

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

### **Teză de doctorat – Rezumat**

pentru obținerea titlului științific de doctor la

Universitatea Politehnică Timișoara

în domeniul de doctorat Inginerie Electronică, Telecomunicații și Tehnologii Informaționale

**autor ing. Dumitru-Daniel Bonciog**

conducător științific Prof.univ.dr.ing. Mihaela Ruxandra LASCU

luna 11 anul 2023

Teza abordează o tematică nouă și importantă în domeniul ingineriei tisulare. Lucrarea are ca obiectiv dezvoltarea unui dispozitiv Langendorff modificat pentru decelularizarea inimii de șobolan, împreună cu un sistem de analiză computerizată de imagini biomedicale pentru obținerea biomatricilor cardiace.

Teza include o prezentare a procesului automatizat de decelularizare, a 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 prin dezvoltarea unui dispozitiv Langendorff modificat și a unui sistem de analiză computerizată de imagini biomedicale, care poate fi utilizat în procesul de decelularizare a inimii de șobolan.

## **1. INTRODUCERE**

În ultimele decenii, cercetarea medicală a avut un impact semnificativ în creșterea speranței de viață, dar medicina contemporană se confruntă cu provocări, precum patologia cronică degenerativă și deficitul de organe pentru transplant. Lista de așteptare pentru donatori potriviți este lungă, ceea ce a determinat căutarea de noi opțiuni în transplantologie.

Ingineria tisulară a apărut ca un domeniu de studiu nou, oferind posibilitatea de a crea organe și țesuturi funcționale *in vitro* prin decelularizare și recelularizare. Aceste metode se bazează pe utilizarea biomatricilor obținute prin decelularizarea diferitelor organe și țesuturi, eliminând astfel necesitatea de donatori compatibili și reducând riscul de respingere imună.

Metodele de decelularizare sunt aplicate cu succes în funcție de grosimea și tipul de țesut sau organ, iar protocoalele experimentale au obținut rezultate promițătoare în cazul țesutului cardiac. Procesul de decelularizare implică tratamente precum incubarea statică, care expune țesutul la anumite forme de turbulență.

Ingineria tisulară prezintă un potențial promițător în medicină, dar trebuie depășite obstacole tehnice și economice pentru a ajunge la un număr mare de pacienți. Dezvoltarea de biomateriale capabile să elibereze oxigen controlat și să stimuleze angiogeneza poate asigura necesarul de oxigen și nutrienți pentru țesuturile modificate. Utilizarea organelor decelularizate cu canale vasculare și a componentelor matricei extracelulare îmbunătățite reprezintă alte strategii interesante. În plus, utilizarea celulelor autologe elimină riscul de respingere imună, dar poate fi limitată în anumite aplicații, ceea ce duce la explorarea altor surse de celule, cum ar fi celulele progenitoare și celulele stem. Bioreactoarele joacă un rol esențial în reproducerea

mediului nativ și în obținerea de țesuturi viabile și funcționale *in vitro*.

Studiile în biologia dezvoltării și biologia celulară au furnizat baza pentru reproducerea mediului nativ în ingineria tisulară. Cunoașterea expresiei genetice și a căilor de reglementare a funcției celulare și dezvoltării țesuturilor a condus la progrese semnificative în acest domeniu. Abordarea ingineriei tisulare acoperă nivelurile microscopice și celulare, precum și nivelurile macroscopice ale țesuturilor și organelor, imitând mediul nativ al acestora.

Bioreactoarele sunt utilizate pentru simularea mediului natural al dezvoltării și regenerării țesuturilor, permițând formarea de țesuturi viabile și funcționale *in vitro*. Acestea implică gestionarea controlului asupra mai multor factori, care influențează activitatea celulară și oferă o modalitate de îmbunătățire a formării de țesuturi, care nu este posibilă *in vivo* sau cu tehnici tradiționale de cultură a țesuturilor. Cu toate acestea, realizarea bioreactoarelor adecvate implică abordări inovatoare și luarea în considerare a sistemelor fiziologice într-o perspectivă inginerescă.

Pentru a asigura un transport adecvat al substanțelor nutritive și eliminarea produselor metabolice, este esențială proiectarea bioreactoarelor. Factorii mecanici și electrici joacă, de asemenea, un rol important în dezvoltarea și funcționarea țesuturilor. Bioreactoarele avansate permit generarea de grefe de țesuturi funcționale și studierea răspunsurilor biologice complexe *in vitro*, deschizând noi posibilități în ingineria și regenerarea țesuturilor pentru aplicarea clinică [1].

Protocolele experimentale de decelularizare variază în funcție de obiectivul și tipul de țesut sau organ. Prima etapă a protocolului implică curățarea și pregătirea țesutului sau organului. Apoi, se selectează un mediu de decelularizare adecvat, care este menținut pentru o anumită perioadă de timp. Procesul de decelularizare poate fi monitorizat utilizând tehnici precum microscopia și spectrofotometria.

Protocolele eficiente de decelularizare implică abordări fizice, chimice și enzimatică. Un protocol tipic începe cu liza membranei celulare, urmată de separarea componentelor celulare și îndepărtarea resturilor celulare. Pentru a evita reacțiile negative ale țesutului gazdă, substanțele chimice reziduale trebuie îndepărtate. Nu există un protocol universal pentru decelularizare, iar fiecare protocol are avantaje și dezavantaje specifice.

Există mai multe categorii de metode de decelularizare, inclusiv mecanisme fizice, chimice și combinate, care depind de tipul țesutului și obiectivele cercetării. Evaluarea riguroasă și controlată a procesului de decelularizare este esențială pentru obținerea de rezultate precise și de încredere. Deoarece fiecare organ și țesut are caracteristici diferite, găsirea unui agent de decelularizare universal și eficient este dificilă. Metodele fizice, cum ar fi înghețarea, presiunea directă, ultrasunetele, câmpul electric și agitația, pot fi utilizate în decelularizare.

Forța mecanică poate fi utilizată pentru a separa straturile de țesuturi cu planuri naturale de disecție. Ultrasunetele și agitarea mecanică au fost combinate cu tratamente chimice pentru a liza celulele și a îndepărta resturile celulare. De asemenea, electroporarea poate fi utilizată pentru a crește permeabilitatea membranei celulare și a introduce substanțele chimice decelularizante în organ sau țesut. Aceste metode au fost utilizate în diferite studii și prezintă promisiune în decelularizarea țesuturilor și organelor.

Un alt aspect important în ingineria tisulară este utilizarea biomaterialelor. Biomaterialele pot fi adaptate pentru eliberarea controlată a oxigenului și stimularea angiogenezei, asigurând astfel necesarul de oxigen și nutrienți pentru țesuturile modificate. Dezvoltarea de biomateriale îmbunătățite și utilizarea organelor decelularizate cu canale vasculare și componentele matricei extracelulare reprezintă alte strategii interesante.

Utilizarea celulelor autologe elimină riscul de respingere imună, dar poate fi limitată în anumite aplicații, ceea ce a condus la căutarea altor surse de celule, precum celulele progenitoare și celulele stem. Bioreactoarele joacă un rol esențial în reproducerea mediului nativ și în obținerea de țesuturi viabile și funcționale *in vitro*.

Studiile în domeniul biologiei dezvoltării și biologiei celulare au furnizat baza pentru reproducerea mediului nativ în ingineria tisulară. Cunoașterea expresiei genetice și a căilor de reglementare a funcției celulare și dezvoltării țesuturilor a condus la progrese semnificative în acest domeniu. Inginerii biomedicali utilizează aceste cunoștințe pentru a cerceta, studia și îmbunătăți răspunsurile biologice și pentru a genera țesuturi funcționale. Abordarea ingineriei tisulare acoperă atât nivelurile microscopic și celular, cât și nivelurile macroscopice ale țesuturilor și organelor, imitând mediul nativ al țesuturilor.

În concluzie, ingineria tisulară reprezintă o abordare promițătoare pentru soluționarea problemelor legate de patologia cronică degenerativă și nevoia de transplanturi. Prin utilizarea metodelor de decelularizare și recelularizare, biomaterialelor și bioreactoarelor avansate, se pot crea organe și țesuturi funcționale *in vitro*, reducând astfel dependența de donatori și riscul de respingere imună. Cu toate acestea, obstacole tehnice și economice trebuie depășite pentru a realiza implementarea clinică pe scară largă a acestor tehnologii, dar cercetările și dezvoltarea continuă în acest domeniu arată un potențial promițător pentru viitorul medicinei regenerative.

## 2. DIVERSE DISPOZITIVE DE LABORATOR ȘI SISTEME DE DECELULARIZARE

Biomatricile trebuie să respecte arhitectura specifică a organului respectiv și să fie cât mai puțin populate cu celule proprii, astfel încât să permită ulterior popularea cu celule obținute în laborator de la pacientul care urmează să primească transplant.

Metoda Langendorff, dezvoltată în 1895, este utilizată pentru perfuzia inimii izolate *in vitro*, furnizându-i nutrienți și oxigen pentru a menține funcționalitatea sa [2].

Decelularizarea este un proces crucial în obținerea de biomatrici cardiace, dar trebuie realizată cu grijă pentru a păstra integritatea structurală a matricei extracelulare și a rețelei vasculare. Dispozitivele utilizate în decelularizare se bazează pe principiul Langendorff și implică stabilirea unei presiuni de perfuzie adecvate pentru a permite decelularizarea fără a deteriora arhitectura biomatricei. Deoarece decelularizarea este încă slab studiată, tehnologiile și dispozitivele asociate sunt în mare parte nestandardizate și limitate la dimensiuni mici, specifice laboratorului. Există un interes crescut în obținerea de biomatrici de la organe și țesuturi, iar protocoalele de decelularizare au fost optimizate pentru diverse situații.

Sistemele de decelularizare se împart în două categorii principale: decelularizare pe bază de perfuzie și decelularizare prin imersie sau agitație brută. Parametrii de control importanți în decelularizare includ tipul și concentrația agentului de decelularizare, precum și timpul de expunere, care trebuie optimizați pentru a obține o îndepărtare eficientă a ADN-ului și ARN-ului fără a afecta structura matricei extracelulare.

*Sistemele de decelularizare bazate pe perfuzie* reprezintă metode automate utilizate pentru a îndepărta materialul celular din organe, păstrând în același timp structura matricei extracelulare (ECM). Mai multe studii științifice au prezentat diferite abordări în acest domeniu. Unul dintre primele sisteme de automatizare prin perfuzie s-a concentrat pe decelularizarea rinichilor întregi de porc [3]. Metoda a implicat cicluri alternante între utilizarea SDS (dodecil-sulfat de sodiu), clorură de sodiu și apă deionizată, iar valvelor solenoide le-a fost controlată rata de perfuzie. Acest sistem a redus timpul de expunere la SDS de la 36 de ore la doar 5 ore și a obținut o decelularizare completă a rinichilor de porc.

Un alt sistem complet automat a fost creat pentru decelularizarea plămânilor de porc [4]. Acest sistem a automatizat complet procesul de decelularizare a organelor cu sisteme vasculare intacte. Utilizând un program software, supapele au fost controlate pentru a direcționa perfuzia fluidului de decelularizare prin sistemul vascular și căile respiratorii. Acest sistem a demonstrat o eficiență crescută și un timp de decelularizare mult redus în comparație cu metodele manuale.

Un alt sistem de decelularizare a organelor de dimensiuni mari, precum rinichii de porc, a fost dezvoltat utilizând camere individuale cu sisteme vasculare intacte [5]. Acest sistem a permis decelularizarea simultană a mai multor organe și a funcționat în mod consecvent și reproductibil.

Pentru a scurta timpul necesar decelularizării aortei porcine, s-a utilizat o metodă hibridă, care a implicat utilizarea soluțiilor SDS și tratamentul cu dioxid de carbon supercritic (scCO<sub>2</sub>) [6]. Acest tratament a accelerat procesul de spălare și a permis extragerea eficientă a materialului celular din țesutul aortic.

În cazul ficatului de șoarece și de porc, s-a utilizat un dispozitiv brevetat care a permis decelularizarea în condiții de presiune oscilantă [7]. Prin pomparea reactivilor în ficat și crearea unei condiții de presiune oscilantă, materialul celular a fost îndepărtat eficient.

Aceste sisteme de decelularizare bazate pe perfuzie oferă avantaje precum automatizarea completă a procesului, reducerea timpului de decelularizare și păstrarea structurii matricei extracelulare. Cu toate acestea, fiecare sistem are și dezavantaje specifice, cum ar fi costurile mai mari pentru reactivi și gestionarea deșeurilor. În continuare, aceste abordări reprezintă progrese semnificative în dezvoltarea tehnicilor de decelularizare și deschid noi perspective în domeniul regenerării și ingineriei țesuturilor.

*Sistemele de decelularizare bazate pe imersie și agitare* implică utilizarea agenților fizici, tăierea sau tocarea organului de interes, scufundarea în reactivi, urmată de o amestecare. Această metodă brută accelerează procesul de decelularizare prin permiterea penetrației rapide a detergenților în țesut și eliminarea conținutului celular. Un exemplu de utilizare a acestei abordări este studiul lui Skardal și colaboratorii săi ([8]) care au dezvoltat o biocerneală pentru construcția de țesut bioimprimat. În acest studiu, țesutul a fost tăiat în bucăți mici și introdus în apă deionizată, fiind apoi agitat timp de 3 zile. Au fost aplicate soluții de Triton X-100 și NH<sub>4</sub>OH pentru decelularizare, iar apoi țesutul a fost curățat cu apă deionizată. Matricea extracelulară decelularizată rezultată a fost utilizată pentru a crea o cerneală bio.

Studii similare au fost realizate de Pati și Choi, care au investigat utilizarea acestei abordări pentru țesutul cardiac de porc, mușchii scheletici, cartilaj și țesut adipos [9, 10]. Această abordare permite obținerea unei decelularizări complete și eficiente, cu potențialul de a fi adaptată la diferite tipuri și forme de țesut. Cu toate acestea, sunt necesare mai multe cercetări pentru a standardiza și extinde utilizarea acestor tehnici de decelularizare.

Până în prezent, nu există o literatură, care să revizuiască sistemele și instrumentele comerciale de decelularizare. Companiile comerciale, care produc biomateriale bazate pe matricea extracelulară (ECM), se concentrează pe abordările și procesele utilizate în decelularizare. Câteva exemple de astfel de companii includ Miromatrix, ADInstruments, Langendorff și Xylyx Bio. Miromatrix, ADInstruments și Langendorff au adaptat dispozitive de perfuzie pentru utilizarea lor în diferite studii. De exemplu, Miromatrix produce ECM decelularizat din întregul organ, care este apoi utilizat în procesul de decelularizare [11]. Xylyx Bio se concentrează pe producerea de ECM pentru porci și oameni, însă metodele și instrumentele utilizate în decelularizarea organelor și țesuturilor nu au fost dezvoltate încă.

Există câteva dispozitive dezvoltate de companii precum Harvard Apparatus (HA) și Ebers, care se concentrează pe sisteme de decelularizare comerciale. Un exemplu este camera tubulară Ebers, care inițial a fost concepută pentru cultivarea celulelor, dar acum este utilizată și pentru decelularizarea țesuturilor și organelor cu structuri în formă de tub, cum ar fi traheea și esofagul [12]. Aparatul Harvard HPC-3 este o cameră de perfuzie hidrostică utilizată pentru decelularizarea organelor și țesuturilor [13]. Harvard Apparatus a dezvoltat și ORCA (Organ Control and Acquisition Bioreactor) în 2013, care poate gestiona decelularizarea și recelularizarea organelor de diferite dimensiuni [14].

Aceste dispozitive comerciale oferă soluții pentru decelularizarea și recelularizarea organelor și țesuturilor la scară mică, dar informațiile și resursele despre aceste echipamente

pot fi limitate și greu de găsit.

Lipsa standardelor universale pentru caracterizarea materialelor decelularizate este una dintre provocările procesului de decelularizare. Variabilitatea organelor și conținutul lor diferit de ADN și țesut fac dificilă stabilirea unui standard comun de evaluare a decelularizării. Cu toate acestea, cantitatea de ADN rămasă în matricea extracelulară decelularizată servește drept criteriu principal de evaluare, iar aceasta poate fi măsurată prin metode precum colorarea și măsurarea lungimii reziduale.

Majoritatea sistemelor utilizate în cercetare pentru decelularizare sunt specializate și implică utilizarea unui număr mic de bioreactoare dedicate. Pe piață, există doar câteva opțiuni disponibile în prezent. Diverse echipe de cercetare utilizează metode variate pentru evaluarea matricei extracelulare decelularizate. De exemplu, unele abordări includ analize histologice, analize macroscopice, evaluări biochimice și scanări CT, în timp ce altele utilizează colorații, imunofluorescență, teste ADN și imagistică.

Pe lângă evaluarea conținutului de ADN, există și alte metode recomandate pentru caracterizarea materialelor decelularizate. Acestea includ analiza histologică a componentelor matricei extracelulare, analiza ultrastructurii, analiza cantitativă a conținutului de colagen și glicozaminoglicani, precum și analiza proprietăților biomecanice. Pentru a dezvolta standarde și recomandări relevante pentru utilizarea sigură a matricei extracelulare decelularizate, este important să se ia în considerare aceste metode de evaluare suplimentare.

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

Procesul de decelularizare are potențialul de a furniza o platformă acelulară pentru regenerarea organelor și țesuturilor. Cu toate acestea, există un compromis între menținerea integrității biomecanice și eliminarea celulelor imunologice. În prezent, nu există un protocol standardizat și bine optimizat pentru decelularizare, ceea ce reprezintă o provocare atât pentru medici, cât și pentru inginerii biomedicale. Protocoalele utilizate permit un grad avansat de decelularizare, dar pot produce și deteriorări care vor afecta calitatea organului destinat transplantului.

Dezvoltarea unui sistem automatizat pentru decelularizare este un obiectiv principal, eliminând astfel operațiile manuale și supravegherea constantă.

Obiectivele generale ale cercetării includ dezvoltarea, calibrarea și testarea unui dispozitiv experimental de tip Langendorff, controlat în presiune pentru decelularizarea inimii de șobolan. Metoda de decelularizare va fi validată utilizând o metodă spectrofotometrică pentru evaluarea evoluției procesului de decelularizare.

Cercetarea propune, de asemenea, îmbunătățirea și optimizarea dispozitivului experimental prin introducerea unei coloane vibrante de fluid, care va reduce timpul de decelularizare prin aplicarea unui efect mecanic asupra membranelor celulare.

Metoda spectrofotometriei în ultraviolet, folosind NanoDrop ND-1000, va fi utilizată pentru determinările în timp real ale procesului de decelularizare. Acest instrument permite măsurători directe pentru acizii nucleici și proteine, fără a fi nevoie de reactivi suplimentari.

Obiectivele propuse vor fi validate prin experimente utilizând inimi de șobolan, iar rezultatele obținute vor fi confirmate și validate utilizând echipamentul și metodele dezvoltate în cadrul cercetării.

Cercetarea se realizează în colaborare între Facultatea de Electronică, Telecomunicații și Tehnologii Informaționale, Departamentul de Măsurări și Electronică Optică al Universității Politehnica Timișoara și Institutul de Cercetare OncoGen din Timișoara.

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

Capitolul 4 se concentrează pe proiectarea și realizarea unui dispozitiv Langendorff modificat pentru decelularizarea inimii de șobolan. Scopul studiului este de a utiliza procesul de decelularizare pentru regenerarea organelor și țesuturilor, oferind o platformă de țesut și organ acelular pentru medicina regenerativă. Se menționează că procesul de decelularizare implică îndepărtarea celulelor imunologice și păstrarea integrității biomecanice.

Pentru acest scop, s-a dezvoltat un dispozitiv experimental de tip Langendorff, controlat în presiune, cu costuri reduse și ușor de utilizat [15, 16]. Dispozitivul este format din două părți constructive: ansamblul hidraulic și partea electronică de comandă. Procesul de decelularizare utilizează o soluție de detergent ionic (dodecil-sulfat de sodiu) care este recirculată în timpul perfuziei inimii. Prin monitorizarea concentrației de ADN și proteine în soluție, se poate determina cinetica decelularizării.

Descrierea dispozitivului experimental evidențiază componentele și funcționalitatea acestuia. Camera de decelularizare conține inima pregătită pentru decelularizare și soluția de decelularizare, iar aceasta din urmă este perfuzată în inimă prin intermediul unei pompe peristaltice. Un traductor de presiune monitorizează presiunea de perfuzie, iar un modul de automatizare controlează funcționarea pompei peristaltice.

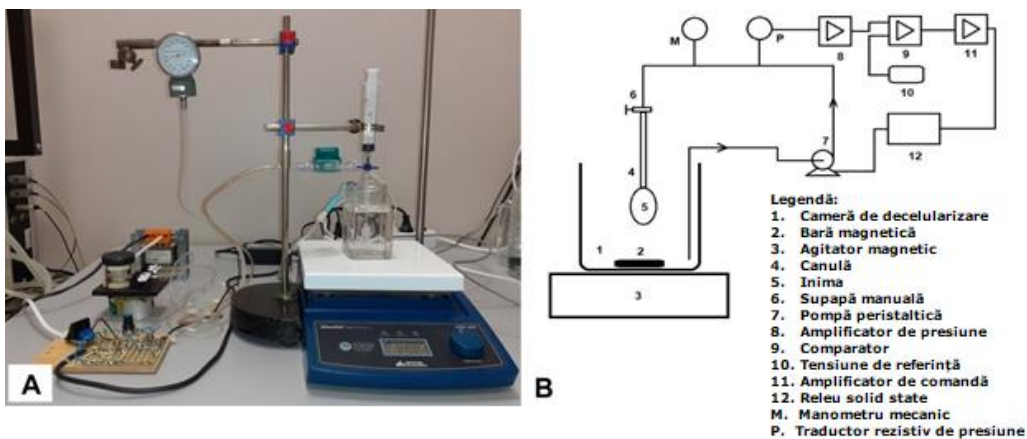


Figura 1. A. Dispozitiv experimental. B. Diagrama bloc (adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [15].

Un protocol experimental a fost realizat pentru a valida și testa dispozitivul. Au fost decelularizate inimile a cinci șobolani, iar inimile au fost excizate și infuzate cu soluție SDS 1,5% timp de 600 de minute. 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.

Probele de soluție au fost prelevate la intervale regulate pentru a determina concentrația de acizi nucleici și proteine. Aceste determinări au fost efectuate folosind metoda spectrofotometrică în ultraviolet. Momentul final al decelularizării a fost stabilit atunci când concentrația acestor analiți a devenit constantă.

Rezultatele și discuțiile privind decelularizarea inimii de șobolan sunt prezentate într-un mod succint și nu sunt incluse în acest rezumat.

În concluzie, acest capitol se concentrează pe proiectarea și realizarea unui dispozitiv Langendorff modificat pentru decelularizarea inimii de șobolan. Dispozitivul experimental dezvoltat se dovedește a fi eficient în procesul de decelularizare, oferind premisele obținerii unor organe cu o bună capacitate funcțională pentru medicina regenerativă.

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

Capitolul 5 se referă la proiectarea unui sistem automatizat pentru procesul de decelularizare a inimii de șobolan.

În cadrul acestui capitol, se prezintă crearea aplicației software de achiziție, prelucrare și analiză a imaginilor biomedicale, precum și optimizarea algoritmului software pentru decelularizarea automată

Aplicația software are ca scop principal achiziționarea, prelucrarea și analiza imaginilor biomedicale obținute în timpul procesului de decelularizare. Sistemul ideal de decelularizare ar trebui să producă o structură tridimensională a biomatricei, complet decelularizată, cu eficiență și precizie maxime.

Etapă intermediară pentru automatizarea procesului de decelularizare implică dezvoltarea unui dispozitiv experimental complex, de tip Langendorff, pentru obținerea biomatricilor cardiace. Acest studiu pilot utilizează un balon de latex pentru simularea unei inimii de șobolan, în care se introduce inițial un colorant. Apoi, prin pomparea controlată a apei distilate, colorantul este înlocuit treptat cu apă distilată. Scopul este de a valida aplicația software prin detectarea automată a momentului în care inima simulată se decolorează complet și de a opri sistemul.

Obiectivele generale ale acestei aplicații software includ simularea procesului de decelularizare într-un mod accesibil și cu costuri reduse, pentru a evita sacrificarea inimilor reale. Utilizând un model de inimă simulată, se poate testa și modifica algoritmul software în timp real, astfel încât să îndeplinească cerințele și să fie pregătit pentru utilizare în mediul real. Aplicația software trebuie să permită vizualizarea în timp real a acțiunilor efectuate și să ofere opțiuni de selectare a unei zone pentru prelucrarea și analiza imaginilor. Imaginile achiziționate și prelucrate vor fi stocate intern și vor fi reprezentate grafic pentru vizualizarea evoluției colorantului din inima simulată.

Dispozitivul experimental implică implementarea hardware și constă într-un sistem de achiziție, procesare și analiză a imaginilor biomedicale. Acesta utilizează o placă Raspberry Pi și un modul de cameră video Raspberry pentru automatizarea procesului de decelularizare. Balonul din latex, care simulează inima, este introdus într-o cameră de decelularizare și este alimentat cu apă distilată pentru simularea decelularizării. Pentru controlul procesului, se utilizează un injectomat de uz clinic și o pompă peristaltică, care sunt comandate de un modul electronic de comandă.

Schema bloc a sistemului de automatizare este ilustrată în figura următoare.

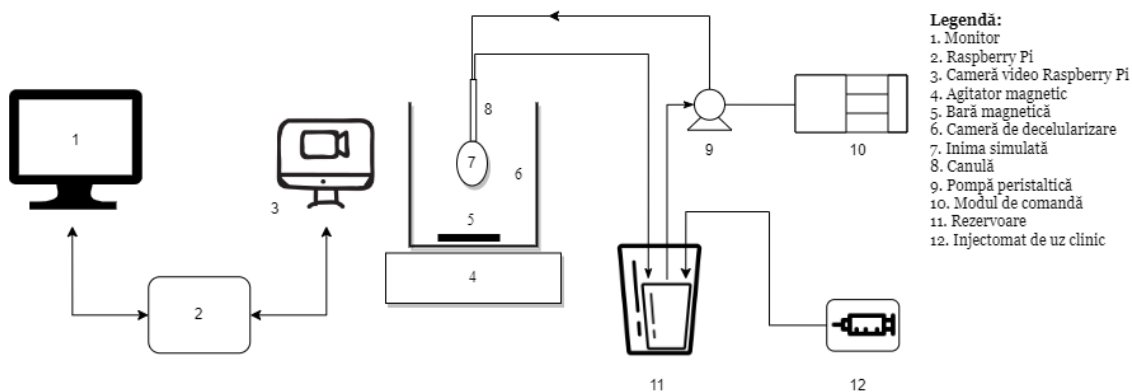


Figura 2. Schema bloc a sistemului (adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [17].

Interfața cu utilizatorul permite vizualizarea în timp real a inimii care conține colorantul, poziționarea inimii în cadrul camerei de decelularizare și setarea intervalului de timp pentru achiziționarea imaginilor. Utilizatorul poate, de asemenea, selecta o zonă de interes din imaginea inimii pentru a fi ulterior prelucrată și analizată.

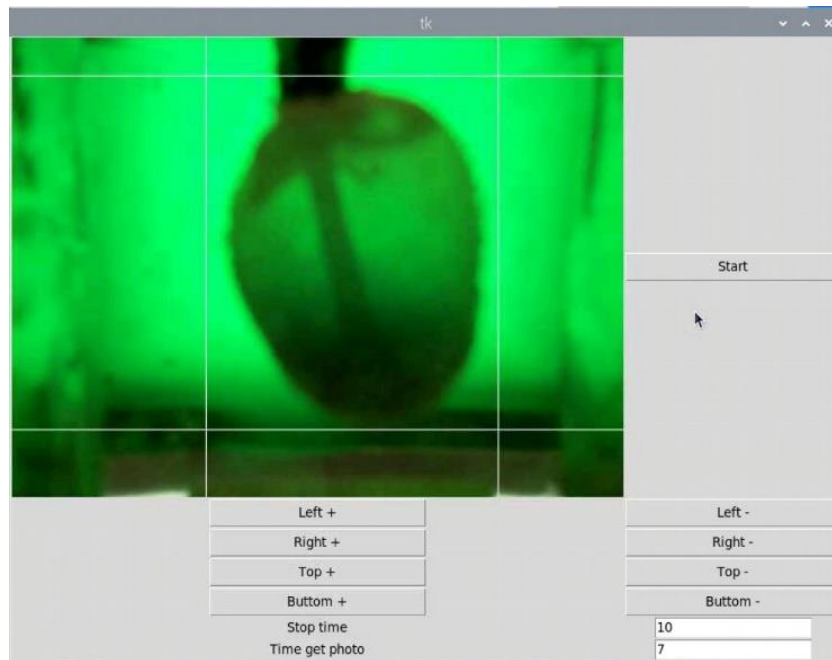


Figura 3. Interfața cu utilizatorul (adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [18].

Partea a doua a aplicației software se ocupă de achiziționarea și procesarea imaginilor biomedicale. Aceasta implică capturarea imaginilor în timp real de către camera Raspberry Pi și stocarea acestora pe cardul micro SD. Imaginile achiziționate sunt apoi prelucrate pentru a extrage informații relevante despre evoluția colorantului din inimă. Aceste informații pot fi apoi reprezentate grafic pentru a vizualiza și analiza evoluția decelularizării.

Pentru implementarea software-ului, au fost utilizate mai multe biblioteci și module Python, cum ar fi „OpenCV” și „VideoCapture (0)” pentru capturarea și procesarea imaginilor, „Tkinter” pentru crearea interfeței grafice și „matplotlib” pentru reprezentarea grafică a datelor.

În concluzie, această secțiune a proiectului se concentrează pe dezvoltarea unei aplicații software, care să permită achiziționarea, prelucrarea și analiza imaginilor biomedicale în timp real în cadrul procesului de decelularizare a inimii de șobolan. Prin intermediul acestei aplicații, utilizatorul poate controla și monitoriza evoluția decelularizării și poate obține informații relevante despre stadiul procesului. Această aplicație software reprezintă un pas important în automatizarea și optimizarea procesului de decelularizare, deschizând calea către aplicații complexe și inovatoare în medicina regenerativă.

După finalizarea dezvoltării aplicației software, aceasta poate fi utilizată în cadrul procesului de decelularizare a inimii de șobolan. Utilizatorul poate configura parametrii aplicației, cum ar fi intervalul de timp pentru achiziționarea imaginilor și zona de interes în inimă pentru analiză. Apoi, aplicația va începe achiziționarea imaginilor în timp real folosind camera Raspberry Pi și le va procesa pentru a extrage informațiile necesare.

Pe măsură ce imaginea inimii colorate evoluează în timp (decolorare), aplicația va actualiza în timp real vizualizarea inimii și va afișa graficul evoluției colorantului. Acest lucru oferă utilizatorului posibilitatea de a monitoriza progresul decelularizării și de a identifica orice anomalii sau probleme care pot apărea în timpul procesului.

În plus, aplicația poate salva imaginile achiziționate și datele asociate pe un card micro SD, permițând utilizatorului să acceseze și să analizeze ulterior aceste informații. Acest aspect



este util pentru a efectua analize și comparații în timpul mai multor sesiuni de decelularizare sau pentru a împărtăși datele cu alți cercetători și specialiști în domeniul medicinei regenerative.

În concluzie, dispozitivul experimental realizat, împreună cu aplicația software dezvoltată în cadrul acestui proiect oferă un instrument puternic și versatil pentru monitorizarea și analiza decelularizării inimii de șobolan. În figura de mai jos se poate observa dispozitivul experimental în ansamblu.

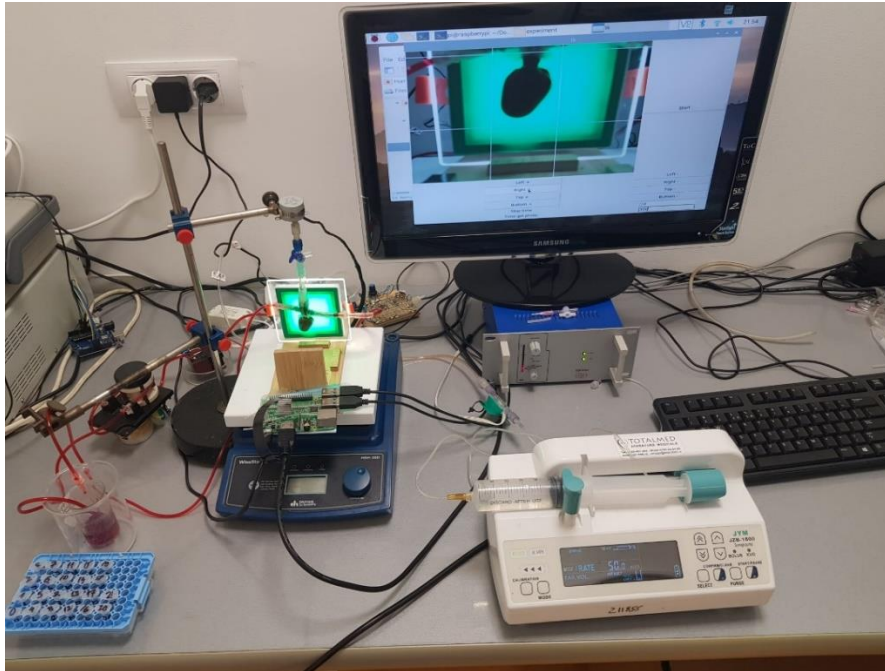


Figura 4. Dispozitivul experimental utilizat pentru automatizarea procesului de decelularizare (după D. D. Bonciog și colab.) [17].

Prin automatizarea procesului de achiziționare și prelucrare a imaginilor, utilizatorii pot obține informații în timp real și pot lua decizii mai bine informate în ceea ce privește stadiul și progresul decelularizării. Aceasta deschide noi perspective în domeniul medicinei regenerative și poate contribui la dezvoltarea de tratamente inovatoare pentru afecțiunile cardiace umane.

Subcapitolul 5.2 se referă la optimizarea algoritmului software pentru decelularizarea automată în procesul de decolorare a inimilor simulate de șobolan. Scopul studiului este de a îmbunătăți algoritmul software pentru a determina cu o precizie mai mare momentul final al decolorării inimilor simulate. Pentru acest scop, s-au efectuat studii preliminare în care zona de interes a fost convertită în tonuri de gri, iar procesarea a fost realizată pentru a determina momentul final al decolorării. 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. Validarea acestei aplicații software, dar și calculul nivelului de precizie pentru aceste procese experimentale se vor efectua prin studii comparative de spectrofotometrie în ultraviolet pentru probele de colorant preluate la un interval de timp identic.

Pentru dispozitivul experimental s-a menținut aceeași arhitectura hardware, iar implementarea software a fost îmbunătățită pentru validarea automată a procesului de decelularizare.

Utilizatorul poate contura zona de interes, iar imaginile achiziționate sunt procesate folosind algoritmul software creat. Imaginile sunt salvate în directoare separate și prelucrate pentru a obține o imagine completă și precisă a inimii simulate.

Sistemul de monitorizare utilizează valorile obținute din imaginile achiziționate și le reprezintă grafic. Cu fiecare imagine achiziționată, graficul este actualizat, iar evoluția culorii

inimii simulate este reprezentată. Procesul este încheiat automat atunci când inima devine transparentă, iar graficul final este salvat.

Pentru validarea aplicației software, s-a efectuat pentru fiecare experiment teste spectrofotometrice al concentrației colorantului folosit în procesul experimental. Valorile măsurate au fost comparate cu evoluția culorii inimii simulate și nu s-au observat diferențe semnificative, confirmând că aplicația software răspunde cerințelor experimentale.

Arhitectura software pentru optimizarea algoritmului software este prezentată în figura de mai jos.

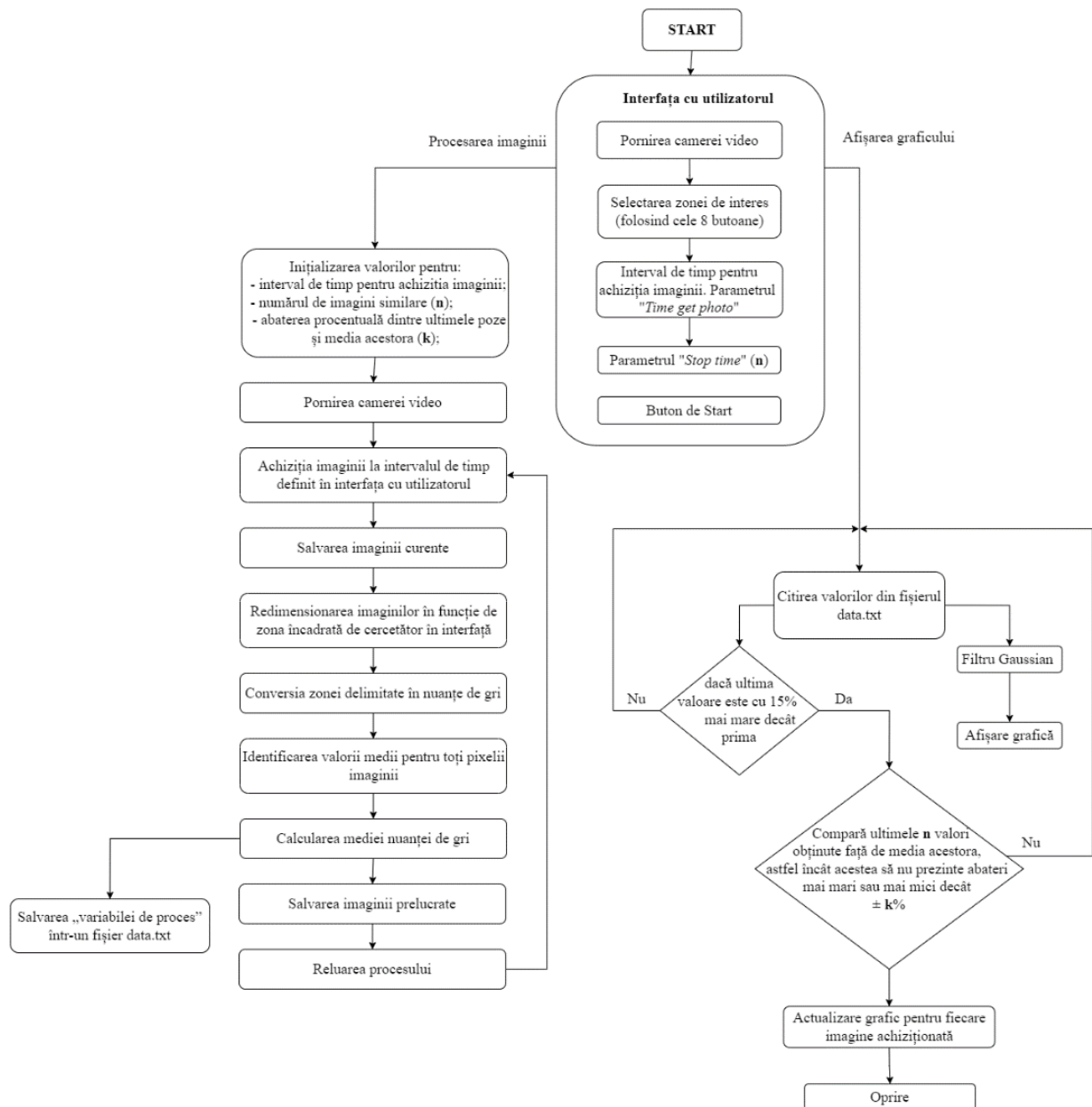


Figura 5. Diagrama de funcționare a algoritmului software (adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [19].

Rezultatele obținute arată că algoritmul software propus poate fi folosit cu succes în monitorizarea procesului de decelularizare a inimilor reale recoltate de la șobolani. 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 optimizare a algoritmului software pentru decelularizarea automată aduce beneficii în ceea ce privește precizia și eficiența procesului, oferind o metodă promițătoare pentru monitorizarea decelularizării inimilor reale în studiile ulterioare.

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

În acest capitol, se prezintă un rezumat al îmbunătățirii dispozitivului experimental controlat în presiune prevăzut cu o coloană vibrantă de fluid.

Studiile anterioare au evidențiat că o proporție semnificativă a organelor și țesuturilor transplantate se pierd într-un interval de timp relativ scurt, iar celelalte suferă de afecțiuni ale sistemului imunitar. Pentru a aborda această problemă, s-au dezvoltat tehnici de decelularizare a organelor și țesuturilor, care au dus la apariția ingineriei tisulare.

Scopul acestui studiu a fost proiectarea și implementarea unui dispozitiv experimental de tip Langendorff controlat în presiune și prevăzut cu o coloană vibrantă de fluid. Prin aplicarea unei presiuni de perfuzie oscilante asupra membranelor celulare, procesul de decelularizare poate fi accelerat prin generarea de unde mecanice de presiune care pot distruge membranele celulare și componentele matricei extracelulare. Utilizarea ultrasunetelor de frecvență ultrasonică a fost investigată pentru acest scop.

Obiectivul principal al acestui studiu a fost evaluarea cineticii procesului de decelularizare a inimii șobolanului sub influența unei presiuni de perfuzie oscilante de joasă frecvență. Dispozitivul experimental proiectat a fost bazat pe principiul dispozitivului Langendorff și a constatat dintr-o cameră de decelularizare care conținea soluția de lizare a celulelor, un agitator magnetic și o bară magnetică pentru omogenizarea soluției, un ansamblu electromagnetic care producea vibrații în inimă prin generarea unei coloane vibrante de lichid, o pompă peristaltică pentru circulația soluției de decelularizare și un sistem de control al presiunii de perfuzie.

Dispozitivul a fost proiectat astfel încât să ofere posibilitatea suprapunerii unei presiuni oscilante cu o frecvență de 18Hz peste presiunea de perfuzie. Utilizarea ultrasunetelor de joasă frecvență pentru decelularizare a prezentat avantaje în ceea ce privește viteza și evitarea utilizării substanțelor chimice dure sau a presiunilor ridicate care ar putea dăuna structurii ECM a organelor.

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

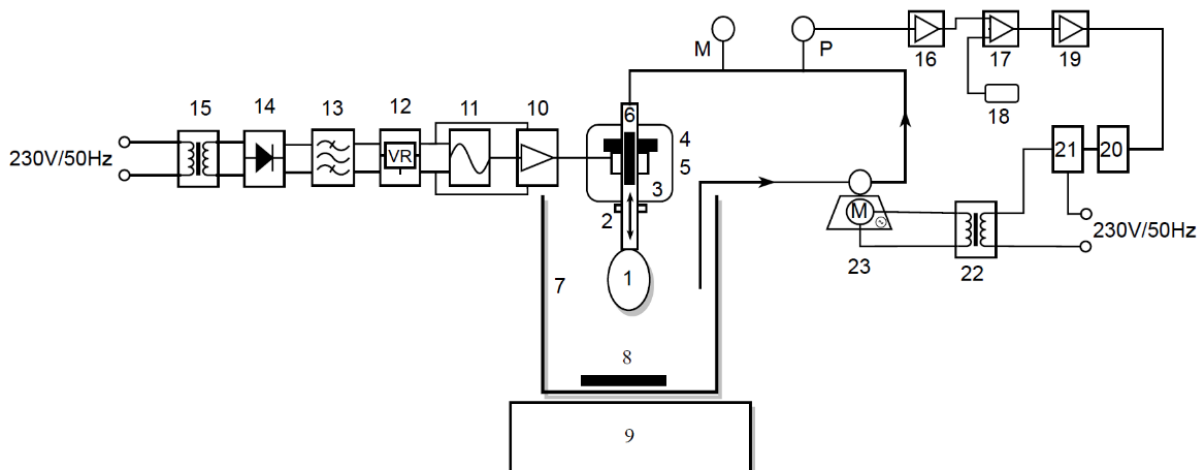


Figura 6. Schema sistemului propus (adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [17].

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

Tabel 1. Legenda diagramei bloc (adaptare după D. D. Bonciog și colab.) [17].

1	Inima	14	Redresor bilaternală
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 coborât 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

Componentele sistemului au inclus o cameră de decelularizare, un agitator magnetic și o bară magnetică pentru omogenizarea soluției, un ansamblu electromagnetic pentru generarea vibrațiilor, o pompă peristaltică pentru circulația soluției, un traductor de presiune pentru monitorizarea presiunii de perfuzie și un sistem de automatizare pentru controlul funcționării pompei peristaltice și a celorlalte componente ale sistemului. Toate aceste componente au fost integrate într-o unitate centrală de control, care a fost responsabilă de coordonarea și controlul operațiunilor sistemului.

Camera de decelularizare a fost proiectată pentru a găzdui inima care urma să fie decelularizată. Aici s-a realizat procesul de eliminare a celulelor și a componentelor celulare din țesut, astfel încât să rămână doar matricea extracelulară.

Agitatorul magnetic și bara magnetică au fost utilizate pentru omogenizarea soluției de decelularizare și pentru a asigura o distribuție uniformă a substanței active în țesut. Agitatorul magnetic a generat mișcări vibrante și oscilații în soluție, iar bara magnetică a contribuit la dispersarea și amestecarea uniformă a soluției în țesut.

Ansamblul electromagnetic a fost utilizat pentru generarea vibrațiilor, care au favorizat penetrarea soluției de decelularizare în țesut și stimularea procesului de decelularizare. Vibrațiile generate au ajutat la descompunerea structurii celulare și la facilitarea eliminării celulelor din țesut. Acest ansamblu este format dintr-un magnet permanent sub forma unui disc perforat, de care este fixată o bobină care este străbătută de un tub de sticlă cu diametrul de 1 cm, în interiorul căruia se află o bară feromagnetică cilindrică învelită în teflon. 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. Măsurătorile 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. Această pompă a fost responsabilă de circulația soluției de decelularizare în interiorul sistemului și prin țesutul cardiac plasat în cameră. Acest lucru a asigurat o distribuție uniformă a soluției în țesut și un proces eficient de decelularizare.

Traductorul de presiune a fost utilizat pentru monitorizarea presiunii de perfuzie a soluției de decelularizare. Acesta a furnizat informații cu privire la presiunea exercitată asupra țesutului și a ajutat la ajustarea și controlul fluxului de soluție.

Sistemul de automatizare este format dintr-o serie de componente, care se regăsesc în tabelul 1. Dimensionarea componentelor pentru proiectarea circuitelor realizate nu sunt incluse în acest rezumat. Rolul acestora este de a permite controlul și coordonarea funcționării sistemului în mod automat. Acest sistem este responsabil de controlul funcționării pompei peristaltice, a ansamblului electromagnetic și a celorlalte componente ale sistemului. De asemenea, sistemul a permis programarea și gestionarea procesului de decelularizare într-un mod precis și controlat. În ansamblu, aceste componente au lucrat împreună pentru a realiza procesul de decelularizare a țesutului într-un mod eficient și controlat, asigurând eliminarea celulelor și menținerea matricei extracelulare intactă.

Întregul ansamblu experimental se poate observa în figura de mai jos.

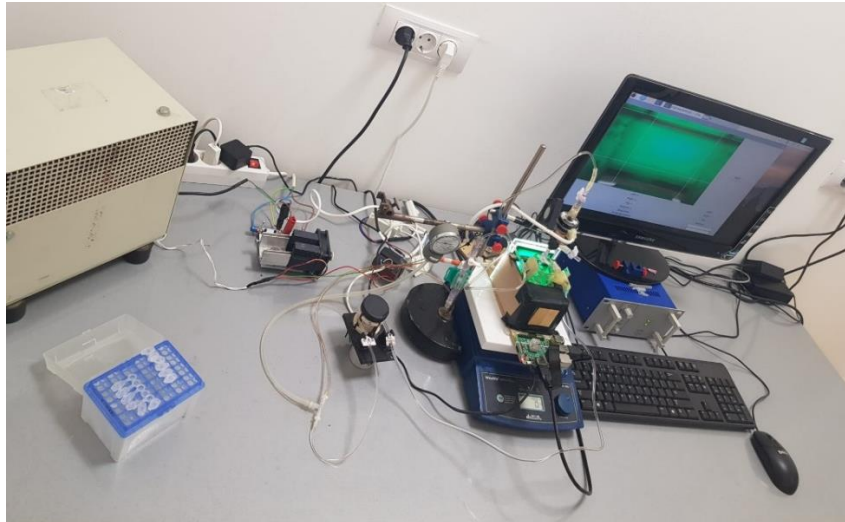


Figura 7. Dispozitivul experimental îmbunătățit pentru automatizarea procesului de decelularizare (după D. D. Bonciog și colab.) [17].

Sistemul de monitorizare dezvoltat în cadrul acestui studiu are ca scop evaluarea și compararea eficacității procesului de decelularizare a inimilor de șobolan, utilizând un dispozitiv experimental îmbunătățit. Testarea și validarea dispozitivului experimental au fost realizate pe șase șobolani Sprague Dawley, împărțiți în două loturi egale.

Dispozitivul experimental utilizat în acest studiu constă într-o coloană vibrantă de fluid, care aplică o presiune hidrostatică oscilatorie cu o frecvență de 18Hz peste presiunea de perfuzie. În cadrul lotului A a fost utilizat acest dispozitiv, în timp ce lotul B a fost utilizat ca grup de control, în cadrul căruia această coloană de fluid vibrantă este nealimentată. Imaginile din timpul procesului de decelularizare au fost achiziționate la intervale de 10 secunde, iar sistemul de monitorizare a permis urmărirea progresului decelularizării în timp real pentru ambele loturi.

Rezultatele obținute au fost prezentate sub formă de valori medii pentru a permite comparația și analiza lor. S-a constatat că utilizarea coloanei vibrante de fluid a condus la o reducere a timpului necesar pentru decelularizare cu aproximativ 30% în comparație cu grupul de control. Acest procent a fost calculat bazat pe rezultatelor automate furnizate de algoritmul software dezvoltat.

De asemenea, aceste rezultate au fost validate folosind și cea de-a doua opțiune. S-au folosit studii spectrofotometrice în ultraviolet, în care s-au măsurat concentrația de acizi nucleici și proteine din soluția de decelularizare. Rezultatul astfel furnizat folosind această metodă, reduce durata timpului de decelularizare cu aproximativ 29% (procent determinat și validat cu ajutorul informațiilor furnizate de metoda spectrofotometrică în ultraviolet utilizată).

Studiul concluzionează că dispozitivul experimental îmbunătățit, împreună cu algoritmul software, reprezintă o metodă eficientă și fiabilă pentru decelularizarea inimilor de

șobolan. Această abordare poate avea aplicații semnificative în ingineria țesuturilor și medicina regenerativă, unde țesuturile și organele decelularizate sunt utilizate ca schele pentru producerea de țesuturi și organe funcționale de înlocuire.

În concluzie, sistemul de monitorizare dezvoltat în acest studiu a demonstrat eficiența și utilitatea sa în procesul de decelularizare a inimilor de șobolan. Prin integrarea dispozitivului experimental cu algoritmul software, s-a obținut o metodă automatizată și precisă, care poate contribui la avansarea cercetării în domeniul ingineriei țesuturilor și al medicinei regenerative.

## 7. OPTIMIZAREA PROCESULUI DE DECELULARIZARE PRIN INTERMEDIUL UNEI REȚELE NEURONALE

Cercetarea în domeniul imagisticii medicale se dezvoltă rapid, iar algoritmi deep learning și machine learning joacă un rol esențial în îmbunătățirea aplicațiilor de imagistică medicală. Aceste abordări folosesc algoritmi de inteligență artificială pentru evaluarea imaginilor medicale și extragerea datelor utile pentru diagnostic și terapie. Rețelele neuronale convoluționale (CNN) sunt folosite frecvent în imagistica medicală pentru segmentarea și clasificarea imaginilor, în timp ce rețelele adversare generative (GAN) sunt utilizate pentru generarea de imagini sintetice și îmbunătățirea setului de date. Aceste tehnici pot fi aplicate în domeniul ingineriei tisulare pentru îmbunătățirea calității, segmentării și reconstrucției matricei extracelulare.

Studiul prezentat are ca scop utilizarea învățării profunde pentru optimizarea procesului de decelularizare a inimilor de șobolan. Prin analiza cineticii procesului de decelularizare și utilizarea unei rețele neuronale construite pe baza datelor experimentale, se urmărește obținerea unei metode automate și precise de evaluare a gradului de decelularizare.

Arhitectura rețelei neuronale convoluționale se bazează pe modelul AlexNet adaptat pentru regresie. Imaginile utilizate în studiu au o rezoluție de 1024 x 768 pixeli, iar datele de concentrație de ADN și proteine au fost normalizate și remapate pentru a asigura standardizarea și comparabilitatea datelor. Tehnici de creștere a datelor au fost utilizate pentru a îmbunătăți performanța modelului. Modelul a fost antrenat pe 46.938 de imagini folosind tehnici de creștere a datelor, cum ar fi rotația, răsturnarea și mărirea.

Modelul de rețea neurală a fost testat pe un set separat de 2000 de imagini, iar rezultatele obținute arată o eroare medie pătratică de 0,14%, ceea ce indică o precizie ridicată în prezicerea valorilor continue pentru ADN și proteine. Valorile prezise se încadrează în intervalul [0, 100] și sugerează că modelul este bine calibrat. Utilizarea unei rețele neuronale în procesul de decelularizare poate contribui la îmbunătățirea procesului de transplant cardiac și la estimarea timpului necesar pentru decelularizare completă a inimii. De asemenea, această abordare poate fi extinsă și aplicată în alte domenii de imagistică medicală pentru analiza și monitorizarea altor tipuri de țesuturi și organe.

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

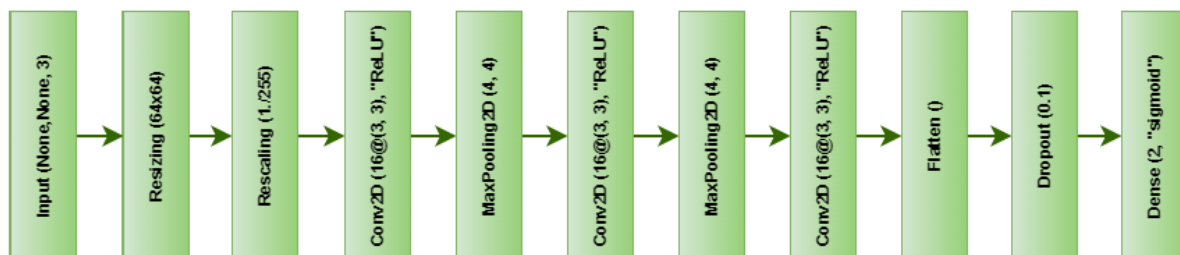


Figura 8. Arhitectura rețelei neuronale convoluționale (după D. D. Bonciog și colab.) [20].

Studiul prezintă un mare potențial pentru optimizarea procesului de decelularizare și

producția de țesuturi și organe bioartificiale în masă. De asemenea, poate contribui la dezvoltarea unor noi tehnici de imagistică medicală și la automatizarea analizei imaginilor în timp real pentru ghidarea și controlul procesului de decelularizare.

În concluzie, utilizarea unei rețele neuronale în procesul de decelularizare a inimilor de șobolan a demonstrat eficiența și utilitatea sa în evaluarea gradului de decelularizare. Această abordare prezintă un mare potențial pentru îmbunătățirea procesului de decelularizare și producția de țesuturi și organe bioartificiale. De asemenea, poate fi extinsă și aplicată în alte domenii de imagistică medicală, contribuind la dezvoltarea unor noi tehnici și metode de analiză și monitorizare a țesuturilor și organelor decelularizate.

## 8. CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Cercetarea doctorală prezentată în această lucrare se concentrează pe domeniul ingineriei tisulare, cu accent pe dezvoltarea și implementarea unui dispozitiv experimental utilizat în procesul de decelularizare a inimilor de șobolan.

În primul capitol, au fost descrise diferite aspecte legate de această temă, inclusiv provocări curente, protocoale, metode și agenți utilizați până în prezent.

În capitolul 2, a fost prezentat stadiul actual al cercetărilor din domeniu, clasificând și descriind diverse dispozitive și sisteme de decelularizare. Dispozitivele și sistemele utilizate în întreaga lume se bazează în mare parte pe conceptul creat de Langendorff, fiind adaptate pentru a satisface nevoile de perfuzie ale organului supus decelularizării.

Cu toate că interesul și activitatea de cercetare în ingineria tisulară au crescut în ultima perioadă, lipsa standardelor universale pentru evaluarea finalizării decelularizării sau a adecvării acestui proces reprezintă o problemă semnificativă.

Capitolul 3 și-a propus să expună obiectivele generale ale proiectării și realizării dispozitivului experimental pentru decelularizarea inimilor de șobolan, prezentând metoda spectrofotometriei în ultraviolet, utilizând dispozitivul NanoDrop ND-1000 pentru determinările probelor în diferitele etape.

Proiectarea și realizarea dispozitivului experimental, de tip Langendorff modificat, a reprezentat unul dintre pașii cheie în aplicarea cunoștințelor dobândite în domeniul electronicii biomedicale.

Rezultatele obținute în acest studiu au o importanță deosebită, deoarece mi s-a oferit oportunitatea de a lucra în colaborare cu medicii din cadrul centrului de cercetare OncoGen din Timișoara și mi s-a permis conceperea și realizarea unui dispozitiv experimental în domeniul electronicii biomedicale. 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 experimental proiectat și procedura descrisă. Matricea tridimensională rezultată în urma acestui proces va fi un instrument util pentru cercetările viitoare în ingineria tisulară.

În continuare, am îmbunătățit dispozitivul prin crearea unei aplicații software, care să faciliteze achiziționarea, procesarea și analiza imaginilor biomedicale utilizate în automatizarea procesului de decelularizare a inimii de șobolan, prin aplicarea diferitelor protocoale experimentale de decelularizare.

Deoarece decelularizarea este o procedură laborioasă, care implică o mulțime de operațiuni manuale și monitorizare, capitolul 5 a fost dedicat proiectării unui sistem de automatizare. Acest sistem are ca scop achiziționarea, procesarea și analiza imaginilor biomedicale pentru a automatiza procesul de decelularizare a inimii de șobolan prin utilizarea diferitelor protocoale experimentale de decelularizare.

În subcapitolul 5.1, au fost atinse obiectivele generale ale validării scopului propus. Au fost selectate componentele hardware necesare și s-a modificat dispozitivul Langendorff existent pentru a permite implementarea aplicației software utilizate în simularea inimilor de

șobolan. Următoarele două subcapitole descriu dispozitivul experimental, care combină cele două părți esențiale ale sistemului: partea fizică, reprezentată de implementarea hardware, și partea logică, reprezentată de implementarea software.

Subcapitolul 5.1.6 prezintă rezultatele obținute pentru acest prototip software, care permite detectarea momentului final al decolorării inimilor simulate. Pentru a valida acest sistem software, s-a utilizat metoda spectrofotometriei în ultraviolet pentru determinarea concentrației de colorant a inimii simulate. În subcapitolul 5.2, algoritmul software a fost optimizat pentru a determina cu o precizie mai mare momentul final al decolorării inimilor simulate și pentru a se apropia cât mai mult de metoda spectrofotometrică clasică.

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

Având în vedere că decelularizarea este un proces de lungă durată, capitolul 6 prezintă o îmbunătățire adusă dispozitivului creat. Prin suprapunerea presiunii oscilante, cu o frecvență de 18Hz, peste presiunea de perfuzie, s-a reușit reducerea timpului necesar pentru decelularizare cu aproximativ 29-30%. Rezultatele generate de algoritmul software și cele obținute utilizând metoda spectrofotometrică au fost identice, demonstrând că algoritmul din software îndeplinește cerințele experimentale în context fiziologic.

Această abordare inovatoare a automatizării procesului de decelularizare a inimilor de șobolan reprezintă un pas semnificativ în direcția îmbunătățirii eficienței și preciziei acestei tehnici. Prin utilizarea aplicației software și a algoritmului optimizat, procesul de decelularizare poate fi monitorizat și controlat într-un mod mai exact și mai eficient.

De-a lungul acestor cercetări, s-a evidențiat că dispozitivul experimental, îmbunătățit prin adăugarea aplicației software și a sistemului de automatizare, este potrivit pentru decelularizarea inimilor de șobolan. Acesta accelerează procesul de decelularizare și determină automat momentul final al decelularizării, generând o structură tridimensională stabilă și adecvată dintr-o perspectivă biomecanică.

În plus, aplicația software dezvoltată poate fi extinsă pentru analiza automată a imaginilor în timp real, ceea ce ar putea fi benefic pentru producția de țesuturi și organe bioartificiale în masă, precum și pentru dezvoltarea de noi tehnici de imagistică medicală.

Ultimul capitol al tezei prezintă proiectarea și validarea unei rețele neuronale pentru optimizarea și automatizarea procesului de decelularizare a inimilor de șobolan. Rezultatele obținute arată că modelul de rețea neuronală convoluțională creat este bine calibrat și prezintă o precizie ridicată în detectarea și precizarea valorilor continue pentru ADN și proteine.

Utilizarea acestei rețele neuronale poate îmbunătăți procesul de transplant cardiac, oferind informații importante despre timpul necesar pentru decelularizarea completă a inimii. De asemenea, viitoarele studii pot utiliza această rețea neuronală pentru analiza automată a imaginilor în timp real, având potențialul de a revoluționa producția de țesuturi și organe bioartificiale.

În concluzie, teza de doctorat prezintă o cercetare extinsă în domeniul ingineriei tisulare, concentrându-se pe dezvoltarea și îmbunătățirea unui dispozitiv experimental pentru decelularizarea inimilor de șobolan. Prin adăugarea unei aplicații software și a unui sistem de automatizare, procesul de decelularizare a devenit mai eficient și mai precis.

Rezultatele obținute demonstrează eficiența și precizia algoritmului software dezvoltat în cadrul acestei aplicații, permițând determinarea momentului optim al decelularizării inimilor de șobolan și generând o structură tridimensională stabilă și adecvată dintr-o perspectivă biomecanică. Această abordare inovatoare și integrată, care combină dispozitivul experimental îmbunătățit, aplicația software și sistemul de automatizare, deschide noi perspective în cercetarea științifică și medicală în domeniul ingineriei tisulare.

Rezultatele obținute în cadrul tezei de doctorat aduc contribuții semnificative în



domeniul ingineriei tisulare și al decelularizării inimilor de șobolan. Prin proiectarea și realizarea dispozitivului experimental îmbunătățit, s-a demonstrat eficiența și utilitatea sa în accelerarea procesului de decelularizare, deschizând noi posibilități în medicina regenerativă.

De asemenea, dezvoltarea aplicației software și a sistemului de automatizare au adus avantaje considerabile în monitorizarea și controlul procesului de decelularizare, asigurând o precizie mai mare și o eficiență crescută în determinarea momentului final al decelularizării.

Utilizarea rețelei neuronale convoluționale pentru optimizarea și automatizarea procesului de decelularizare reprezintă o contribuție deosebită, oferind o abordare avansată și promițătoare în estimarea timpului necesar pentru decelularizarea completă a inimii de șobolan. Aceasta poate îmbunătăți procesul de transplant cardiac și poate fi aplicată în producția de țesuturi și organe bioartificiale, având un potențial semnificativ în domeniul medicinei regenerative.

În concluzie, teza de doctorat prezintă un studiu exhaustiv și riguros în domeniul ingineriei tisulare, axat pe dezvoltarea și îmbunătățirea unui dispozitiv experimental pentru decelularizarea inimilor de șobolan. Prin integrarea unei aplicații software și a unui sistem de automatizare, procesul de decelularizare devine mai eficient, mai precis și mai ușor de monitorizat.

Contribuțiile aduse de această cercetare deschid noi direcții și perspective în domeniul ingineriei tisulare și al medicinei regenerative. Acestea pot fi aplicate nu doar în cercetarea științifică, ci și în practica medicală, contribuind la îmbunătățirea tratamentelor și terapiilor în domeniul cardiac și al regenerării țesuturilor.

În viitor, continuarea acestor cercetări poate duce la dezvoltarea unor tehnici și tehnologii avansate, care să permită decelularizarea eficientă și precisă a organelor umane/porcine, deschizând astfel noi perspective în medicina regenerativă și în tratamentul unor afecțiuni cardiovasculare grave.

## 9. BIBLIOGRAFIE

- [1] Bhumiratana, Sarindr, et al. "Principles of bioreactor design for tissue engineering." *Principles of tissue engineering*. Academic Press, 2014. 261-278.
- [2] 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.
- [3] Poornejad, Nafiseh, et al. "Efficient decellularization of whole porcine kidneys improves reseeded cell behavior." *Biomedical Materials* 11.2 (2016): 025003.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Casali, Dominic M., et al. "A novel supercritical CO<sub>2</sub>-based decellularization method for maintaining scaffold hydration and mechanical properties." *The Journal of Supercritical Fluids* 131 (2018): 72-81.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Pati, Falguni, et al. "Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized

extracellular matrix bioink." Nature communications 5.1 (2014): 3935.

- [11] Motayagheni, Negar. "Modified Langendorff technique for mouse heart cannulation: improved heart quality and decreased risk of ischemia." *MethodsX* 4 (2017): 508-512.
- [12] Ebers Medical, "Static tubular chamber overview." <https://ebersmedical.com/154-products/bioreactors/flow-culture/tubular-chambers>, last accessed 12.09.2021.
- [13] Harvard Apparatus, "HPC-3, Hydrostatic Perfusion Chamber for Organ and Tissue Decellularization." [http://www.harvardapparatus.com/media/harvard/pdf/RM1\\_54.pdf](http://www.harvardapparatus.com/media/harvard/pdf/RM1_54.pdf), last accessed 16.09.2021.
- [14] Harvard Apparatus, "ORCA Bioreactors." <http://www.hoeferinc.com/media/wysiwyg/HART/PDFs/ORCA%20Bioreactor.pdf>, last accessed 18.10.2021.
- [15] **D. Bonciog, V. Ordodi**, et al. Modified Langendorff device for rat heart decellularization. *Timișoara : Fiziologia-Physiology*, Vol. 2., pp. 17- 20, 2019.
- [16] **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.
- [17] **Bonciog, Dumitru-Daniel**, et al. "Automation and Optimization of Rat Heart Decellularization Using a Vibrating Fluid Column." *Sensors* 23.8 (2023): 4045.
- [18] **Bonciog, Dumitru Daniel**, et al. "Software Validation For Automatic Heart Decellularization." 2021 16th International Conference on Engineering of Modern Electric Systems (EMES). IEEE, 2021.
- [19] **Bonciog, Dumitru Daniel**, et al. "Software Optimization used to Automate Decellularization." 2022 International Symposium on Electronics and Telecommunications (ISETC). IEEE, 2022.
- [20] **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.