de rețea neuronală a fost testat pe un set separat de 2000 de imagini, care nu au fost folosite în timpul antrenării sau validării acestuia. Aceasta este o practică importantă pentru a verifica dacă acest model este capabil să generalizeze și să prezică corect valorile în afara setului de date de antrenament.

Tabel 7-1. Rezultatele de testare *(adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [145].*

Imaginea de test	ADN [%]	Proteine [%]	Imaginea de test	ADN [%]	Proteine [%]	Imaginea de test	ADN [%]	Proteine [%]	Imaginea de test	ADN [%]	Proteine [%]
	5.07	0.48		63.17	52.17		84.79	75.7		98.97	93.15
	7.71	1.28		68.67	57.82		90.15	79.63		99.18	93.85
	10.1	3.1		73.12	61.44		92.4	81.69		99.41	94.7
	21.3	12.49		76.5	64.52		93.13	82.56		99.48	95.02
	28.8	18.65		77.85	65.77		95.29	85.18		99.62	95.67
	36.07	23.95		80.74	70.73		95.71	86.31		99.77	96.58
	41.95	30.24		83.22	74.48		96.54	87.67		99.88	97.53
	50.26	38.55		83.47	74.86		97.99	90.45		99.94	98.26

BUPT

Tabelul 7-1 conține informații despre un sub-set aleator de imagini de testare, în care se regăsește valoarea procentuală prezisă de ADN și de proteine aferentă fiecare imagini achiziționate în diferite etape ale procesului de decelularizare.

În modelele de învățare automată, în care algoritmii sunt proiectați să recunoască modele, este posibil ca modelul să supraajusteze datele, ceea ce înseamnă că modelul va avea succes în recunoașterea modelelor în datele de antrenament, dar nu și în alte seturi de date.

Aceasta poate fi o problemă atunci când modelul este utilizat pentru a lua decizii în situații noi, deoarece modelul poate fi prea bun la recunoașterea modelelor din datele de antrenament, dar nu este bun la recunoașterea modelelor într-o situație nouă.

După finalizarea instruirii, este important să se valideze modelul utilizând un set de date independent. Pentru a evalua performanța modelului pentru fiecare imagine de testare, ar putea fi util să enumerați predicțiile și imaginile de testare.

Eroarea medie pătratică de 0,14% sugerează că modelul are o precizie ridicată în prezicerea valorilor continue pentru această sarcină de regresie.

7.5 Concluzii

Studiul prezintă o abordare inovatoare în domeniul detectării și prezicerii valorilor continue pentru concentrația de ADN și concentrația de proteine, utilizând un model de rețea neuronală convoluțională.

Modelul dezvoltat demonstrează o eficiență deosebită în prezicerea acestor valori, încadrându-se cu precizie în intervalul [0, 100], evidențiind astfel o calibrare corespunzătoare. Prin analizarea erorii medii pătratice de doar 0,14%, acesta confirmă o precizie ridicată, susținând aplicabilitatea sa într-o varietate de contexte practice. De asemenea, s-a observat că modelul are o capacitate superioară de prezicere a concentrației de proteine comparativ cu cea a ADN-ului.

Utilizarea inteligenței artificiale în identificarea decelularizării complete a inimii prezintă un potențial semnificativ în îmbunătățirea procesului de transplant cardiac. Prin aplicarea acestui model, determinarea timpului necesar pentru decelularizarea completă a inimii devine posibilă, facilitând astfel optimizarea acestui proces vital în perspectiva transplantului. Această aplicație deschide calea către viitoare studii de cercetare, care vor putea beneficia de analiza automată a imaginilor în timp real, oferind astfel un control și o îndrumare precisă a procesului de decelularizare, cu potențial deosebit pentru producția în masă de țesuturi și organe bioartificiale.

Pe lângă impactul în domeniul transplantului cardiac, modelul de rețea neuronală convoluțională poate contribui la dezvoltarea de noi tehnici de imagistică medicală pentru analiza și monitorizarea procesului de decelularizare. Validat inițial în analiza imaginilor de decelularizare a țesuturilor cardiace, acest model poate fi adaptat și aplicat în diverse alte domenii ale imagisticii medicale, pentru analiza și optimizarea proceselor similare în alte tipuri de țesuturi și organe. Această abordare inovatoare poate deschide noi orizonturi pentru cercetări viitoare și dezvoltarea de soluții avansate în medicina regenerativă și terapii personalizate.

BUPT

7.6 Sumarul contribuțiilor

Prezentul studiu aduce contribuții semnificative în domeniul optimizării și automatizării procesului de decelularizare a inimilor de șobolan, oferind o nouă perspectivă asupra ingineriei tisulare și dezvoltării algoritmilor de învățare profundă. Scopul cercetării constă în identificarea, proiectarea și validarea unei aplicații software asistată de inteligența artificială, capabilă să analizeze cinetica procesului de decelularizare a acestor inimi.

Pentru atingerea acestui obiectiv, o etapă cheie în dezvoltarea rețelei neuronale a constat în identificarea și optimizarea arhitecturii sale, astfel încât să fie capabilă să modeleze relațiile complexe dintre imaginile de intrare și rezultatele așteptate. Prin intermediul învățării profunde, rețeaua neuronală convoluțională a fost antrenată pentru a realiza o analiză precisă a cineticii procesului de decelularizare a inimilor de șobolan.

Rezultatele obținute sunt remarcabile și deschid noi direcții de cercetare în domeniul ingineriei tisulare. De asemenea, studiul oferă o perspectivă promițătoare pentru dezvoltarea viitoare a algoritmilor de învățare profundă, care ar putea aduce o valoare adăugată semnificativă în procesul de decelularizare a țesuturilor biomedicale.

Evaluarea performanțelor rețelei neuronale a fost o altă etapă crucială în acest studiu. Prin analizarea meticuloasă a metricilor de performanță și a rezultatelor obținute în timpul testelor, s-a putut determina eficacitatea acestei rețele neuronale în analiza cineticii procesului de decelularizare. Astfel, rezultatele au confirmat capacitatea rețelei de a furniza informații esențiale pentru optimizarea și îmbunătățirea procesului de decelularizare a inimilor de șobolan.

În concluzie, această cercetare deschide noi perspective și posibilități în domeniul aplicării inteligenței artificiale pentru ingineria tisulară și terapiile personalizate. Modelul dezvoltat poate servi drept bază pentru dezvoltarea unor aplicații similare în alte domenii ale imagisticii medicale și cercetării biomedicale. Prin optimizarea și automatizarea procesului de decelularizare, se pot deschide noi oportunități pentru producția de țesuturi și organe bioartificiale, contribuind astfel la progresul în medicina regenerativă și îmbunătățirea calității vieții umane.

BUPT

8. CONCLUZII ŞI CONTRIBUŢII PERSONALE

8.1 Concluzii

În acest subcapitol vor fi prezentate concluziile tezei de doctorat și vor fi rezumate contribuțiile autorului.

Cercetările doctorale au vizat domeniul ingineriei tisulare, în mod deosebit orientat pe proiectarea și realizarea unui dispozitiv experimental folosit în procesul de decelularizare a inimilor de șobolan. Diferite aspecte, provocări actuale, protocoale, metode și agenți folosiți până în prezent au fost descrise în primul capitol acestei lucrări.

În capitolul 2 s-a prezentat stadiul actual al cercetărilor din domeniu, s-a clasificat și descris diverse dispozitive și sisteme de decelularizare. Aceste dispozitive și sisteme utilizate până în prezent, în întreaga lume se bazează pe conceptul celui creat de Langendorff, acestea fiind modificate și adaptate nevoilor de perfuzie ale organului, ce urmează a fi supus procesului de decelularizare.

În același timp, interesul și activitatea de cercetare științifică în domeniul ingineriei tisulare au crescut în ultima perioadă. Cu toate acestea, o problemă în procesul de decelularizare este lipsa standardelor universale pentru a evalua finalizarea decelularizării sau dacă un organ a fost decelularizat în mod adecvat.

Capitolul 3 expune obiectivele generale propuse pentru proiectarea și realizarea unui dispozitiv experimental folosit pentru decelularizarea inimilor de șobolan și descrie metoda spectrofotometriei în ultraviolet, folosind un dispozitiv de volume foarte mici (NanoDrop ND-1000), ce a fost folosit pentru diversele determinări ale probelor prelevate în diferitele etape.

Proiectarea și realizarea unui dispozitiv experimental, de tip Langendorff modificat, descris în următorul capitol a fost unul dintre pașii cei mai importanți în aplicarea cunoștințelor dobândite în acest domeniu al electronicii biomedicale.

Acest domeniu a fost abordat în cei doi ani de studii masterale, din cadrul Universității Politehnica, Facultatea de Electronică, Telecomunicaţii și Tehnologii Informaționale, din Timișoara.

Această cercetare are o importanță deosebită pentru doctorand, deoarece oferă prilejul de a putea lucra cu medici, în cadrul centrului de cercetare OncoGen, din Timișoara, dar și posibilitatea de a putea concepe și realiza un dispozitiv experimental în domeniul electronicii biomedicale. Acest dispozitiv Langendorff modificat permite utilizarea inimii întregi de șobolan prin eliminarea ADN-ului și a componentelor celulare. Cercetările viitoare în domeniul ingineriei tisulare vor beneficia de instrumentul util oferit de matricea tridimensională rezultată în urma procesului.

Pentru a obține biomateriale, care pot fi repopulate ulterior cu celule musculare cardiace autologe produse prin diferențierea *in vitro* a celulelor stem mezenchimale, inima de șobolan poate fi decelularizată folosind dispozitivul

BUPT

experimental proiectat și procedura descrisă. O structură de biomatrice tridimensională, complet decelularizată ar trebui să fie produsă de un sistem optim de decelularizare cu cel mai înalt grad de acuratețe și eficiență. Având în vedere succesul general al proiectului, există întotdeauna posibilități de îmbunătățire și dezvoltare, ceea ce va fi extrem de avantajos pentru medicina regenerativă.

În acest caz dispozitivul descris a fost îmbunătățit prin crearea unei aplicații software, care vizează achiziția, procesarea și analiza imaginilor biomedicale care vor fi utilizate în automatizarea procesului de decelularizare a inimii de șobolan prin aplicarea diferitelor protocoale experimentale de decelularizare.

Se cunoaște faptul că decelularizarea este o procedură de lungă durată, care în prezent implică o mulțime de operațiuni manuale și monitorizare. În acest caz, capitolul 5 este destinat proiectării unui sistem de automatizare, care vizează achiziția, procesarea și analiza imaginilor biomedicale, care vor fi utilizate în automatizarea procesului de decelularizare a inimii de șobolan prin aplicarea diferitelor protocoale experimentale de decelularizare.

În subcapitolul 5.1, obiectivele generale propuse, pentru validarea scopului desemnat, au fost realizate și astfel au fost selectate componentele hardware și a fost modificat dispozitivul Langendorff creat, pentru a putea realiza o aplicație software utilizată pentru un sistem, care simulează inimile de șobolan. Următoarele două subcapitole descriu dispozitivul experimental, ce combină cele două părți esențiale ale sistemului (partea fizică - implementarea hardware și partea logică – implementarea software).

Subcapitolul 5.1.6 prezintă rezultatele obținute pentru acest prototip software, ce permite detectarea momentului final al decolorării inimilor simulate.

Pentru a putea valida acest sistem software, s-a utilizat metoda spectrofotometriei în ultraviolet pentru determinarea concetrației de colorant a inimii simulate. În subcapitolul 5.2 am optimizat algoritmul software pentru a determina cu o precizie mai mare momentul final al decolorării inimilor simulate, dar și pentru a rezultate apropiate cu metoda spectrofotometrică clasică.

Sistemul de monitorizare descris în subcapitolul 5.2.5, precum și testul spectrofotometric (subcapitolul 5.2.6) utilizat pentru determinarea concetrațiilor de colorant oferă o validare cu un nivel de precizie foarte ridicat pentru detectarea momentului optim al decolorării inimilor simulate.

Deoarece decelularizarea este un proces în general de lungă durată, capitolul 6 prezintă o îmbunătățire a dispozitivului creat, în cadrul căruia s-a produs o suprapunere a presiunii oscilante, cu o frecvență de 18Hz, peste presiunea de perfuzie. Astfel aplicarea acestor vibrații a permis reducerea duratei de timpul pentru decelularizare cu aproximativ 29-30%.

Rezultatele generate de algoritmul software și cele dobândite folosind metoda spectrofotometrică au fost identice și fără nicio abatere, arătând că algoritmul din software satisface cerințele experimentale în context fiziologic.

Se poate spune că acest echipament experimental este potrivit pentru decelularizarea inimilor de șobolan, ca rezultat al capacității sale de a accelera procesul de decelularizare și de a determina automat momentul final al decelularizarii inimii, generând o structură tridimensională stabilă a acelui organ și adecvată dintr-o perspectivă biomecanică.

Acest lucru demonstrează eficiența și precizia algoritmului software în această aplicație și poate deschide calea pentru noi progrese în cercetarea științifică și medicală.

BUPT

Capitolul final al acestei teze prezintă proiectarea și validarea unei rețele neuronale pentru optimizarea și automatizarea procesului de decelularizare a inimilor de șobolan. Concluziile sugerează că modelul de rețea neuronală convoluțională creat este bine calibrat și are o precizie ridicată în detectarea și prezicerea valorilor continue pentru ADN și proteine

Utilizarea acestei rețele neuronale poate îmbunătăți procesul de transplant cardiac și poate fi utilizată pentru a estima timpul necesar pentru decelularizarea completă a inimii.

În plus, viitoarele studii pot utiliza această rețea neuronală pentru analiza automată a imaginilor în timp real, ceea ce poate fi benefic pentru producția de țesuturi și organe bioartificiale în masă, precum și pentru dezvoltarea de noi tehnici de imagistică medicală.

Anexele tezei de doctorat cuprind:

- Anexa A – aplicația software pentru crearea interfeței cu utilizatorul, realizată pentru automatizarea sistemului folosit în procesul de decelularizare.
- Anexa B – aplicația software realizată pentru automatizarea sistemului folosit în procesul de decelularizare pentru achiziția și procesarea imaginilor biomedicale.
- Anexa C – rețeaua neuronală creată pentru analiza cineticii procesului de decelularizare.
- Anexa D – autorizația sanitară veterinară a unității utilizatorare de animale în scopuri științifice.

8.2 Contribuții propii

În cadrul demersului de cercetare doctorală, am efectuat o analiză asupra a 145 de referințe bibliografice, concomitent cu publicarea unui articol, ca prim autor într-o revistă ISI, clasificată Q2. Am participat cu 5 articole la conferințe indexate în ISI Proceedings, dintre care am fost prim autor pentru 4 dintre ele. De asemenea, am publicat două articole în reviste BDI, fiind prim autor într-unul dintre ele.

În capitolul întâi denumit introducere:

- S-au prezentat provocările actuale, care apar în domeniul de cercetare a ingineriei tisulare, domeniu în care interesul și activitatea de cercetare științifică a crescut.
- S-a prezentat o perspectivă tehnică și inginerească a organelor și țesuturilor umane, care poate fi ușor folosită atât de oamenii de știință, cât și de inginerul biomedical în sistemele fiziologice pentru a proiecta dispozitive de decelularizare, dar și bioreactore pentru a evita atât fenomenele imune, care pot fi foarte severe și de cele mai multe ori au serioase efecte secundare. Din numărul limitat de cazuri umane raportate până în prezent se poate spune ca potențialul acestui domeniu răspunde nevoilor medicale neacoperite.
- Mai departe s-au clasificat protocoalele experimentale, ce sunt folosite în procesele de decelularizare.
- Apoi s-au descris metodele și agenții fizio-chimici utilizați în special pentru anumite organe și țesuturi, având în vedere faptul că este foarte dificil de găsit un agent eficient și universal, care să poată fi folosit în procesele de decelularizare.

BUPT

În capitolul al doilea:

- S-a făcut afirmația că dispozitivele folosite până în prezent, pe plan mondial se bazează pe principiul dispozitivului pus la punct de către Langendorff. Condiția de bază în astfel de dispozitive fiind stabilirea unei presiuni de perfuzie, care să permită decelularizarea organului/ țesutului într-un timp rezonabil și cel mai important lucru fiind să nu se supună rețeaua vasculară a biomatricii la o presiune hidrostatică prea mare, care să determine distrugeri ale arhitecturii, care se dorește a fi obținută.
- Apoi s-a prezentat gruparea sistemelor de decelularizare atât bazate pe perfuzie, cât și bazate pe imersie și agitare cu exemple din literatură.
- Mai departe s-au studiat și dispozitive, dar și sisteme de decelularizare disponibile comercial, care sunt axate pe decelularizare. Acestea, la momentul actual, pe piață sunt doar câteva disponibile.
- S-a concluzionat că la ora actuală nu există un protocol de decelularizare standardizat și foarte bine optimizat, așadar evaluarea finalizării decelularizării permite oamenilor de știință să caute metode și să creeze dispozitive, care pot prezenta o precizie foarte ridicată pentru detectarea momentului optim al procesului de decelularizare, respectiv pentru a crea un construct tridimensional complet recelularizat folosit pentru a fi transplantat.

În capitolul al treilea:

- S-au descris obiectivele generale, ce au ca scop procesul de decelularizare a inimilor de șobolan și găsirea unei căi de automatizare a acesteia.
- În cele din urmă s-au prezentat informațiile unui spectrofotometru de de volum mic, care a fost utilizat în majoritatea măsurărilor efectuate în acest studiu dezvoltat.

În capitolul al patrulea:

- Unul dintre obiective a fost realizat și descris în acest capitol, și anume proiectarea, realizarea, calibrarea și testarea unui dispozitiv experimental de tip Langendoff controlat în presiune pentru decelularizarea inimilor de șobolan.
- În același timp s-au putut valida primele rezultate de decelularizare în acest domeniu al ingineriei tisulare prin aplicarea suportului prezentat în capitolele 1 și 2 împreună cu un protocol experimental de decelularizare aplicat pe inimi reale de șobolan folosind o soluție tensioactivă.
- S-a început prin a stabili cerințele și specificațiile acestui proiect, s-a realizat diagrama bloc aferentă dispozitivului experimental, care a fost folosit pentru decelularizarea inimilor de șobolan și care este alcătuit din două părți funcționale: prima parte este reprezentată de ansamblul hidraulic, iar modulul hardware constituie cea de-a doua parte.
- S-au prezentat componentele acestui sistem, s-a realizat schema electronică și s-a conceput necesarul de componente utilizate.

BUPT

- S-a construit primul prototip și deasemenea a fost testat funcționalitatea lui. Primele teste de decelularizare a inimilor de șobolan au constituit calibrarea dispozitivului, care a implicat un cuantum mare de ore, folosite pentru acest proces de decelularizare de lungă durată.
- După ce calibrarea a fost validată, s-a utilizat un protocol experimental de decelularizare descris în subcapitolul 4.4.
- Durata unui astfel de protocol experimental, stabilirea momentului final al decelularizării și pașii intermediari efectuați sunt descriși în subcapitolul 4.5.

În capitolul al cincilea:

- În subcapitolul 5.1 s-a prezentat realizarea unui sistem automatizat pentru întreg procesul de decelularizare, în care s-a dezvoltat un program software prevăzut cu un sistem de achiziție, prelucrare și analiză a imaginilor biomedicale.
- Pentru realizarea aplicației software s-au selectat componentele hardware pe baza specificaţiilor prestabilite. În plus, s-a adaptat dispozitivul Langendorff modificat pentru decelularizarea inimii de șobolan, descris în capitolul 4, astfel încât să poată fi folosit pentru a simula inima, folosind un balon de latex în care s-a introdus un colorant în cantități suficiente pentru a-i oferi opacitatea unei inimi reale. În acest fel, a fost posibilă proiectarea, modificarea, îmbunătățirea și testarea prototipului inițial al algoritmului software fără a fi nevoie de sacrificarea de inimi reale prelevate de la șobolan.
- Pe baza obiectivelor propuse de la început, s-a conceput diagrama bloc a arhitecturii software. Limbajul de proiectare, care a fost utilizat pentru dezvoltarea algoritmului software este Python și este compatibil cu placa Raspberry Pi, care acționează ca placă de control al arhitecturii hardware.
- După realizarea acestui prim prototip, respectiv testarea funcționalității acestuia s-a putut demonstra că acest sistem detectează momentul final al decolorării inimilor simulate.
- În subcapitolul 5.2 s-a prezentat optimizarea algoritmului software prin găsirea unei validări mai precise a acestui prim prototip, precum și determinarea nivelului de precizie, folosind măsurări ale concentrației de colorant, recurgând și de această dată la metoda spectrofotometrică.
- În acest caz, s-a optimizat algoritmul software pentru a atinge un grad ridicat de asemănare cu metoda spectrofotometrică clasică.
- În final, nu s-au descoperit diferențe între constatările produse de algoritmul software și cele produse prin abordarea spectrofotometrică, demonstrând că aplicația software dezvoltată îndeplinește cerințele experimentale.

În capitolul al șaselea:

- Pornind de la ideea dezvoltării unui dispozitiv, care să permită un timp de expunere a organului supus procesului de decelularizare mai mic, păstrând o structură tridimensională stabilă a acelui organ și adecvată dintr-o perspectivă biomecanică, s-a îmbunătățit

BUPT

dispozitivul experimental, care a fost prevăzut cu coloană vibrantă de lichid, care accelerează procesul de decelularizare.

- S-a adăugat un ansamblu electromagnetic la nivelul canulei, care realizează mișcarea oscilatorie a coloanei de lichid la frecvență joasă (18Hz în acest caz) și de amplitudine constantă ce permite reducerea duratei timpului de decelularizare cu aproximativ 30%.
- Pentru funcționarea acestui ansamblu electromagnetic s-a proiectat și realizat un amplificator de putere, sursa de alimentare pentru componentele sistemului, precum și un oscilator/generator de semnal, astfel încât cercetătorul sau medicul pur și simplu să conecteze cablul de alimentare la o priză pentru a folosi această facilitate.
- În subcapitolul 6.2.2 s-au prezentat rezultatele obținute cu ajutorul sistemului software optimizat de monitorizare, aplicate pe inimi reale, recoltate de la șobolani care oferă o modalitate eficientă de optimizare a procesului de decelularizare.
- În subcapitolul 6.2.3 nu s-a descoperit diferențe între rezultatele obținute de algoritmul software și cele produse prin abordarea spectrofotometrică utilizată, acest lucru demonstrând că aplicația software dezvoltată satisface cerințele experimentale, iar întregul dispozitiv reduce timpul de decelularizare și face automat cunoscut momentul final al decelularizarii inimii.

În capitolul al șaptelea:

- S-a dezvoltat o aplicație software cu ajutorul inteligenței artificiale, care poate analiza procesul de decelularizare a inimilor de șobolan. Aceasta reprezintă o contribuție importantă în ingineria tisulară și deschide noi direcții de cercetare în dezvoltarea algoritmilor de învățare profundă, cu utilitate în ingineria tisulară.
- O provocare majoră în dezvoltarea acestei rețele neuronale a fost optimizarea arhitecturii și interpretarea performanțelor, prin analizarea metricilor de performanță și a rezultatelor obținute în timpul testelor. Aceste cercetări au potențialul de a îmbunătăți procesul de transplant cardiac și de a dezvolta noi tehnici de imagistică medicală.

8.3 Direcții viitoare de cercetare

Cercetările viitoare se vor axa atât pe componentele hardware și software, proiectate și realizate în cursul studiilor doctorale. Analiza în timp real a parametrilor de decelularizare obiectivați sub forma unor imagini și a unor evaluări fizico-chimice implică crearea unor baze de date mari, pentru a căror managament este necesară perfecționarea algoritmilor de inteligență artificială implementați cu ajutorul rețelei neuronale dezvoltate.

Cercetările viitoare vizează o analiză comparativă a diferitelor arhitecturi de rețea neuronală. În special, se va aprofunda într-un studiu comparativ, ce va conține arhitectura de regresie Alexnet, alături de arhitecturile VGG, ResNet, Densnet și Inception.v3, precum și combinații ale acestora. Prin comparația acestor arhitecturi, va fi posibilă obținerea unor indicatori de predicție mai buni pentru diferitele arhitecturi utilizate cu algoritmi de regresie. În acest fel, va fi posibilă

BUPT

compararea erorii medii pătrate pentru diferitele arhitecturi de rețea neuronală implementate și deciderea rețelei neuronale, care estimează cel mai bine concentrația de ADN și concentrația de proteine, care la ora actuală reprezintă standardul de aur al evaluării nonmicroscopice, aproape în timp real al procesului de decelularizare.

Un alt aspect important al cercetărilor viitoare implică optimizarea atât a dispozitivului cât și a aplicației software. Această optimizare își propune să faciliteze și obținerea altor biomatrici provenite din organe cu arhitectură mult mai complexă și de dimensiuni mai mari, decât cea cardică (ficat și rinichi).

În plus, o altă viitoare direcție de cercetare se referă la punerea la punct a unor protocoale de decelularizare, ce utilizează diverși agenți chimici, cât mai puțin nocivi pentru biomatricea obținută, precum și asocierea unor agenți fizici complecși, astfel încât să se scurteze și mai mult durata acestui proces.

O îmbunătățire în cercetările viitoare vizează și integrarea rețelelor adversare generative pentru creșterea cantității de informație prelucrată, ceea ce este un punct important pentru avansarea algoritmilor de inteligență artificială. Această integrare devine necesară pentru a obține reprezentări mai autentice și mai bogate în date, contribuind astfel la îmbunătățirea preciziei și aplicabilității rețelei neuronale dezvoltate.

Utilizarea metodelor de inteligență artificială în domeniul ingineriei tisulare, terapiei celulare și a medicinei regenerative creează premisele obținerii rapide și de bună calitate a unor structuri morfofuncționale adecvate utilizării de rutină în tratamentul afecțiunilor cronice degenerative, cu care se vor confrunta tot mai frecvent generațiile viitoare de indivizi.

BUPT

BIBLIOGRAFIE

[1] Ward, Alyssa, et al. "Social, economic, and policy implications of organ preservation advances." Current Opinion in Organ Transplantation 23.3 (2018): 336.
[2] Crapo, Peter M., Thomas W. Gilbert, and Stephen F. Badylak. "An overview of tissue and whole organ decellularization processes." Biomaterials 32.12 (2011): 3233-3243.
[3] Hawkins, John A., et al. "Immunogenicity of decellularized cryopreserved allografts in pediatric cardiac surgery: comparison with standard cryopreserved allografts." The Journal of thoracic and cardiovascular surgery 126.1 (2003): 247-252.
[4] Murray, Joseph E. "Organ transplantation: the practical possibilities." Ciba Foundation Symposium-Ethics in Medical Progress: with Special Reference to Transplantation. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 1966.
[5] Gilbert, Thomas W., Tiffany L. Sellaro, and Stephen F. Badylak. "Decellularization of tissues and organs." *Biomaterials* 27.19 (2006): 3675-3683.
[6] Uygun, Basak E., et al. "Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix." Nature medicine 16.7 (2010): 814-820.
[7] Brown, Bryan, et al. "The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix." Tissue engineering 12.3 (2006): 519-526.
[8] Harrison, Benjamin S., et al. "Oxygen producing biomaterials for tissue regeneration." Biomaterials 28.31 (2007): 4628-4634.
[9] Pedraza, Eileen, et al. "Preventing hypoxia-induced cell death in beta cells and islets via hydrolytically activated, oxygen-generating biomaterials." Proceedings of the National Academy of Sciences 109.11 (2012): 4245-4250.
[10] Bradley, J. Andrew, Eleanor M. Bolton, and Roger A. Pedersen. "Stem cell medicine encounters the immune system." Nature Reviews Immunology 2.11 (2002): 859-871.
[11] Bhumiratana, Sarindr, et al. "Principles of bioreactor design for tissue engineering." Principles of tissue engineering. Academic Press, 2014. 261-278.
[12] Tayebi, T., et al. "Effects of Different Perfusing Routes through The Portal Vein, Hepatic Vein, and Biliary Duct on Whole Rat Liver Decellularization." Cell Journal 25.1 (2023): 35-44.
[13] Fooladi, Saba, et al. "An efficient strategy to recellularization of a rat aorta scaffold: an optimized decellularization, detergent removal, and Apelin-13 immobilization." Biomaterials Research 26.1 (2022): 46.
[14] Rahmati, Shima, et al. "An Effective Method for Decellularization of Human Foreskin: Implications for Skin Regeneration in Small Wounds." Cell Journal (Yakhteh) 24.9 (2022).
[15] Rahmati, Shima, et al.Haeublein, Geraldine, et al. "Human Endothelial Cell Seeding in Partially Decellularized Kidneys." BioMed Research International 2022

(2022). "An Effective Method for Decellularization of Human Foreskin: Implications for Skin Regeneration in Small Wounds." Cell Journal (Yakhteh) 24.9 (2022).
[16] Huang, Senli, Haigang Sun, and Wenquan Sun. "Physical and chemical properties of porcine dermis matrix affected by process integration for decellularization, viral inactivation and sterilization." Chinese Journal of Tissue Engineering Research 27.21 (2023): 3349.
[17] Fooladi, Saba, et al. "An efficient strategy to recellularization of a rat aorta scaffold: an optimized decellularization, detergent removal, and Apelin-13 immobilization." Biomaterials Research 26.1 (2022): 46.
[18] Panahi, Fatomeh, et al. "Analysis of decellularized mouse liver fragment and its recellularization with human endometrial mesenchymal cells as a candidate for clinical usage." Progress in Biomaterials 11.4 (2022): 409-420.
[19] Terek, Julia C., Matthew O. Hebb, and Lauren E. Flynn. "Development of Brain-Derived Bioscaffolds for Neural Progenitor Cell Culture." ACS Pharmacology & Translational Science (2023).
[20] Tayebi, T., et al. "Effects of Different Perfusing Routes through The Portal Vein, Hepatic Vein, and Biliary Duct on Whole Rat Liver Decellularization." Cell Journal 25.1 (2023): 35-44.
[21] Qian, Hu, et al. "Decellularized matrix for repairing intervertebral disc degeneration: Fabrication methods, applications and animal models." Materials Today Bio (2022): 100523.
[22] Meyer, Tanja, et al. "Decellularized Porcine Pericardium Enhances Autologous Vascularized Matrix as a Prosthesis for Left Ventricular Full-Wall Myocardial Reconstruction." Prosthesis 5.1 (2023): 113-129.
[23] Yu, Tsong-Hann, et al. "Preparation and characterization of extracellular matrix hydrogels derived from acellular cartilage tissue." Journal of Functional Biomaterials 13.4 (2022): 279.
[24] Robins, Peter, et al. "Structural and functional homology between mammalian DNase IV and the 5'-nuclease domain of Escherichia coli DNA polymerase I." Journal of Biological Chemistry 269.46 (1994): 28535-28538.
[25] Kabirian, Fatemeh, and Masoud Mozafari. "Decellularized ECM-derived bioinks: Prospects for the future." Methods 171 (2020): 108-118.
[26] Awad, T. S., et al. "Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review." Food research international 48.2 (2012): 410-427.
[27] Welch, E. Celeste, Harry Yu, and Anubhav Tripathi. "Optimization of a clinically relevant chemical-mechanical tissue dissociation workflow for single-cell analysis." Cellular and Molecular Bioengineering 14 (2021): 241-258.
[28] Cortiella, Joaquin, et al. "Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation." Tissue Engineering Part A 16.8 (2010): 2565-2580.
[29] Gulati, Adarsh K. "Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve." Journal of neurosurgery 68.1 (1988): 117-123.
[30] Hopkinson, Andrew, et al. "Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering." Tissue Engineering Part C: Methods 14.4 (2008): 371-381.
[31] Al-Sakere, Bassim, et al. "Tumor ablation with irreversible electroporation." PloS one 2.11 (2007): e1135.

BUPT

[32] "A Potential Boon for Pancreatic Cancer Patients". Johns Hopkins Surgery: News From the Johns Hopkins Department of Surgery. 2014-06-23.
[33] Broadley, K. J. "The Langendorff heart preparation—reappraisal of its role as a research and teaching model for coronary vasoactive drugs." Journal of Pharmacological Methods 2.2 (1979): 143-156.
[34] Ott, Harald C., et al. "Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart." Nature medicine 14.2 (2008): 213-221.
[35] Nakayama, Karina H., et al. "Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering." Tissue Engineering Part A 16.7 (2010): 2207-2216.
[36] Robinson, Keith A., et al. "Extracellular matrix scaffold for cardiac repair." Circulation 112.9_supplement (2005): I-135.
[37] Choudhury, Deepak, et al. "Decellularization systems and devices: State-of-the-art." Acta biomaterialia 115 (2020): 51-59.
[38] Aamodt, Joseph M., and David W. Grainger. "Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response." Biomaterials 86 (2016): 68-82.
[39] Lu, Hongxu, et al. "Comparison of decellularization techniques for preparation of extracellular matrix scaffolds derived from three-dimensional cell culture." Journal of Biomedical Materials Research Part A 100.9 (2012): 2507-2516.
[40] Meyer, Steven R., et al. "Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat." Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials 79.2 (2006): 254-262.
[41] Ott, Harald C., et al. "Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung." Nature medicine 16.8 (2010): 927-933.
[42] Young, Bethany M., et al. "A Two-Step Bioreactor for Decellularized Lung Epithelialization." Cells Tissues Organs 210.4 (2021): 301-310.
[43] Guyette, Jacques P., et al. "Perfusion decellularization of whole organs." Nature protocols 9.6 (2014): 1451-1468.
[44] Fernández-Pérez, Julia, and Mark Ahearne. "The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels." Scientific reports 9.1 (2019): 14933.
[45] Poornejad, Nafiseh, et al. "Efficient decellularization of whole porcine kidneys improves reseeded cell behavior." Biomedical Materials 11.2 (2016): 025003.
[46] Price, Andrew P., et al. "Automated decellularization of intact, human-sized lungs for tissue engineering." Tissue Engineering Part C: Methods 21.1 (2015): 94-103.
[47] Sullivan, David C., et al. "Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system." Biomaterials 33.31 (2012): 7756-7764.
[48] Casali, Dominic M., et al. "A novel supercritical CO2-based decellularization method for maintaining scaffold hydration and mechanical properties." The Journal of Supercritical Fluids 131 (2018): 72-81.

BUPT

[49] Struecker, Benjamin, et al. "Improved rat liver decellularization by arterial perfusion under oscillating pressure conditions." Journal of tissue engineering and regenerative medicine 11.2 (2017): 531-541.
[50] Struecker, Benjamin, et al. "Porcine liver decellularization under oscillating pressure conditions: a technical refinement to improve the homogeneity of the decellularization process." Tissue Engineering Part C: Methods 21.3 (2015): 303-313.
[51] Skardal, Aleksander, et al. "A hydrogel bioink toolkit for mimicking native tissue biochemical and mechanical properties in bioprinted tissue constructs." Acta biomaterialia 25 (2015): 24-34.
[52] Choi, Yeong-Jin, et al. "3D cell printing of functional skeletal muscle constructs using skeletal muscle-derived bioink." Advanced healthcare materials 5.20 (2016): 2636-2645.
[53] Pati, Falguni, et al. "Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink." Nature communications 5.1 (2014): 3935.
[54] Ross, Jeffrey. "Use of perfusion decellularized organs for matched recellularization." U.S. Patent Application No. 13/173,400.
[55] Ross, Jeffrey. "Methods of decellularizing bone. ",Patent U.S. (Ed.), Miromatrix Medical Inc., Eden Prairie, MN (US), United States, 2016 United States Patent .
[56] Ott, Harald, and Doris Taylor. "Decellularization and recellularization of organs and tissues." U.S. Patent No. 8,470,520. 25 Jun. 2013.
[57] Moreno, Karyne Garcia Tafarelo, et al. "A new approach for the development of multiple cardiovascular risk factors in two rat models of hypertension." Pharmaceuticals 15.7 (2022): 853.
[58] Motayagheni, Negar. "Modified Langendorff technique for mouse heart cannulation: improved heart quality and decreased risk of ischemia." MethodsX 4 (2017): 508-512.
[59] Ebers Medical, "Static tubular chamber overview." https://ebersmedical.com/ 154-products/bioreactors/flow-culture/tubular-chambers, last accessed 12.09.2021.
[60] Harvard Apparatus, "HPC-3, Hydrostatic Perfusion Chamber for Organ and Tissue Decellularization." http://www.harvardapparatus.com/media/harvard/pdf/ RM1 _ 54.pdf, last accessed 16.09.2021.
[61] Harvard Apparatus, "ORCA Bioreactors. " http://www.hoeferinc.com/media/wysiwyg/HART/PDFs/ORCA%20Bioreactor.pdf, last accessed 18.10.2021.
[62] Philips, Charlot, Maria Cornelissen, and Víctor Carriel. "Evaluation methods as quality control in the generation of decellularized peripheral nerve allografts." Journal of neural engineering 15.2 (2018): 021003.
[63] Thermo Fisher Scientific, "NanoDrop Microvolume Spectrophotometers", www.nanodrop.com, last accessed 14.08.2021.
[64] Mäntele, Werner, and Erhan Deniz. "UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded." Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 173 (2017): 965-968.
[65] **D. Bonciog**, V. Ordodi, L. Mâțiu-Iovan, G. Bărbuelscu, C. Burian, D. Goje, P. Buică, V. Păunescu Modified Langendoff device for rat heart decellularization. Timișoara : Fiziologia-Physiology, Vol. 2., pp. 17- 20, 2019.

BUPT

[66] **Daniel Bonciog**. Lucrare de disertatie, UPT, Timisoara, 2020.
[67] **Bonciog, Daniel Dumitru**, et al. "Modified Langendorff experimental device for rat heart decellularization with a vibrating fluid column." 2020 International Symposium on Electronics and Telecommunications (ISETC). IEEE, 2020.
[68] Weymann, Alexander, et al. "Development and Evaluation of a Perfusion Decellularization Porcine Heart Model–Generation of 3-Dimensional Myocardial Neoscaffolds–." Circulation Journal 75.4 (2011): 852-860.
[69] Weymann, Alexander, et al. "In vitro generation of atrioventricular heart valve neoscaffolds." Artificial organs 38.7 (2014): E118-E128.
[70] Traian Jurca, Dan Stoiciu, "Instrumentație de măsurare. Structuri și circuite. " Editura de Vest, Timișoara, 1996.
[71] Perju D, Suta M, Todincă T, Rusnac C. "Echipamente de automatizare pneumatice de joasa presiune. Aplicaţii. " Pneumatica Collection, Politehnica Timisoara Ed., 2001.
[72] Perju D, Suta M, Rusnac C, Brusturean GA. "Automatizarea proceselor chimice. Aplicaţii. " Pneumatica Collection, Politehnica Timisoara Ed., 2005
[73] Ionescu G et al. "Traductoare pentru automatizări industriale. Vol I. Ciclul manualului inginerului automatist. " Tehnica Bucharest Ed., 1985.
[74] Badylak, Stephen F., et al. "Engineered whole organs and complex tissues." The Ethical Challenges of Emerging Medical Technologies. Routledge, 2020. 317-326.
[75] Toma IC, Gui V, Otesteanu M. "Dispozitive si circuite electronice. Partea a II-a. Circuite electronice." Institutul Politehnic ”Traian Vuia” Timisoara, Facultatea de Electrotehnică, 1984.
[76] Blasig, Ingolf E., et al. "Inverse relationship between ESR spin trapping of oxyradicals and degree of functional recovery during myocardial reperfusion in isolated working rat heart." Cardiovascular research 24.4 (1990): 263-270.
[77] Chen, Zuolei, Tianzuo Li, and Bingxi Zhang. "Morphine postconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts." Journal of Surgical Research 145.2 (2008): 287-294.
[78] Mirica, N., et al. "Dichotomic effects of Diayoxide and Cyclosporine A on contractile function and infarct size in Langendorff perfused rat hearts." Proceedings of 8th International Congress on Coronary Artery Disease. 2009.
[79] Manta I, Cucuianu M, Benga G, Hodârnău A. "Metode biochimice în laboratorul clinic. " Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1976.
[80] www.promega.ro/resources, last accessed 14.08.2021.
[81] **Bonciog, Dumitru Daniel**, et al. "Software Validation For Automatic Heart Decellularization." 2021 16th International Conference on Engineering of Modern Electric Systems (EMES). IEEE, 2021.
[82] Mayerhöfer, Thomas G., Andrei V. Pipa, and Jürgen Popp. "Beer's Law-Why Integrated Absorbance Depends Linearly on Concentration." ChemPhysChem 20.21 (2019): 2748-2753.
[83] Gadagkar, Sudhindra R., and Gerald B. Call. "Computational tools for fitting the Hill equation to dose–response curves." Journal of Pharmacological and Toxicological methods 71 (2015): 68-76.
[84] Maghsoudlou, Panagiotis, et al. "Optimization of liver decellularization maintains extracellular matrix micro-architecture and composition predisposing to effective cell seeding." PloS one 11.5 (2016): e0155324.

BUPT

[85] Hashimoto, Yoshihide, et al. "Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering." Biomaterials 31.14 (2010): 3941-3948.
[86] **Bonciog, Dumitru Daniel**, et al. "Software Optimization used to Automate Decellularization." 2022 International Symposium on Electronics and Telecommunications (ISETC). IEEE, 2022.
[87] **Bonciog, Dumitru-Daniel**, et al. "Automation and Optimization of Rat Heart Decellularization Using a Vibrating Fluid Column." Sensors 23.8 (2023): 4045.
[88] Rolinger, Laura, Matthias Ruedt, and Juergen Hubbuch. "A critical review of recent trends, and a future perspective of optical spectroscopy as PAT in biopharmaceutical downstream processing." Analytical and Bioanalytical Chemistry 412 (2020): 2047-2064.
[89] Baan, Carla C. "Basic sciences in development: what changes will we see in transplantation in the next 5 years?." Transplantation 100.12 (2016): 2507-2511.
[90] Valenzuela, Nicole M., and Elaine F. Reed. "Antibody-mediated rejection across solid organ transplants: manifestations, mechanisms, and therapies." The Journal of clinical investigation 127.7 (2017): 2492-2504.
[91] Azhim, A., et al. "Decellularization of meniscal tissue using ultrasound chemical process for tissue-engineered scaffold applications." 6th World Congress of Biomechanics (WCB 2010). August 1-6, 2010 Singapore: In Conjunction with 14th International Conference on Biomedical Engineering (ICBME) and 5th Asia Pacific Conference on Biomechanics (APBiomech). Springer Berlin Heidelberg, 2010.
[92] Azhim, Azran, et al. "Preparation of decellularized meniscal scaffolds using sonication treatment for tissue engineering." 2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC). IEEE, 2013.
[93] Azhim, A., et al. "The use of sonication treatment to decellularize aortic tissues for preparation of bioscaffolds." Journal of biomaterials applications 29.1 (2014): 130-141.
[94] Hazwani, Aqilah, Munirah Sha'ban, and Azran Azhim. "Structural Integrity of Aortic Scaffolds Decellularized by Sonication Decellularization System." 2018 IEEE-EMBS Conference on Biomedical Engineering and Sciences (IECBES). IEEE, 2018.
[95] Mason, Timothy J. "Sonochemistry and sonoprocessing: the link, the trends and (probably) the future." Ultrasonics Sonochemistry 10.4-5 (2003): 175-179.
[96] Burian Caius Alexandru, Teză de doctorat, UMF "V. Babeș" Timișoara, 2017.
[97] Hood, John L. Linsley. "80-100 WATT MOSFET AUDIO AMPLIFIER." Wireless World 88.1557 (1982): 40-42.
[98] Bishop, Graham, and Graham Bishop. "Power Amplifiers." Audio Circuits and Projects (1985): 61-97.
[99] Kalyani, Vijaylaxmi, Shreya Surana, and Summaiya Syed. "Design and Simulation of VFOA Based Wein Bridge Oscillator Using NI Multisim and Ultiboard and their Applications."
[100] Keskin, A. "Wien Bridge oscillator performances using current and voltage feedback amplifiers." IJCI Proceedings of International Conference on Signal Processing. Vol. 1. 2003.

BUPT

[101] Sabin, Ionel. "Dispozitive electronice și optoelectronice." Politehnica Timișoara, 2014.
[102] Storr, Wayne. "Basic Electronics Tutorials." Retrieved 12.10 (2014): 2014.
[103] Horowitz, Paul. "The art of electronics. Third edition", Cambridge University Press, 2015.
[104] Goodfellow, Ian, Yoshua Bengio, and Aaron Courville. Deep learning. MIT press, 2016.
[105] Kim, M., et al. "Deep Learning in Medical Imaging. Neurospine 2019, 16, 657–668."
[106] Mahesh, Mahadevappa. "Fundamentals of medical imaging." Medical Physics 38.3 (2011): 1735-1735.
[107] Doi, Kunio. "Computer-aided diagnosis in medical imaging: historical review, current status and future potential." Computerized medical imaging and graphics 31.4-5 (2007): 198-211.
[108] Norris, Donald J., and Donald J. Norris. "Machine learning: deep learning." Beginning artificial intelligence with the raspberry pi (2017): 211-247.
[109] Michalski, Ryszard Stanislaw, Jaime Guillermo Carbonell, and Tom M. Mitchell. Machine learning an artificial intelligence approach. by Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo in 1983, 1984.
[110] Jankowski, Norbert, and Marek Grochowski. "Comparison of instances seletion algorithms i. algorithms survey." Artificial Intelligence and Soft Computing-ICAISC 2004: 7th International Conference, Zakopane, Poland, June 7-11, 2004. Proceedings 7. Springer Berlin Heidelberg, 2004.
[111] Jirik, Miroslav, et al. "Semantic segmentation of intralobular and extralobular tissue from liver scaffold H&E images." Sensors 20.24 (2020): 7063.
[112] Warwick, William, et al. "A framework to assess healthcare data quality." The European Journal of Social & Behavioural Sciences (2015).
[113] Davri, Athena, et al. "Deep Learning on Histopathological Images for Colorectal Cancer Diagnosis: A Systematic Review." Diagnostics 12.4 (2022): 837.
[114] Krizhevsky, Alex, Ilya Sutskever, and Geoffrey E. Hinton. "Imagenet classification with deep convolutional neural networks." Communications of the ACM 60.6 (2017): 84-90.
[115] Szegedy, Christian, et al. "Going deeper with convolutions." Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition. 2015.
[116] Huang, Gao, et al. "Densely connected convolutional networks." Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition. 2017.
[117] Simonyan, Karen, and Andrew Zisserman. "Very deep convolutional networks for large-scale image recognition." arXiv preprint arXiv:1409.1556 (2014).
[118] Goodfellow, Ian, et al. "Generative adversarial networks." Communications of the ACM 63.11 (2020): 139-144.
[119] Ng, Wei Long, et al. "Deep learning for fabrication and maturation of 3D bioprinted tissues and organs." Virtual and Physical Prototyping 15.3 (2020): 340-358.
[120] Lee, Seunghye, et al. "Topology optimization using super-resolution image reconstruction methods." Advances in Engineering Software 177 (2023): 103413.

BUPT

[121] Kim, Jiwon, Jung Kwon Lee, and Kyoung Mu Lee. "Accurate image super-resolution using very deep convolutional networks." Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition. 2016.
[122] Wang, Xueying, et al. "Generative Adversarial Training with Dual-Attention for Vascular Segmentation and Topological Analysis." 2021 43rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC). IEEE, 2021.
[123] Hu, Derong, et al. "A novel vessel segmentation algorithm for pathological en-face images based on matched filter." Physics in Medicine and Biology (2023).
[124] Ronneberger, Olaf, Philipp Fischer, and Thomas Brox. "U-net: Convolutional networks for biomedical image segmentation." Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention–MICCAI 2015: 18th International Conference, Munich, Germany, October 5-9, 2015, Proceedings, Part III 18. Springer International Publishing, 2015.
[125] Rahkonen, Samuli, et al. "Multilabel segmentation of cancer cell culture on vascular structures with deep neural networks." Journal of Medical Imaging 7.2 (2020): 024001-024001.
[126] Carvalho, Violeta, et al. "3D printing techniques and their applications to organ-on-a-chip platforms: A systematic review." Sensors 21.9 (2021): 3304.
[127] Rajabi, Negar, et al. "Recent advances on bioprinted gelatin methacrylate-based hydrogels for tissue repair." Tissue Engineering Part A 27.11-12 (2021): 679-702.
[128] Rothenbücher, Theresa SP, et al. "Next generation human brain models: engineered flat brain organoids featuring gyrification." Biofabrication 13.1 (2021): 011001.
[129] Ambhorkar, Pranav, et al. "Biofabrication strategies for engineering heterogeneous artificial tissues." Additive Manufacturing 36 (2020): 101459.
[130] Israeli, Yonatan, et al. "Generation of heart organoids modeling early human cardiac development under defined conditions." bioRxiv (2020): 2020-06.
[131] Kim, Kisoo, and Won Gu Lee. "Portable, Automated and Deep-Learning-Enabled Microscopy for Smartphone-Tethered Optical Platform Towards Remote Homecare Diagnostics: A Review." Small Methods 7.1 (2023): 2200979.
[132] Zhong, Y., & Yang, X. "Deep learning for tissue microarray image-based outcome prediction in cancer. " IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics, 15(4), 1269-1277. (2018).
[133] Simonyan, Karen, and Andrew Zisserman. "Very deep convolutional networks for large-scale image recognition." arXiv preprint arXiv:1409.1556 (2014).
[134] He, Kaiming, et al. "Deep residual learning for image recognition." Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition. 2016.
[135] Huang, Gao, et al. "Densely connected convolutional networks." Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition. 2017.
[136] Szegedy, Christian, et al. "Rethinking the inception architecture for computer vision." Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition. 2016.

[137] Minsky, Marvin, and Seymour Papert. "An introduction to computational geometry." Cambridge tiass., HIT 479.480 (1969): 104.
[138] Graves, Alex, and Alex Graves. "Long short-term memory." Supervised sequence labelling with recurrent neural networks (2012): 37-45.
[139] Cho, Kyunghyun, et al. "Learning phrase representations using RNN encoder-decoder for statistical machine translation." arXiv preprint arXiv:1406.1078 (2014).
[140] Xue, Yao, et al. "Cell counting by regression using convolutional neural network." Computer Vision–ECCV 2016 Workshops: Amsterdam, The Netherlands, October 8-10 and 15-16, 2016, Proceedings, Part I 14. Springer International Publishing, 2016.
[141] Ozturk, Tulin, et al. "Automated detection of COVID-19 cases using deep neural networks with X-ray images." Computers in biology and medicine 121 (2020): 103792.
[142] Wang, Shuai, et al. "A deep learning algorithm using CT images to screen for Corona Virus Disease (COVID-19)." European radiology 31 (2021): 6096-6104.
[143] Barbulescu, Greta Ionela, et al. "Innovative biotechnology for generation of cardiac tissue." Applied Sciences 11.12 (2021): 5603.
[144] Alom, Md Zahangir, et al. "The history began from alexnet: A comprehensive survey on deep learning approaches." arXiv preprint arXiv:1803.01164 (2018).
[145] **Bonciog, Dumitru-Daniel**, et al. "Automation of Decellularization Process Using Artificial Neural Networks." 2023 17th International Conference on Engineering of Modern Electric Systems (EMES). IEEE, 2023.

ANEXA A

Aplicația software pentru crearea interfeței cu utilizatorul, realizată pentru automatizarea sistemului folosit în procesul de decelularizare.

```
# Importarea bibliotecilor
from tkinter import *
from PIL import ImageTk, Image
import cv2
import tkinter as tk
from multiprocessing import Process
import matplotlib.pyplot as plt
from matplotlib.backends.backend_tkagg import (FigureCanvasTkAgg,
NavigationToolbar2Tk)
import threading
import os
import time

# Crearea ferestrei principale
root = Tk()

# Crearea unui frame
app = Frame(root, bg="white")
app.grid()

# Crearea unei etichete pentru frame
lmain = Label(app)
lmain.grid(row=0,column=0)

# Configurarea sursei video
#videoSource='./../experiment/video5.avi'
videoSource='0'
if videoSource=='0':
    videoSource=0
cap = cv2.VideoCapture(videoSource)

# Configurarea timpilor și coordonatelor
timeGetPhoto=120
time_constant=10
coord={"left":0,
       "right":0,
       "top":0,
       "bottom":0}
```

```
# Crearea și plasarea elementelor grafice si definierea funcțiilor
varConst=StringVar(root,value=str(time_constant))
varGetPhoto=StringVar(root,value=str(timeGetPhoto))
entryTimeConstant=tk.Entry(root,textvariable=varConst)
entryTimeConstant.grid(row=5,column=1)
entryTimeGetPhoto=tk.Entry(root,textvariable=varGetPhoto)
entryTimeGetPhoto.grid(row=6,column=1)

def leftPlus():
    coord["left"]=coord["left"]+4
    print(coord)
def rightPlus():
    coord["right"]=coord["right"]+4
    print(coord)
def topPlus():
    coord["top"]=coord["top"]+4
    print(coord)
def bottomPlus():
    coord["bottom"]=coord["bottom"]+4
    print(coord)
def leftDecrease():
    coord["left"]=coord["left"]-2
def rightDecrease():
    coord["right"]=coord["right"]-2
def topDecrease():
    coord["top"]=coord["top"]-2
def bottomDecrease():
    coord["bottom"]=coord["bottom"]-2

# Funcția pentru lansarea procesului
def buttonStartProcess():
    time_constant=entryTimeConstant.get()
    timeGetPhoto=entryTimeGetPhoto.get()
    print("start")
    cap.release()
    cv2.destroyAllWindows()
    root.destroy()
    time.sleep(10)
    cmd="python3.7 main3.py "+str(videoSource)+" "+str(coord["top"])+"
"+str(coord["left"])+" "+str(coord["bottom"])+" "+str(coord["right"])+"
"+str(timeGetPhoto)+" "+str(time_constant)
    print(cmd)
    os.system(cmd)

# Definirea butoanelor și etichetelor pentru coordonate
buttonLPlus = tk.Button(root, text='Left +', width=25, command=leftPlus)
buttonLPlus.grid(row=1,column=0)
buttonRPlus = tk.Button(root, text='Right +', width=25, command=rightPlus)
buttonRPlus.grid(row=2,column=0)
```

```
buttonTPlus = tk.Button(root, text='Top +', width=25, command=topPlus)
buttonTPlus.grid(row=3,column=0)
buttonBPlus = tk.Button(root, text='Buttom +', width=25, command=bottomPlus)
buttonBPlus.grid(row=4,column=0)
labelTimeConstant=tk.Label(root,text="Stop time")
labelTimeGetPhoto=tk.Label(root,text="Time get photo")
labelTimeConstant.grid(row=5,column=0)
labelTimeGetPhoto.grid(row=6,column=0)
buttonLDecrease = tk.Button(root, text='Left -', width=25, command=leftDecrease)
buttonLDecrease.grid(row=1,column=1)
buttonRDecrease = tk.Button(root, text='Right -', width=25,
command=rightDecrease)
buttonRDecrease.grid(row=2,column=1)
buttonTDecrease = tk.Button(root, text='Top -', width=25, command=topDecrease)
buttonTDecrease.grid(row=3,column=1)
buttonBDecrease = tk.Button(root, text='Buttom -' , width=25,
command=bottomDecrease)
buttonBDecrease.grid(row=4,column=1)
buttonBStartProcess = tk.Button(root, text='Start' , width=25,
command=buttonStartProcess)
buttonBStartProcess.grid(row=0,column=1)

# Definirea funcției pentru a reda un flux video în timp real
def video_stream():
    cap.set(3,1024)
    cap.set(4,768)
    _, frame = cap.read()
    cv2image = cv2.cvtColor(frame, cv2.COLOR_BGR2RGBA)
    height, width, channels = cv2image.shape
    print(height,"height",width,"width")
# Adăugarea liniilor pentru marginile regiunii de interes
    cv2.line(cv2image,(coord["left"],0),(coord["left"],height),(255,255,255),2)
    cv2.line(cv2image,(0,coord["top"]),(width,coord["top"]),(255,255,255),2)
    cv2.line(cv2image,(width-coord["right"],0),(width-
coord["right"],height),(255,255,255),2)
    cv2.line(cv2image,(0,height-coord["bottom"]),(width,height-
coord["bottom"]),(255,255,255),2)
    img = Image.fromarray(cv2image)
    img=img.resize((640,480),Image.ANTIALIAS)
    imgtk = ImageTk.PhotoImage(image=img)
        lmain.imgtk = imgtk
    lmain.configure(image=imgtk)
    threading.Timer(0.2, video_stream).start()

# Apelarea funcției de video streaming
video_stream()

# Rularea buclei principale de interfață grafică
root.mainloop()
```

ANEXA B

Aplicația software realizată pentru automatizarea sistemului folosit în procesul de decelularizare pentru achiziția și procesarea imaginilor biomedicale.

```
# Calcul logaritm
#!/usr/bin/python
#python3.7 main2.py ./../experiment/video5.avi 52 184 180 204 10 10

# Importarea bibliotecilor
from cmath import log10
import math
from multiprocessing import Process
import time
import numpy as np
from matplotlib import pyplot as plt
import matplotlib.animation as animation
from matplotlib import style
import os
from scipy.ndimage import gaussian_filter1d
import sys
from picamera import PiCamera
from time import sleep

# Utilizarea stilului ” 'fivethirtyeight” pentru grafice
style.use('fivethirtyeight')
from datetime import date
from datetime import datetime
import cv2 as cv

# Instantiere figura si subplot-urile
fig = plt.figure()
ax1 = fig.add_subplot(1,1,1)

#Initializarea variabilelor
time_constant=int(sys.argv[7])
countImage=-1
timeGetPhoto=int(sys.argv[6])#secunde
print(timeGetPhoto)
timeGetPhoto=timeGetPhoto-6
today = date.today()
pathImages='./../experiment/'+str(today)+'/'
pathDataFile='./../experiment/'+str(today)+'/data.txt'
pathLog='./../experiment/'+str(today)+'/log.txt'
```

BUPT

```
percentage=5
constPercentage=3
constStop=1
coord={"left":sys.argv[3],
       "right":sys.argv[5],
       "top":sys.argv[2],
       "bottom":sys.argv[4]
       }
flagCamera=True
videoSource=sys.argv[1]
if videoSource=='0':
   videoSource=0
   flagCamera=False

# Funcție pentru a returna o imagine de la cameră după ce timeGetPhoto a trecut
def returnImage(camera,flagCamera):
   time.sleep(timeGetPhoto)
   current_time = datetime.now().strftime("%H-%M-%S")
   imageName= current_time+'.jpg'
   if flagCamera:
      ret, frame = camera.read()
      cv.imwrite(pathImages+"/"+ imageName, frame)
   else:
      camera.capture(pathImages+"/"+ imageName)
      frame=""

   return [imageName,frame]

# Funcția principală pentru prelucrarea imaginilor
def processImages():
   count = 0

#Crează directorul pentru imagini
   if not(os.path.exists(pathImages)):
      os.mkdir(pathImages)

# Crează directorul pentru imaginile procesate
   pathNewImages="./../experiment/"+str(today)+'_new/'
   if not(os.path.exists(pathNewImages)):
      os.mkdir(pathNewImages)
   contourImages="./contour/"
   step=3
   count=0

# Selectează sursa de video
   if flagCamera:
      camera = cv.VideoCapture(videoSource)
   else:
      camera=PiCamera()
```

```
    camera.start_preview(fullscreen=False,window=(100,200,300,400))
  while 1:

# Scrie datele in fisierul data.txt
    file_object = open(pathDataFile, 'a')
    count=count+1

# Preia imaginea curentă și returnează numele acesteia și un cadru de imagine
    [index,frame] =returnImage(camera,flagCamera)
    try:
      path = pathImages+index
      print(path,"imagePath")
      outPath = pathNewImages+index
      colorImage = cv.imread(path)

# Convertește imaginea în nuanțe de gri și obține dimensiunile acesteia
      grayImage=cv.cvtColor(colorImage,cv.COLOR_BGR2GRAY)
      height_org, width_org = grayImage.shape

      blackCount=0

# Convertirea coordonatelor dreptunghiului din string în int și salvarea în director
      coord["right"]= int(coord["right"])
      coord["left"]=int(coord["left"])
      coord["top"]= int(coord["top"])
      coord["bottom"]=int(coord["bottom"])

# Calculul lățimii și înălțimii noului dreptunghi, eliminând marginile setate în coord
      width=width_org-int(coord["right"])-int(coord["left"])
      height=height_org-int(coord["top"])-int(coord["bottom"])

# Decuparea imaginilor în funcție de zona încadrată de cercetător în interfață
      grayImage=grayImage[int(coord["top"]):int(height)+int(coord["top"]),
int(coord["left"]):int(width)+int(coord["left"])]

# Verificare dacă lățimea e mai >de 50 de pixeli și calcularea medii valorilor pixelilor
     countPixel=0
      if width>50:
        for x in range(int(0),int(width-3),step):
          for y in range(int(0),int(height-3),step):
            countPixel=countPixel+1
            blackCount=blackCount+grayImage[y][x]
        grayValue=blackCount/countPixel

        print(grayValue,'grayValue')

# Scrierea numărul imaginii și media valorilor pixelilor în fișierul de ieșire
        if grayValue>0:
          file_object.write(str(count)+" , "+str(grayValue)+"\n")
```

```
            file_object.close()

# Salvarea imaginii convertită în nuanțe de gri
            cv.imwrite(outPath, grayImage)
        count=count+1
    except Exception as e:
        print(e)
camera.stop_preview()
camera.close()

# Definirea funcției pentru crearea plot-ului
def createPlot():
    ani = animation.FuncAnimation(fig, animate, interval=1000)
    plt.show()

# Funcție pentru verificarea dacă trebuie oprit procesul de achiziție a imaginilor
def checkForStop(ys):
    flagStop=False
    if len(ys)>time_constant:
        if ys[len(ys)-1]>ys[0]+15:
            sumYs=0
            for index in range(0,time_constant):
                sumYs=sumYs+ys[len(ys)-1-index]
            amount=sumYs/time_constant
            print(amount,'amount')
            flag=False

# Verificare daca ultimele time_constant valori reprezinta peste 90% din media lor
            for index in range(1,time_constant):
                percentage=ys[len(ys)-1-index]/amount
                if percentage>1+constPercentage/100 or percentage<1-
constPercentage/100:
                    flag=True
            if flag==False:
                flagStop=True
        else:
            flagStop=False
    else:
        flagStop=False
    return flagStop

  #  Definirea funcției pentru afișarea imaginilor achiziționate de cameră
def showCamera():
    camera = PiCamera()
    camera.start_preview(fullscreen=False,window=(100,200,300,400))
    flag=True
    while(1):
        flag=False
    camera.stop_preview()
```

```
#  Funcția pentru animație
def animate(i):
    graph_data = open(pathDataFile,'r').read()
    lines = graph_data.split('\n')

    xs,ys = getAxisValues(lines,False)

#  Aplicarea unui filtru gaussian
ysmoothed = gaussian_filter1d(ys, sigma=6)
    flagStop=checkForStop(ys)

    ax1.clear()
    ax1.plot(sec2min(xs,timeGetPhoto), ysmoothed,color='red')

    if flagStop:
        logToFile = open(pathLog, 'a')
        logToFile.write(str(datetime.now().strftime("%H-%M-%S"))+" ,
"+str(ys[len(ys)-1])+"\n")
        logToFile.close()

# Salvarea graficului
    plt.savefig('./../experiment/'+str(today)+'/plot.png')

# Conversia din secunde în minute
def sec2min(xs,timeGetPhoto):
    newXs=[]
    for index in xs:
        newXs.append(index/60*timeGetPhoto)
    return newXs

# Funcția pentru calcularea raportului dintre două valori
def calculateReport(last_x,current_x):
    t=float(current_x)/float(last_x)*100
    return t

# Funcția pentru obținerea valorilor pentru axele X și Y
def getAxisValues(lines,flagStop):
        xs = []
    ys = []
    zs=[]
    y_org=[]
    for line in lines:
        if len(line) > 1:
            last_x,last_y=lines[len(lines)-2].split(',')
            x, y = line.split(',')
            y_org.append(float(y))
            if flagStop==False:
                xs.append(float(x))
```

```
                ys.append(float(float(y)))
            else:
                xs.append(float(calculateReport(last_x,x)))
                y_100=float(calculateReport(float(last_y),float(y)))
                ys.append(y_100)
                zs.append(float(2-math.log10(y_100)))
    return xs,ys

# Crearea directorului pentru imaginile generate
if __name__ == '__main__':
    os.mkdir(pathImages)
    f = open(pathDataFile, 'w')
    f=open(pathLog,'w')
    f.close()

    p1 = Process(target=processImages)
    p1.start()
    p2 = Process(target=createPlot)
    p2.start()
    p1.join()
    p2.join()
```

ANEXA C

Rețeaua neuronală creată pentru analiza cineticii procesului de decelularizare.

```
# Importarea bibliotecilor necesare
        import os
        import math
        import shutil
        import numpy as np
        import cv2
        import pandas as pd
        import tensorflow as tf

# Configurarea politicii de precizie mixtă (float16) în TensorFlow
        # tf.keras.mixed_precision.set_global_policy("mixed_float16")
# Setarea nivelului de afișare a jurnalelor în TensorFlow la nivelul de eroare
        tf.get_logger().setLevel('ERROR')

# Definirea unui obiect (tip Callback) pentru a salva cel mai bun model în timpul
#antrenării
        model_checkpoint_callback = tf.keras.callbacks.ModelCheckpoint(
           filepath=os.path.join('ModelCheckpoint', '{loss:.6f}-{epoch:02d}.hdf5'),
           save_weights_only=False,
           monitor='loss',
           mode='min',
           save_best_only=True,
           )

# Definirea clasei App
        class App(tf.keras.utils.Sequence):

           def __init__(self, labels_path=None, batch_size=32, is_train=False,
pred_dir=None, checkpoint=None):
              self.is_train = is_train
              self.pred_dir = pred_dir
              self.labels_path = labels_path
              self.df = self.get_df()
              self.checkpoint = checkpoint
              self.batch_size = batch_size
              self.IMG_SIZE = 64
```

BUPT

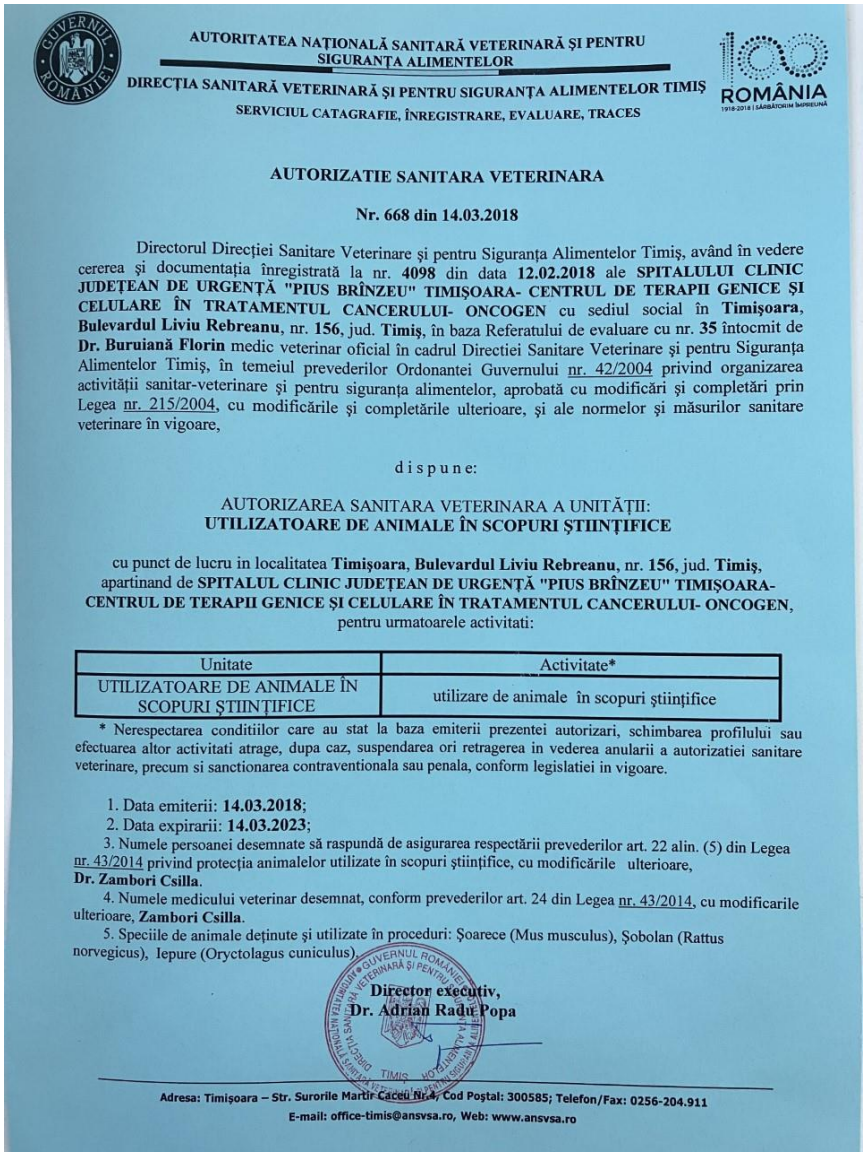
```
# Definirea unui obiect de tip Sequential pentru a efectua augmentarea datelor de
#training (flip, rotate, zoom)
            self.data_augmentation = tf.keras.Sequential([
                # tf.keras.layers.Resizing(self.IMG_SIZE, self.IMG_SIZE),
                tf.keras.layers.RandomFlip("horizontal_and_vertical"),
                tf.keras.layers.RandomRotation(1),
                tf.keras.layers.RandomZoom(0.1,0.1),
                ])
# Definirea modelului
            self.model = tf.keras.Sequential([
                    tf.keras.Input(shape=(None,None, 3)),
                    tf.keras.layers.Resizing(self.IMG_SIZE, self.IMG_SIZE),
                    tf.keras.layers.Rescaling(1./255),
                    tf.keras.layers.Conv2D(16,kernel_size=(3, 3), activation="relu"),
                    tf.keras.layers.MaxPooling2D(pool_size=(4, 4)),
                    tf.keras.layers.Conv2D(16,kernel_size=(3, 3), activation="relu"),
                    tf.keras.layers.MaxPooling2D(pool_size=(4, 4)),
                    tf.keras.layers.Conv2D(16,kernel_size=(3, 3), activation="relu"),
                    tf.keras.layers.Flatten(),
                    tf.keras.layers.Dropout(0.1),
                    tf.keras.layers.Dense(2, activation="sigmoid"),
                ])

# Compilarea modelului
            self.model.compile(loss="mse", optimizer="adam", metrics=["mae"])

# Încărcarea checkpoint-urilor modelului dacă este specificat un fișier de control
            if checkpoint: self.model.load_weights(checkpoint)

# Funcția pentru obținerea setului de date
        def get_df(self):
            if self.is_train:
                df = pd.read_csv(self.labels_path)
                df = df.sample(frac=1)
                # df = df[df['Proteine_norm'] < 0.9]
            else:
                df = pd.DataFrame()
                df['img_path'] = [os.path.join(self.pred_dir, img_name) for
img_name in os.listdir(self.pred_dir)]
                df['ADN_norm'] = 0
                df['Proteine_norm'] = 0
            return df

# Funcția pentru obținerea lungimii setului de date
        def __len__(self):
            return math.ceil(len(self.df) / self.batch_size)

# Funcția pentru obținerea unui element din setul de date
        def __getitem__(self, idx):
```

BUPT

```
            sub_df = self.df.iloc[idx * self.batch_size:(idx + 1) * self.batch_size]
            batch_x = np.stack([cv2.imread(path) for path in sub_df['img_path']])
            if self.is_train: batch_x = self.data_augmentation(batch_x)
            batch_y = sub_df[['ADN_norm','Proteine_norm']].values
            return batch_x, batch_y

# Funcția de antrenament
        def train(self, epochs=100):
            self.model.fit(self,                    batch_size=self.batch_size,
epochs=epochs,callbacks=[model_checkpoint_callback])

# Funcția de predicție
        def predict(self):
            path = os.path.normpath(self.pred_dir)
            out_dir = path.split(os.sep)[-1]
            os.makedirs(out_dir, exist_ok=True)
            pred = self.model.predict(self)
            img_path_list = self.df['img_path'].to_list()
            for i in range(len(pred)):
                print(i, pred[i])
                shutil.copy(img_path_list[i],              os.path.join(out_dir,
f'{np.round(pred[i][0]*100,2)}_{np.round(pred[i][1]*100,2)}.jpg'))

# Instanțiere aplicație cu parametrii (checkpoint-ul rețelei neuronale și foldere)
# Utilizare pentru antrenament
    #   seq   =   App(      labels_path=r"D:\DATA\experiment\labels\all.csv",
batch_size=32, is_train=True, pred_dir=None, checkpoint=None)
    # seq.train()

# Utilizare pentru predicții
    seq = App(  checkpoint=r'my_model.h5',
                pred_dir=r'C:\Users\H372951\OneDrive\... ')
    seq.predict()
```

ANEXA D

Autorizația sanitară veterinară a unității utilizatorare de animale în scopuri științifice.



AUTORITATEA NAȚIONALĂ SANITARĂ VETERINARĂ ȘI PENTRU SIGURANȚA ALIMENTELOR
DIRECȚIA SANITARĂ VETERINARĂ ȘI PENTRU SIGURANȚA ALIMENTELOR TIMIȘ
SERVICIUL CATAGRAFIE, ÎNREGISTRARE, EVALUARE, TRACES

AUTORIZATIE SANITARA VETERINARA

Nr. 668 din 14.03.2018

Directorul Direcției Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor Timiș, având în vedere cererea și documentația înregistrată la nr. **4098** din data **12.02.2018** ale **SPITALULUI CLINIC JUDEȚEAN DE URGENȚĂ "PIUS BRÎNZEU" TIMIȘOARA- CENTRUL DE TERAPII GENICE ȘI CELULARE ÎN TRATAMENTUL CANCERULUI- ONCOGEN** cu sediul social în **Timișoara**, **Bulevardul Liviu Rebreanu**, nr. **156**, jud. **Timiș**, în baza Referatului de evaluare cu nr. **35** întocmit de **Dr. Buruiană Florin** medic veterinar oficial în cadrul Directiei Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor Timiș, în temeiul prevederilor Ordonantei Guvernului nr. 42/2004 privind organizarea activității sanitar-veterinare și pentru siguranța alimentelor, aprobată cu modificări și completări prin Legea nr. 215/2004, cu modificările și completările ulterioare, și ale normelor și măsurilor sanitare veterinare în vigoare,

d i s p u n e:

AUTORIZAREA SANITARA VETERINARA A UNITĂȚII:
UTILIZATOARE DE ANIMALE ÎN SCOPURI ȘTIINȚIFICE

cu punct de lucru in localitatea **Timișoara**, **Bulevardul Liviu Rebreanu**, nr. **156**, jud. **Timiș**, apartinand de **SPITALUL CLINIC JUDEȚEAN DE URGENȚĂ "PIUS BRÎNZEU" TIMIȘOARA-CENTRUL DE TERAPII GENICE ȘI CELULARE ÎN TRATAMENTUL CANCERULUI- ONCOGEN**, pentru urmatoarele activitati:

Unitate	Activitate*
UTILIZATOARE DE ANIMALE ÎN SCOPURI ȘTIINȚIFICE	utilizare de animale în scopuri științifice

* Nerespectarea conditiilor care au stat la baza emiterii prezentei autorizari, schimbarea profilului sau efectuarea altor activitati atrage, dupa caz, suspendarea ori retragerea in vederea anularii a autorizatiei sanitare veterinare, precum si sanctionarea contraventionala sau penala, conform legislatiei in vigoare.

1. Data emiterii: **14.03.2018**;
2. Data expirarii: **14.03.2023**;
3. Numele persoanei desemnate să raspundă de asigurarea respectării prevederilor art. 22 alin. (5) din Legea nr. 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice, cu modificările ulterioare, **Dr. Zambori Csilla**.
4. Numele medicului veterinar desemnat, conform prevederilor art. 24 din Legea nr. 43/2014, cu modificarile ulterioare, **Zambori Csilla**.
5. Speciile de animale deținute și utilizate în proceduri: Șoarece (Mus musculus), Șobolan (Rattus norvegicus), Iepure (Oryctolagus cuniculus).

Director executiv,
Dr. Adrian Radu Popa

Adresa: Timișoara – Str. Surorile Martir Caceu Nr.4, Cod Poștal: 300585; Telefon/Fax: 0256-204.911
E-mail: office-timis@ansvsa.ro, Web: www.ansvsa.ro

BUPT

LISTA PUBLICAŢIILOR REZULTATE ÎN URMA CERCETĂRII DOCTORALE, PUBLICATE SAU ACCEPTATE SPRE PUBLICARE, SUB AFILIERE UPT

Ing. *Dumitru-Daniel BONCIOG* student doctorand

1. Lucrări ştiinţifice publicate în reviste indexate Web of Science-WoS (ISI):

1. **Bonciog, Dumitru-Daniel**, Mihaela-Ruxandra Lascu, Liliana Mâțiu-Iovan, and Valentin Laurențiu Ordodi. "Automation and Optimization of Rat Heart Decellularization Using a Vibrating Fluid Column." Sensors 23, no. 8 (2023): 4045.

2. Lucrări ştiinţifice publicate în volumele unor manifestări ştiinţifice (Proceedings) indexate Web of Science-WoS (ISI) Proceedings:

1. **D. D. Bonciog**, V. L. Ordodi, M. -R. Lascu and L. Mâţiu-Iovan, "Automation of Decellularization Process Using Artificial Neural Networks," 2023 17th International Conference on Engineering of Modern Electric Systems (EMES), Oradea, Romania, 2023, pp. 1-4, doi: 10.1109/EMES58375.2023.10171759.

2. **D. D. BONCIOG**, V. L. Ordodi, M. R. Lascu, L. Mâţiu-Iovan and D. C. Ciobanu, "Software Optimization used to Automate Decellularization," 2022 International Symposium on Electronics and Telecommunications (ISETC), Timisoara, Romania, 2022, pp. 1-5, DOI: 10.1109/ISETC56213.2022.10010027.

3. **D. D. BONCIOG**, V. Laurențiu Ordodi, M. R. Lascu, L. Mâțiu – Iovan and D. C. Ciobanu, "Software Validation For Automatic Heart Decellularization," 2021 16th International Conference on Engineering of Modern Electric Systems (EMES), 2021, pp. 1-4, DOI: 10.1109/EMES52337.2021.9484106.

4. **D. D. BONCIOG**, M. Lascu, L. Mâțiu-Iovan, R. Ionel, C. Burian, V. Ordodi, Modified Langendorff experimental device for rat heart decellularization with a vibrating fluid column, in 2020 International Symposium on Electronics and Telecommunications (ISETC), 5-6 Nov. 2020, Timisoara, Romania, DOI: 10.1109/ISETC50328.2020.9301149.

BUPT

5. L. Mâțiu-Iovan, V. Ordodi, R. Ionel, **D. D. BONCIOG**, Virtual Instrumentation based Prototype for Evaluation of the Cardiac Systolic Function, in 2020 International Symposium on Electronics and Telecommunications (ISETC), 5-6 Nov. 2020, Timisoara, Romania, DOI: 10.1109/ISETC50328.2020.9301047.

3. Lucrări ştiinţifice publicate în reviste de specialitate indexate BDI (cu specificarea BDI):

1. **D. D. BONCIOG**, V. Ordodi, L. Mâțiu-Iovan, G. Bărbuelscu, C. Burian, D. Goje, P. Buică, V. Păunescu, Modified Langendoff device for rat heart decellularization. Timișoara : Fiziologia-Physiology, Vol. 2., 17-20, 2019.

2. V. Ordodi, L. Mâțiu-Iovan, **D. D. BONCIOG**, G. Bărbuelscu, C. Burian, D. Goje, P. Buică, V. Păunescu, Experimental electrophysiological device for the appreciation of the cardiac systolic function – a pilot study. Timișoara : Fiziologia-Physiology, Vol. 2., 4-8, 2019.

4. Brevete de invenție:

1. Cerere brevet invenție nr. 253 18 / 10.10.2022 Dispozitiv electrostatic pentru măsurarea tensiunii electrice cu element indicator optic. Autori: V. Ordodi, D. Vătău, L. Mâțiu-Iovan, R. Ionel, **D. D. BONCIOG**, M. Dan, A. Pana, ..., V. Păunescu.

BUPT