

# Programul BIOTECH

## RAPORT FINAL DE ACTIVITATE

Contract nr. 04-01-PDT-4652

**Denumirea proiectului:** Dezvoltarea unor biotehnologii de cultivare a nor celule umane în scopul aplicării lor în practica medicală

**Perioada acoperita:** 15.11.2004-15.09.2006

**Data prezentarii:** 15.09.2006

### Bugetul proiectului

#### Finanțare de la bugetul de stat

An	Conform contractului de finantare
2004	30 000
2005	90 000
2006	180 000
Total	300 000

Ingineria tisulară este un domeniu interdisciplinar exploziv care aplică principiile biologiei și ingineriei pentru a dezvolta substituenți viabili care restaurează, mențin și ameliorează funcția țesuturilor umane. Ingineria tisulară integrează descoperirile biochimiei, biologiei moleculare și celulare, a geneticii, științei materialelor și ingineriei biomedicale pentru a produce structuri compozit tri-dimensionale (3-D) ce au o structură/funcție ce poate fi utilizată pentru a înlocui sau corecta un țesut lezat, care lipsește sau care funcționează defectuos.

Tesuturile sunt constituite din celule și matricea extracelulară (MEC). Scopul major al ingineriei tisulare este prepararea unor structuri suport ce favorizează proliferarea, migrarea și diferențierea celulelor. De fapt acest suport «*scaffold*» asistă celulele să formeze țesutul dorit. Pentru a prepara structuri suport reproductibile și a studia efectele biologice ale fiecărui component trebuie preparate structuri «*scaffold*» definite la nivel molecular. Deși fiecare țesut/organ are propriul set de biomolecule, componentele majore ale MEC sunt colagenele, elastina și glicozaminoglicanii (GAG). Colagenul tip I este o proteină a MEC mult utilizată ca material scaffold căruia îi conferă proprietăți adezive și rezistență tensilă. GAG sunt polizaharide încărcate negativ cu caracteristici biologice ca hidratarea MEC și legarea unor molecule efector (factori de creștere și citokine). În plus, în compoziția materialelor scaffold pot intra polimeri biodegradabili (ca alcoolul polivinilic, etilen glicol), metale sau aliaje, care le conferă o structură poroasă ce permite migrarea celulelor și vascularizarea țesutului în formare crescând șansa supraviețuirii acestuia.

Arsurile sunt o cauză comună a morbidității și mortalității populației umane. Arsurile care acoperă mai mult de 20 % din suprafața corpului pot fi fatale fără un tratament adecvat care necesită multiple procedee chirurgicale pentru aplicarea unor autogrefe de piele. Când există cantități insuficiente de piele sănătoasă pentru reconstrucția zonei arse se recomandă utilizarea unor substituenți de piele temporari TSS sau permanenți PSS care asigură o protecție contra traumelor mecanice, constituie o barieră hidrică și fizică față de procese de dezhidratare sau contaminare bacteriană. Substituenții PSS pot înlocui pielea pierdută (epiderma, derma) și pot conduce la constituirea unui nou țesut de o calitate superioară decât grefa de piele subțire.

Generarea de nou țesut osos reprezintă o cerință clinică majoră. Deși grefele autogene sau de țesut osos alogenic sunt utilizate de mulți ani în practica unor spitale au apărut multe probleme ca incapacitatea resorbției complete a țesutului osos autogen, apariția unor dificultăți în modularea formei grefe de os pentru a umple situsul cu defect, pierderi de material ortopedic, etc. Izolarea unor osteoprogenitori umani și identificarea unor factori de creștere a țesutului osos ce induc osteogeneza,

a unor noi polimeri scaffold reprezintă niște direcții de investigație importante în domeniul regenerării scheletului.

### Obiectivul general al proiectului

Dezvoltarea unor structuri «*scaffold*» care să permită aderarea și proliferarea unor celule umane (fibroblaste, osteoblaste, celule stem mezenchimale) într-o formă viabilă și funcțională.

Obiectivele specifice ale proiectului sunt:

1. Analize morfologice și biochimice pe fibroblaste cultivate pe suporturi 3-D
2. Elaborarea unui model experimental de obținere a unui echivalent dermic
3. Cinetica atașării și diferențierii osteoblastelor pe diferite structuri polimere
4. Prezentarea unei tehnologii de laborator în scopul promovării unei soluții pentru reconstrucția țesutului osos

### Realizările proiectului

În acest proiect sunt implicate trei instituții cu contribuții sensibil egale la realizarea obiectivelor cercetării și cu expertize complementare :

- **un centru de cercetare universitară** implicat în obținerea, creșterea și conservarea celulelor în culturi bi- și tri-dimensionale, studii citomorfologice, de citotoxicitate, proliferare, diferențiere celulară (**CO**-coordonator);
- **o organizație neguvernamentală** pentru protecția mediului, a cărei membri au experiență în obținerea de biomateriale, sinteză de suporturi polimerice, reconstrucție imagistică și modelare numerică (**P1**-partener 1);
- **un institut de cercetare-dezvoltare** în domeniul pielăriei și textilelor – cu tradiții în biotehnologia colagenului și cu experiență managerială în producție (**P2**-partener 2).

În cursul proiectului au fost izolate și cultivate **fibroblaste dermice umane (FDU)**, **osteoblaste umane (OBU)** și **celule stem mezenchimale (MSC)** din biopsii de piele, din partea superioară a femurului și respectiv din măduvă osoasă aspirată. Separarea celulelor s-a realizat într-un Laborator înființat printr-un program al Băncii Mondiale coordonat de CNFIS (1999-2001). Activitățile în cadrul acestui Laborator au fost derulate de un personal calificat în acest sens și nu contravin legislației de protecție a mediului. Rezidurile de culturi celulare au fost sterilizate prin autoclavare și incinerate, anulând riscul unor efecte negative asupra solului, apei, atmosferei sau a altor specii. Experimentele au fost realizate cu acordul pacientului, respectând Regulile Comisiei de Etică a Universității din București, realizate pe baza Declarației de la Helsinki.

Culturile celulare realizate de **partenerul CO (Universitatea din București, Centrul de Cercetări de Biochimie și Biologie Moleculară)** au fost monitorizate prin observarea directă la un microscop în contrast de fază Nikon TS 100 F prevăzută cu o cameră foto automată și cu o cameră digitală Nikon Cool Pix 4500; fixarea biomaterialului purtător de celule, practicarea de secțiuni și colorări citologice clasice, precum și marcarea celulelor cu hipericină. Biocompatibilitatea suporturilor a fost evaluată prin determinarea capacității celulelor de a adera la acestea, studiul viabilității și metabolismului celulelor, precum și a proliferării acestora.

Studiile au fost realizate pe celule crescute în **monostat** sau pe **suporturi 3-D**: colagen (gel, fibre, matrice microporoasă), compozite binare sau ternare pe bază de collagen (care mai conțin acid hialuronic, hidroxiapatită, bentonite, alcool polivinilic, polietilen glicol, titan, bioglass, etc). Suporturile pe bază de collagen au fost izolate și caracterizate de **partenerul P2** din punct de vedere al modului de prezentare, umidității, substanțelor minerale sulfatate, proteinelor, permeabilității la valori de apă, controlului microbiologic, biocompatibilității și termenului de valabilitate.

Suporturile pe bază de polimeri sintetici și metale au fost realizate de **partenerul P1** care le-au caracterizat din punct de vedere al parametrilor fizico-chimici, topografiei și biocompatibilității utilizând analiza structurală în infraroșu, porozimetria, analiza de suprafață prin Atomic Force Microscopy (AFM), pentru imagini 2D și 3D, în scopul determinării rugozității filmelor polimerice și analiza imagistică folosind programul SigmaScan pe imaginile de microscopie optică preluate pe culturile celulare.

Comarate global, rezultatele obținute susțin că :

1. Celulele FDU, OBU și MSC cresc într-un grad mai mare pe suporturile pe bază de collagen ;

2. Pentru creșterea FDU în vederea realizării unui **echivalent dermic** suport-celule s-a selectat matricea colagenică **AMATCOL FB**;
3. Pentru creșterea OBU în vederea realizării unor structuri compozit destinate unor **grefe osoase** pentru leziuni cu dimensiuni mici s-au selectat preparatele **BIOCEL-CM4** (denumită **matrice BIOCEL**) și **BIOCEL-MEM4** (denumită **membrană BIOCEL**)
4. Celulele MSC suferă cea mai rapidă diferențiere când sunt însemănțate și crescute pe suportul de **HxA ramforsată cu 10 % Ti**.

Studiul de fezabilitate și analiza economico-financiară a realizării unor noi tipuri de biomateriale denumite **BIOCEL**, a fost realizată de Partenerul 2, deoarece în stația de cercetare și microproducție collagen din INCDTP –ICPI se realizează deja produse medicale de uz extern sub formă de pansamente colagenice pentru tratarea arsurilor pielii și ochilor și a ulcerelor varicoase, precum și hidrolizate de collagen (H02, H08) - substanță activă în produse farmaceutice și cosmetice.

Partenerul P2 a prezentat 3 specificații tehnice pentru produsele:

**MATRICE COLAGENICĂ AMATCOL FB** obținută prin liofilizarea gelului de collagen **BIOGEL** cu conformație structurală nativă de tripluhelix, extras din derma pielii de vițel, utilizabilă ca suport scaffold biocompatibil pentru culturi de fibroblaste precum și ca implant de țesut moale; produsul se prezintă sub formă de folii spongioase cu structură fibroasă, microporoasă;

**MATRICE BIOCEL** obținută prin liofilizarea compozitului format din gelul de collagen **BIOGEL** și pulberi anorganice ( $TiO_2$ ,  $SiO_2$  sau bentonită), utilizabilă ca suport scaffold biocompatibil pentru culturi de celule osteoblaste "in vitro" precum și ca implant de țesut oso spongiuos; produsul se prezintă sub formă de folii spongioase cu structură fibroasă, mai compactă datorită pulberilor de compuși anorganici dispersați, uniform în structura microporoasă a matricei liofilizate.

**MEMBRANA BIOCEL** obținut prin uscarea liberă la 25 – 28°C a compozitului format din gelul de collagen **BIOCEL** și pulberi anorganice ( $TiO_2$ ,  $SiO_2$  și bentonită) utilizabilă ca suport scaffold pentru culturi de fibroblaste și osteoblaste precum și ca implant de țesut conjunctiv; produsul se prezintă sub formă de folii subțiri transparente, rezistente mecanic.

Produsele pot fi realizate în cadrul Secției de biomateriale colagenice din ICPI, la nivel de producție experimentală pilot.

Rezultatele activității de cercetare care au făcut obiectul proiectului BIOTECH 4652/2004 au fost comunicate în țară (*Advanced Procedures for Environmental & Health Relation in the Frame of Sustainable Development, Workshop RICCE 14*, Bucharest, 2005; *Al V-lea Simpozion Național de Biomateriale*, Iași, 2005; *A XXIII-a Sesiune Stiințifică Anuală a Societății Naționale de Biologie Celulară*, Sibiu, 2005) și în străinătate (*8th International Conference on Frontiers of Polymers and advanced materials*, Cancun, Mexic, 2005; *The VIIIth Annual Meeting of Tissue Engineering Society International*, Shanghai, China, 2005; *The WC 2006 Medical Physics and Biomedical Engineering Conference*, Seoul, 2006; *International Symposium on Biomaterials and Biomechanics*, Essen, Germany, 2006), publicate în țară ( *U.P.B. Sci. Bull. Series B*, 2005; , *Rom. J. Biophys.*, 2006; *Rev. Roum. Chim.*, 2006) și în străinătate (*Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 2006; *Biological Trace Element Research*, 2005;