

ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN DOMENIUL ȘTIINȚE MEDICALE

Cu titlu de manuscris
CZU: 616.72-018.3-001-003.93-092.9:602.9:611.018.3(043.2)

COBZAC VITALIE

**GREFE COMBINATE ÎN RESTABILIREA DEFECTULUI
EXPERIMENTAL DE CARTILAJ ARTICULAR**

341.01. INGINERIE TISULARĂ ȘI CULTURI CELULARE

Teză de doctor în științe medicale

Conducător științific:

Nacu Viorel,
doctor habilitat în științe medicale,
profesor universitar

Autor:

Cobzac Vitalie

Chișinău, 2023

Teza a fost elaborată în cadrul Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare,
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” a Consorțiului fondator al
Școlii doctorale în domeniul Științe medicale

Conducător

Nacu Viorel,

dr. hab. șt. med., prof. univ.

Conducător prin cotutelă

Vereștiuc Liliana,

dr. șt. ing. mater., prof. univ.

Membrii comisiei de îndrumare:

Croitor Gheorghe,

dr. hab. șt. med., conf. univ.

Taran Anatolie,

dr. hab. șt. med., conf. univ.

Butnaru Maria,

dr. șt. biol., conf. univ.

Susținerea va avea loc la 20.09.2023, ora 14:00 în incinta USMF ”Nicolae Testemițanu”, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, biroul 204 în ședința Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat, aprobată prin decizia Consiliului Științific al Consorțiului din 28.06.2023 (*proces verbal nr. 16*).

Componența Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat:

Președinte:

Caproș Nicolae,

dr. hab. șt. med., prof. univ.

Secretar:

Erhan Nicolae

dr. șt. med., conf. univ.,

Membrii:

Nacu Viorel,

dr. hab. șt. med., prof. univ.

Vereștiuc Liliana,

dr. șt. ing. mater., prof. univ.

Topor Boris,

dr. hab. șt. med., prof. univ.,

Bețișor Alexandru,

dr. șt. med., conf. univ.,

Butnaru Maria,

dr. șt. biol., conf. univ.,

Autor

Cobzac Vitalie

CUPRINS

LISTA TABELELOR ȘI A FIGURILOR	9
LISTA ABREVIERILOR.....	13
INTRODUCERE	15
1. CARTILAJUL ARTICULAR – STRUCTURA, ONTOGENEZA, ETIOPATOGENEZA LEZIUNILOR DE CARTILAJ ARTICULAR, CLASIFICARE ȘI METODE DE TRATAMENT	22
1.1 Structura cartilajului articular.	22
1.1.1 Matricea extracelulară	24
1.1.2 Condrocitele	24
1.2 Ontogeneza cartilajului articular.....	25
1.3 Etiopatogeneza leziunilor de cartilaj articular	27
1.4 Clasificarea leziunilor de cartilaj	29
1.5 Metode chirurgicale de reparare a leziunilor de cartilaj articular.....	30
1.5.1 Tratament paliativ	31
1.5.2 Tehnici de stimulare a regenerării cartilajului prin implicarea măduvei osoase.....	31
1.5.3 Transplantul de țesut osteocondral sau resurfatarea suprafeței articulare.....	32
1.5.4 Tehnici de regenerare a cartilajului articular prin Inginerie tisulară	34
2. METODOLOGIE GENERALĂ	36
2.1 Prezentarea generală a studiului efectuat	36
2.2 Prepararea și păstrarea reactivilor.....	37
2.3 Anestezia animalelor	40
2.4 Metode de prelucrare statistică a rezultatelor obținute.....	40
3. IZOLAREA, CULTIVAREA ȘI IDENTIFICAREA CELULELOR STEM MEZENCHIMALE DIN MĂDUVA OSOASĂ	44
3.1 Introducere.....	44
3.2 Metode	44
3.2.1 Izolarea și cultivarea CSM.....	44
3.2.2 Identificarea CSM	48
3.3 Rezultate	49
3.4 Discuții	51
4. IZOLAREA ȘI CULTIVAREA CONDROCITELOR DIN CARTILAJUL ARTICULAR DE IEPURE.....	53
4.1 Introducere.....	53

4.2 Metode	54
4.2.1 Izolarea și cultivarea condrocitelor.....	54
4.2.2 Identificarea condrocitelor	56
4.3 Rezultate	57
4.4 Discuții	58
5. OBȚINEREA GREFEI BIFAZICE DIN ȚESUT OSTEOCONDRALE PRIN TEHNICI DE INGINERIE TISULARĂ.	62
5.1 Introducere.....	62
5.2 Metode	63
5.2.1 Pregătirea probelor de țesut osteocondral	63
5.2.2 Decelularizarea țesutului OC demineralizat.....	63
5.2.3 Determinarea cantității de ADN restant în probe	64
5.2.4 Examenul histologic.....	66
5.2.5 Evaluarea <i>in vitro</i> a biocompatibilității probelor obținute.	66
5.2.6 Testul de umflare	70
5.2.7 Testul de degradare enzimatică.....	71
5.2.8 Determinarea modulului de elasticitate.....	73
5.3 Rezultate	73
5.3.1 Cuantificarea ADN-ului	73
5.3.2 Examenul histologic.....	76
5.3.3 Testul de viabilitate celulară cu MTT.....	76
5.3.4 Testul de populare celulară	76
5.3.5 Scanarea electronmicroscopică	76
5.3.6 Degradarea enzimatică.....	80
5.3.7 Testul de umflare	81
5.3.8 Modulul de elasticitate	81
5.4 Discuții	82
6. TESTAREA <i>IN VIVO</i> A GREFELOR COMBinate ÎN REGENERAREA CARTILAJULUI ARTICULAR.....	84
6.1 Introducere.....	84
6.2 Metode	85
6.2.1 Pregătirea grefelor pentru transplantare.....	85
6.2.2 Obținerea celulelor cu potențial condroprogenitor și combinarea acestora cu grefe OCDD.....	86
6.2.3 Transplantarea grefelor combinate în defectele critice experimentale	89

6.2.4 Transferul de țesut osteocondral autolog	90
6.2.5 Îngrijiri postoperatorii	91
6.2.6 Evaluarea rezultatelor testelor <i>in vivo</i> pe iepuri.....	91
6.3 Rezultate	92
6.3.1 Examenul histologic.....	96
6.3.2 Examenul morfologic al defectelor tratate cu grefe OCDD combinate cu condrocite	97
6.3.3 Examenul morfologic al defectelor tratate cu grefe OCDD combinate cu CSM100	
6.3.4 Examenul morfologic al defectelor tratate prin transfer de țesut osteocondral autolog.....	105
6.4 Discuții	108
DISCUȚII DE GENERALIZARE	112
CONCLUZII	114
RECOMANDĂRI PRACTICE	115
BIBLIOGRAFIE	116
ANEXE	136
LISTA PUBLICAȚIILOR.....	159
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	166
CV-ul AUTORULUI	168

ADNOTARE

Cobzac Vitalie: „Grefe combinate în restabilirea defectului experimental de cartilaj articular”, teză de doctor în științe medicale. Chișinău, 2023.

Lucrarea este expusă pe 170 pagini de text electronic și include: introducere, 6 capitole, concluzii generale și recomandări practice. Indicele bibliografic citează 255 surse literare. Materialul ilustrativ este reprezentat în 12 tabele și 59 figuri. Rezultatele obținute sunt publicate în 62 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: celule stem, condrocite, grefe combinate, grefe ierarhic bifazice, țesut osteocondral, demineralizare, decelularizare, transplantare, cartilaj hialin, populare celulară.

Scopul lucrării: Restabilirea defectului experimental de cartilaj în articulația genunchiului prin utilizarea grefelor osteocondrale combinate obținute prin inginerie tisulară.

Obiectivele cercetării: elaborarea și optimizarea metodelor de izolare și cultivare a celulelor cu potențial condroprogenitor din țesuturi autologe - cartilaj hialin și măduvă osoasă; conceperea unei grefe osteocondrale pentru recuperarea defectelor de cartilaj articular; transplantarea grefelor combinate cu celule cu potențial condroprogenitor în defectele experimentale; determinarea potențialului de regenerare a defectelor critice experimentale de cartilaj articular create la nivelul suprafeței portante a articulației prin utilizarea grefelor combinate, comparativ cu lotul martor.

Noutatea și originalitatea cercetării: în premieră au fost elaborate și implementate în practica de laborator mai multe tehnici de lucru inovaționale, metode de procesare și dispozitive ca: tehnica de prelevare a măduvei osoase pentru izolarea de celule stem, pentru realizarea testelor *in vivo* cu celule autologe; metoda de cultivare a CSM, ce a permis obținerea în primul pasaj a unei culturi de CSM cu o puritate înaltă, pentru transplantare; reducerea semnificativă a duratei izolării unui număr mare de condrocite cu o viabilitate înaltă și elaborarea unei noi modalități de izolare a celulelor prin utilizarea de explante; elaborarea și testarea a diverse tipuri de grefe osteocondrale obținute prin tehnici de inginerie tisulară din țesut alogen pentru combinare cu celule autologe; elaborarea și aplicarea unui dispozitiv pentru combinarea grefelor de dimensiuni mici cu celule; stabilirea cantității reale și viabilității celulelor la momentul transplantării; elaborarea unui scor histologic special pentru evaluarea obiectivă a rezultatelor obținute; simplificarea modalității de identificare a celulelor izolate prin colorarea histochimică specifică pentru țesutul cercetat.

Problema științifică soluționată în teză: constă în elucidarea potențialului de regenerare a grefelor combinate obținute din țesut osteocondral alogen procesat prin tehnici de inginerie tisulară și celule condroprogenitoare, dar și toate măsurile suplimentare necesare pentru realizare.

Semnificația teoretică: rezultatele cercetării vor servi drept dovezi științifice în procesul de obținere și utilizare a grefelor combinate, constituite din celule autologe cu potențial condroprogenitor – condrocite și celulele stem mezenchimale din măduva osoasă, cu o grefă obținută prin demineralizarea și decelularizarea țesutului osteocondral alogen.

Valoarea aplicativă a lucrării: experiența dobândită în procesul obținerii de celule cu potențial condroprogenitor, de grefe ierarhic bifazice ce au fost testate *in vitro*, dar și a grefelor combinate cu ulterioara lor testare *in vivo*, este utilizată ca bază în executarea lucrărilor similare în cadrul laboratorului, de asemenea, poate fi utilă în ghidarea clinicienilor în pregătirea și transplantarea grefelor similare.

Implementarea rezultatelor științifice: rezultatele studiului experimental obținute sunt implementate în cadrul Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare, în procesul de efectuare a altor teze de doctorat, în procesul de instruire a studenților, rezidenților și medicilor la Catedra de anatomie și anatomie clinică, la cursul de Medicină Regenerativă în cadrul USMF “Nicolae Testemițanu”.

АННОТАЦИЯ

Кобзак Виталий: «Комбинированные трансплантаты для восстановления экспериментального дефекта суставного хряща», диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Chişinău, 2023.

Работа изложена на 170 страницах электронного текста и содержит: введение, 6 глав, общие выводы и практические рекомендации. Библиографический указатель ссылается на 255 литературных источников. Диссертация дополнена иллюстративным материалом в виде 12 таблиц и 59 графиков. Полученные результаты представлены в 62 научных публикациях.

Ключевые слова: стволовые клетки, хондроциты, комбинированные трансплантаты, двухфазные иерархические трансплантаты, костно-хрящевая ткань, деминерализация, децеллюляризация, трансплантация, гиалиновый хрящ, тканеинженерный хрящ.

Цель исследования: восстановление экспериментального дефекта хряща коленного сустава комбинированными костно-хрящевыми трансплантатами, полученными методом тканевой инженерии.

Задачи исследования: разработка и оптимизация методов выделения и культивирования клеток с хондропрогениторным потенциалом; разработка костно-хрящевого трансплантата; трансплантация комбинированных трансплантатов в экспериментальные дефекты; определение потенциала регенерации экспериментальных критических дефектов суставного хряща, с помощью комбинированных трансплантатов.

Новизна и научная оригинальность: впервые были разработаны и внедрены в лабораторную практику инновации как новый метод забора костного мозга для выделения стволовых клеток и процедура их очищения от контаминационных клеток; значительно сократилось время выделения большого количества хондроцитов и разработан новый способ выделения клеток с использованием трансплантатов; разработка различных типов костно-хрящевых трансплантатов, полученных методами тканевой инженерии; разработка и применение устройства для целлюляризации малоразмерных трансплантатов; установление реального количества и жизнеспособности клеток на момент трансплантации; разработка гистологической шкалы для объективной оценки полученных результатов; упрощение идентификации изолированных клеток путем специфического гистохимического окрашивания исследуемой ткани в ёмкостях для культивации клеток.

Научная задача, решаемая в диссертации: заключается в выявлении регенеративного потенциала комбинированных трансплантатов, полученных из аллогенной костно-хрящевой ткани, обработанной методами тканевой инженерии и хондропрогениторных клеток, а также всех дополнительных мероприятий, необходимых для их реализации.

Теоретическая значимость: результаты исследований послужат научным доказательством в процессе получения и применения комбинированных трансплантатов клинических условиях.

Прикладное значение работы: опыт полученный в процессе получения клеток с хондропрогениторным потенциалом, иерархических двухфазных трансплантатов, испытанных *in vitro*, но и комбинированных трансплантатов с их последующим тестированием *in vivo*, используется в качестве основы для выполнения аналогичной работы в лаборатории, а также может быть полезен в качестве руководства для клиницистов при подготовке и трансплантации подобных трансплантатов.

Внедрение результатов: полученные результаты внедряются в процессе выполнения других докторских диссертаций, в процес обучения студентов, ординаторов и врачей на кафедре анатомии и клинической анатомии, в курсе по Регенеративной медицины ГУМФ «Николае Тестемицану».

SUMMARY

Cobzac Vitalie: “Combined grafts in the restoration of the articular cartilage experimental defect”, PhD thesis in medical sciences. Chisinau, 2023.

The thesis is presented on 170 pages of typed electronic text and includes: introduction, 6 chapters, general conclusions and practical recommendations. Bibliographic index quotes 255 published articles. The thesis contains illustrative materials, represented in 12 tables and 59 figures. The results of the study are published in 62 scientific works.

Key words: stem cells, chondrocytes, combined grafts, biphasic hierarchical grafts, osteochondral tissue, demineralization, decellularization, transplantation, hyaline cartilage, regeneration, cellular population.

Aim of the study: restoration of experimental cartilage defect in the knee joint using combined osteochondral grafts obtained by tissue engineering.

Objectives: development and optimization of methods necessary for isolation and cultivation of cells with chondroprogenitor potential from autologous tissues - hyaline cartilage and bone marrow; development of an osteochondral graft for regeneration of articular cartilage defects; transplantation of grafts combined with cells with chondroprogenitor potential in experimental defects; determination of the regeneration potential of experimental critical articular cartilage defects created at the load-bearing surface of the joint by using combined grafts, compared to the control group.

The scientific novelty and originality: for the first time, several innovative techniques were developed and implemented, like processing methods and devices like the bone marrow sampling technique for isolation of stem cells for performing *in vivo* tests with autologous cells; stem cell cultivation procedure that allowed obtaining for transplantation a high purity stem cells culture; significant reduction of chondrocytes isolation period in large amounts with high viability, and development of a new way of cellular isolation using explants; development and testing of various types of osteochondral grafts obtained through tissue engineering techniques; development of a device for combining small-sized grafts with cells; establishing of the real amount and viability of cells at the time of transplantation; development of a histological score for objective evaluation of the regenerated cartilage; simplification of cells isolated cells identification through specific histochemical staining for the researched tissue.

The important scientific problem solved in the thesis consists in elucidating the regeneration potential of combined grafts obtained from allogeneic osteochondral tissue processed by tissue engineering techniques and chondroprogenitor cells, and all the additional measures necessary to implement them.

The theoretical importance: the research results will serve as scientific evidence in the process of obtaining and using combined grafts, consisting of autologous cells with chondroprogenitor potential - chondrocytes and mesenchymal stem cells from the bone marrow, with a graft obtained by demineralization and decellularization of allogeneic osteochondral tissue.

The applicable value of the work: the experience gained in the process of obtaining cells with chondroprogenitor potential, of biphasic hierarchical grafts that have been tested *in vitro*, but also of grafts combined with their subsequent *in vivo* testing, can be used as basis for performing similar work in the laboratory, it can also be useful in guiding clinicians in the preparation and transplantation of similar grafts.

Practical implementation: the obtained results of the experimental study are implemented in the Tissue Engineering and Cell Culture Laboratory, in the process of carrying out other doctoral theses, in the training process of students, residents and doctors at the Department of Anatomy and Clinical Anatomy, at the course of Regenerative medicine within SUMPh "Nicolae Testemițanu".

LISTA TABELELOR ȘI A FIGURILOR
LISTA TABELELOR

Tabelul 2.1. Criterii de includere și excludere din experiment.	37
Tabelul 2.2. Designul studiului.	37
Tabelul 5.1. Cantitatea de ADN restant în țesuturile OC după demineralizare și decelularizare raportate la țesutul OC normal.	74
Tabelul 5.2. Compararea conținutului de ADN după decelularizare cu diferiți surfactanți de aceeași concentrație.	76
Tabelul 5.3. Semnificația statistică a rezultatelor degradării enzimaticice a probelor tratate cu surfactanți versus lorul martor (p).	80
Tabelul 5.4. Rezultatele testului de hidrofilie a probelor de țesut OC demineralizat și decelularizat, raportate la lotul martor.	81
Tabelul 5.5. Rezultatele determinării modulului de elasticitate a probelor de țesut OC demineralizat și decelularizat, raportate la lotul martor și țesutul OC normal.	82
Tabelul 6.1. Diferența dintre numărul de celule obținute în cultura primară și a celor transplantate cu grefe din cadrul loturilor experimentale.	92
Tabelul 6.2. Diferența între viabilitatea celulelor obținute în cultura primară și a celor transplantate cu grefe din cadrul loturilor experimentale.	93
Tabelul 6.3. Repartizarea complicațiilor survenite în perioada postoperatorie pe grupe.	93
Tabelul 6.4. Compararea statistică a scorurilor parametrilor de evaluare din cadrul SHUCR efectuate independent de 2 experți (p).	95
Tabelul 6.5. Compararea scorurilor obținute pe grupe în dependență de termenul de evaluare a defectului regenerat.	96

LISTA FIGURILOR

Figura 1.1. Aspectul normal al cartilajului articular de iepure. Colorare (a) Hematoxilină-Eozină, (b) Albastru de Toluidină cu Fast Green și (c) Safranin O. Imagini realizate cu microscop Optika, IM-3F la amplificarea x100.	15
Figura 1.2. Schema structurii cartilajului articular sănătos: A – organizarea celulelor cartilajului articular pe zone; B – repartizarea fibrelor de colagen pe zone.	22
Figura 3.1. Recoltarea de măduvă osoasă din osul iliac la iepure. Pregătirea animalului pentru prelevarea măduvei osoase (a, b), perforarea corticalei osului iliac cu acul de 18G (c, d) și aspirarea măduvei osoase (e).	45
Figura 3.2. Procesarea măduvei osoase prelevate. Eprubeta de 15 ml cu PBS amestecat cu măduvă osoasă situat pe gradient de concentrație în raport de 1:1:1 (a), separarea pe straturi după centrifugare (b) și stratul cu celule nucleate de măduvă osoasă separat în altă eprubetă după spălare cu PBS (c).	46
Figura 3.3. Izolarea și cultivarea CSM din măduva osoasă (MT-2, Olympus) cu DMEM/F-12 Ham și 10%SFB. Concentrat de celule nucleate de măduvă osoasă (a) (x40); la 2-3 zile prezente celule fusiforme, unice atașate de suprafața de cultură (b) (x40); la 4-5 zile se determină creșterea numărului de celule (c) (x60); la 6-8 zile s-au format coloniile celulare (d) (x60); (e) la 9-11 zile apare tendința spre confluență a celulelor (d) (x40); la 10-14 zile confluență celulară de 80-90% a celulelor cu un grad de contaminare celulară minimal (f) (x40).	46
Figura 3.4. Numărarea celulelor prin excludere cu soluție de 0.4% albastru de tripan.	47
Figura 3.5. Cultura CSM în pasajul II x20 (DM IL, Leica). CSM atașate la suprafața de cultură cu urme de celule de măduvă osoasă după 24 ore (a); CSM la a 3-a zi de cultivare (b) și confluența de 90% a CSM la ziua a 5-a (c).	47

Figura 3.6. Diferențierea celulară pe linie condrocitară în eprubete de 15 ml din polipropilen. Aspect a 1×10^6 CSM la începutul diferențierii pe linie condrocitară (a) și formarea agregatelor condrocitare (b).	48
Figura 3.7. Colorarea cu Hematoxină-Eozină a agregatelor condrocitare x60 (MT-2, Olympus). S-a determinat prezența unei densități mari de nuclee (verde), dar și formarea de MEC (galben).	49
Figura 3.8. Colorarea cu Albastru de Toluidină și Fast Green a agregatelor formate x40 (MT-2, Olympus). Prezența unei colorări în albastru-violet închis demonstrează prezența în MEC a unui conținut înalt de GAG.	50
Figura 3.9. Colorarea cu Safranin O a agregatelor formate x60 (MT-2, Olympus). A fost determinată colorarea MEC în roșu (galben) datorită prezenței de GAG, și o densitate mare de nuclee (verde).	50
Figura 3.10. Dimensiunile comparative ale oaselor iliac și femural. Aspectul oaselor iliac și femural de iepure (a). Aprecierea grosimii osului iliac (b) și osului femural (c).	51
Figura 4.1. Prelevarea cartilajului articular și tripsinizarea lui: (a) pregătirea preoperatorie a animalului; (b) deschiderea articulației genunchiului; (c) prelevare de cartilaj de pe suprafața neportantă a condililor femurali; (d) cartilajul după mărunțire și spălare; (e) tratarea cu tripsină-EDTA 0.25%; (f) cartilajul articular după tripsinizare.	55
Figura 4.2. Digestia enzimatică cu colagenază 0.6% pe agitator tip rocker în incubator: (a) în eprubetă timp de 360 minute și (c) condrocitele izolate; (b) digestia enzimatică în flacon de cultură celulară întors pe partea laterală cu posibilitatea monitorizării sub microscop a procesului de eliberare a condrocitelor din cartilaj și (d) digestia enzimatică a cartilajului cu eliberarea condrocitelor.	56
Figura 4.3. Reprezentarea comparativă a numărului de condrocite izolate (stânga) și numărul total de condrocite obținut în primul pasaj (dreapta).	57
Figura 4.4. Confluența condrocitelor pe parcursul primului pasaj.	58
Figura 4.5. Colorarea specifică pentru cartilaj cu Safranin O și Albastru de Toluidină cu Fast green (Optika, IM-3F) (x100): CSM de măduvă osoasă – martor (a, b); condrocite din grupul I (c, d), condrocite din grupul II (e, f).	59
Figura 4.6. Colonii izolate de condrocite supraconfluente, formate ca urmare a unui număr mic de condrocite în cultură, colorate cu Safranin O (a) (x60), (b) (x150) și Albastru de Toluidină cu Fast green (c) (x60), (d) (x150) (MT-2, Olympus)	60
Figura 4.7. Colonii de condrocite formate prin explant, din bucăți de cartilaj nedigerat x40 și x100 (IM-3F, Optika). Izolarea condrocitelor prin cicluri de reglare volumetrică.	61
Figura 5.1. Pregătirea țesutului osteocondral pentru demineralizare.	63
Figura 5.2. Demineralizarea și spălarea probelor de țesut osteocondral.	63
Figura 5.3. Procesul de decelularizare a țesutului osteocondral demineralizat.	64
Figura 5.4. Loturile de țesut demineralizat și de țesut demineralizat și decelularizat.	64
Figura 5.5. Extracția ADN-ului cu trusa de purificare genomică Thermo Scientific GeneJET.	65
Figura 5.6. Coloanele pentru extragerea ADN-ului și soluțiile de lucru.	65
Figura 5.7. Spectrofotometru NanoDrop 2000c.	66
Figura 5.8. Probe de țesut osteocondral pregătite pentru teste.	67
Figura 5.9. Probele pentru testul de citotoxicitate cu MTT, (a) modificarea culorii HBSS	67

cu roșu de fenol, (b) plăcile în care au fost testate probele pe CSM și (c) plăcile în care au fost testate probele pe condrocite.	
Figura 5.10. Efectuarea testului de citotoxicitate cu MTT.	68
Figura 5.11. Pregătirea probelor pentru testul de populare celulară.	68
Figura 5.12. Popularea probelor cu CSM și condrocite.	69
Figura 5.13. Acoperirea probelor cu strat subțire de aur în dispozitivul Cressington Sputter Coater 108auto (a) și microscopul pentru scanarea electronică Vega, Tescan (b).	70
Figura 5.14. Pregătirea probelor și realizarea testului de umflare.	71
Figura 5.15. Probe de țesut osteocondral în incubator în timpul testului de degradare enzimatică.	71
Figura 5.16. Procesarea suspensiei proteice în cadrul testului pentru degradarea enzimatică: fierberea tuburilor cu suspensie proteică și reactiv de ninhidrină (a), diluarea proteinei fierte cu isopropanol (b) și scanarea la spectrofotometru (c).	72
Figura 5.17. Curba standard de glicină.	72
Figura 5.18. Aprecierea modulului de elasticitate a probelor de țesut demineralizat și decelularizat cu analizorul de texturi TA.XT plus.	73
Figura 5.19. Concentrația de ADN în țesutul OC normal, demineralizat și demineralizat-decelularizat.	74
Figura 5.20. Examenul histologic al țesutului OC normal, demineralizat și demineralizat-decelularizat cu SDS și TrX de diferite concentrații la magnificarea x100.	75
Figura 5.21. Rezultatele evaluării citotoxicității probelor prin testul MTT, la contact cu condrocite și CSM la termen de 24, 48 și 72 ore.	77
Figura 5.22. Rezultatele populării probelor de țesut osteocondral cu condrocite și CSM, colorate cu DAPI și vizualizate prin microscopie cu fluorescență (DM IL, Leica).	78
Figura 5.23. Sunt prezentate probele populate cu celule condroprogenitoare tratate și netratate cu surfactanți, magnificare de x150-x200, Vega, Tescan.	79
Figura 5.24. Reprezentarea grafică a rezultatelor degradării enzimatice a probelor cu colagenază.	80
Figura 6.1. Dispozitivul de manufactură cu care au fost secționare circular grefele OCDD: (a) structura dispozitivului din cuțit circular și troacar, (b) diametrul intern al dispozitivului cu o grefă secționată.	85
Figura 6.2. Obținerea și păstrarea grefelor OCDD: (a) procesarea grefelor, (b) țesut OCD neperforat, (c) grefă OCDD perforată longitudinal, (d) grefele OCDD conservate la -84°C.	86
Figura 6.3. Pregătirea celulelor pentru popularea grefelor OCDD: (a) peletii de celule în eprubetă de 15 ml după prima centrifugare, (b) centrifugarea în microcentrifugă a tubului Eppendorf și (c) sedimentarea celulelor la fundul tubului Eppendorf, celulele sunt indicate cu săgeată albă.	87
Figura 6.4. Procesul de populare a grefelor OCDD cu celule: (a) DFCGDM steril, (b) introducerea grefei OCDD în suportul dispozitivului, (c) transferul celulelor pe grefă, cu săgeată albă este indicat nivelul suspensiei celulare situate deasupra grefei, (d) introducerea DFCGDM într-o eprubetă de 15 ml.	88
Figura 6.5. Transplantarea grefelor OCDD combinate cu CSM sau condrocite autologe, (a) cântărirea animalelor și anestezia generală, (b) pregătirea câmpului operator, (c) artrotomie parapatelară medială cu luxarea laterală a patelei, (d) crearea defectului experimental, (e, f) grefa combinată cu celule autologe și (g, h) implantarea grefei în defectul experimental.	89

Figura 6.6. Transplantarea de țesut osteocondral autolog, (a, b) anestezia animalului și pregătirea câmpului operator, (c, d) crearea defectului de cartilaj, (e, f, g) prelevarea de grefe osteocondrale autologe de pe suprafața neportantă a suprafeței articulare femorale și transplantarea lor.	90
Figura 6.7. Imobilizarea postoperatorie a genunchiului operat la iepuri.	91
Figura 6.8. Reprezentarea grafică a ambelor evaluări, a loturilor experimentale și martor, la 6 și 12 săptămâni postoperator.	94
Figura 6.9. Rezultatele studierii piesei histologice, grefă OCDD combinată cu condrocite la termen de 6 săptămâni. Imagini realizate cu microscop Optika, IM-3F la amplificarea x40, x100 și x200. Aspectul macroscopic al defectului regenerat la nivelul condililor mediali (A) și aspectul microscopic la colorarea cu Hematoxilină-Eozină (B), Safranin O (C) și Alabastru de Toluidină cu Fast Green (D).	98
Figura 6.10. Rezultatul studierii piesei histologice, grefă OCDD combinată cu condrocite la termen de 6 săptămâni. Aspectul macroscopic al defectului regenerat la nivelul condililor mediali (A) și aspectul microscopic la colorarea cu Hematoxilină-Eozină (B), amplificarea x40, x100 și x200.	99
Figura 6.11. Rezultatele studierii piesei histologice, grefă OCDD combinată cu condrocite la termen de 12 săptămâni. Imagini realizate cu microscop Optika, IM-3F la amplificarea x4, x10 și x20. Aspectul macroscopic al defectului regenerat la nivelul condililor mediali (A) și aspectul microscopic la colorarea cu Hematoxilină-Eozină (B), Safranin O (C) și Alabastru de Toluidină cu Fast Green (D).	101
Figura 6.12. Rezultatele studierii piesei histologice, grefă OCDD combinată cu CSM la termen de 6 săptămâni. Imagini realizate cu microscop Optika, IM-3F la amplificarea x40, x100 și x200. Aspectul macroscopic al defectului regenerat la nivelul condililor mediali (A) și aspectul microscopic la colorarea cu Hematoxilină-Eozină (B), Safranin O (C) și Alabastru de Toluidină cu Fast Green (D).	102
Figura 6.13. Rezultatele studierii piesei histologice, grefă OCDD combinată cu CSM la termen de 6 săptămâni. Imagini realizate cu microscop Olympus, IMT-2 la amplificarea x40 și x100. Aspectul macroscopic al defectului regenerat la nivelul condililor mediali (A) și aspectul microscopic la colorarea cu Hematoxilină-Eozină (B).	103
Figura 6.14. Rezultatele studierii piesei histologice, grefă OCDD combinată cu CSM la termen de 12 săptămâni. Imagini realizate cu microscop Optika, IM-3F la amplificarea x40, x100 și x200. Aspectul macroscopic al defectului regenerat la nivelul condililor mediali (A) și aspectul microscopic la colorarea cu Hematoxilină-Eozină (B), Safranin O (C) și Alabastru de Toluidină cu Fast Green (D).	104
Figura 6.15. Rezultatele studierii piesei histologice, transfer de țesut osteocondral autolog la termen de 6 săptămâni. Imagini realizate cu microscop Optika, IM-3F la amplificarea x40, x100 și x200. Aspectul macroscopic al defectului regenerat la nivelul condililor mediali (A) și aspectul microscopic la colorarea cu Hematoxilină-Eozină (B), Safranin O (C) și Alabastru de Toluidină cu Fast Green (D).	106
Figura 6.16. Rezultatele studierii piesei histologice, transfer de țesut osteocondral autolog la termen de 12 săptămâni. Imagini realizate cu microscop Optika, IM-3F la amplificarea x40, x100 și x200. Aspectul macroscopic al defectului regenerat la nivelul condililor mediali (A) și aspectul microscopic la colorarea cu Hematoxilină-Eozină (B), Safranin O (C) și Alabastru de Toluidină cu Fast Green (D).	107

LISTA ABREVIERILOR

ACI	Transplantarea de condrocite autologe (<i>Autologous chondrocyte implantation</i>)
ADAM	Dezintegrina A și metaloproteinazele (<i>A disintegrin and metalloproteinases</i>)
ADAMTS	Dezintegrina A și metaloproteinazele cuplate cu motive de trombospondină (<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>)
ADN	Acidul dezoxiribonucleic
AMIC	Condrogeneza autologă indusă de matrice (<i>Autologous matrix-induced chondrogenesis</i>)
ARN	Acidul ribonucleic
BMP-7	Proteina morfogenetică osoasă-7 (<i>Bone morphogenetic protein-7</i>)
CA	Cartilaj articular
CCMOA	Concentrat celular de măduvă osoasă autologă
CO ₂	Dioxid de carbon
CSM	Celule stem mezenchimale
DAPI	Diclorhidrat de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DFCGDM	Dispozitiv pentru fixarea și celularizarea grefelor de dimensiuni mici
DMEM	Mediul Eagle modificat a lui Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMEM/F-12 Ham	Mediul Eagle modificat a lui Dulbecco/Amestec de nutrienți F-12 Ham (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham</i>)
DMSO	Dimetilsulfoxid
DPBS	Dulbecco tampon fosfat salin (<i>Dulbecco phosphate-buffered saline</i>)
EDTA	Acid etilendiaminotetraacetic
FGF-2	Factor de creștere al fibroblastelor-2 (<i>Fibroblast growth factor-2</i>)
GAG	Glicozaminoglicani
GDF-5	Factor de diferențiere al creșterii-5 (<i>Growth differentiation factor 5</i>)
H ₂ O ₂	Peroxid de hidrogen
HBSS	Soluție salină echilibrată Hanks (<i>Hank's balanced salt solution</i>)
HCl	Acid clorhidric
ICRS	Societatea internațională de reparare a cartilajului (<i>International cartilage repair society</i>)
IL-1RA	Antagonistii receptorilor interleukinei-1
IL-6	Interleukina-6
IMC	Indicele masei corporale
MACI	Implantarea de condrocite autologe combinate cu matrice (<i>Matrix-assisted autologous chondrocyte implantation</i>)
MASI	Implantarea de celule stem autologe combinate cu matrice (<i>Matrix-assisted autologous stem-cells implantation</i>)
MEC	Matrice extracelulară
MP	Metaloprotează
MO	Măduvă osoasă
MTT	Bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu
NO ₂	Dioxid de azot
OC	Osteocondral
OCD	Osteocondral demineralizat
OCDD	Osteocondral demineralizat și decelularizat
PBS	Bufer fosfat salin (<i>Phosphate-buffered saline</i>)

PES	Polietersulfonă
PFA	Paraformaldehidă
PG	Proteoglicani
PRP	Plasmă bogată în trombocite (<i>Platelet rich plasma</i>)
RMN	Rezonanță magnetică nucleară
RT-PCR	Reacția de transcripție inversă în lanț a polimerazei (<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SDS	Dodecil Sulfat de sodiu (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SFB	Ser fetal bovin
SHUCR	Scorul histologic unificat al cartilajului regenerat
SnCl ₂ ·2H ₂ O	Clorura stanoasă dihidrat
TGFβ-2	Factor de creștere transformator β-2 (<i>Transforming growth factor β-2</i>)
TNF-α1	Factor de necroză tumorală-α1 (<i>Tumor necrosis factor-α1</i>)
TrX	Triton X-100
UTM	Universitatea Tehnică a Moldovei

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța problemei abordate

Leziunile de cartilaj articular au un potențial redus de regenerare și reparare intrinsecă. Deoarece este un țesut lipsit de vascularizare acesta se nutrește în mare parte doar prin difuzie din lichidul sinovial [1, 2, 3, 58]. Totodată, organizarea structurală a cartilajului articular hialin și fixarea condrocitelor în acesta fără posibilitatea de a se deplasa la locul de leziune, împiedică dramatic procesul de regenerare a cartilajului [2, 4, 5, 6, 58]. Leziunile cartilajului articular adesea sunt asimptomatice, dar pot fi cauza durerii, tumefierii și blocajului articular [8]. A fost determinată prezența defectelor cartilajului articular de diferit grad la 60-66% dintre pacienții ce au suportat un examen artroscopic legat de alte cauze [9, 10, 11, 12, 13]. Ca urmare, clinicianul este pus în situația de a examina minuțios fiecare pacient ce prezintă dureri și un oarecare disconfort ce au apărut la nivel de articulație. Astfel, leziunile de cartilaj devenind o povară atât pentru pacient, cât și pentru întreg sistemul medical [2, 5] (figura 1.1).

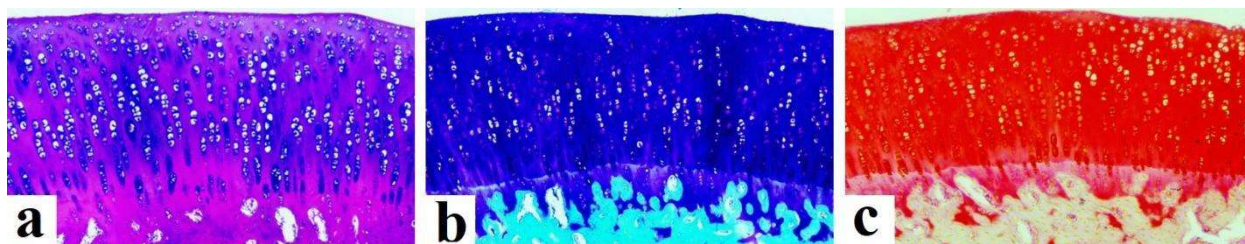


Figura 1.1. Aspectul normal al cartilajului articular de iepure. Colorare (a) Hematoxină-Eozină, (b) Albastru de Toluidină cu Fast Green și (c) Safranin O. Imagini realizate cu microscop Optika, IM-3F la amplificarea x100.

Alterarea biomecanicii ce a apărut ca urmare a unei leziuni suportate la nivel de articulație va duce la degradarea artrozică progresivă a articulației [17, 20, 22]. Circa 12% din toate cazurile de artroză au fost de origine posttraumatică [18]. De asemenea, a fost dovedit că chiar și după stabilizarea articulației traumatizate prin metode chirurgicale, oprirea degradării articulare nu va fi stopată [19]. Acest proces de degradare artrozică a articulațiilor se datorează leziunilor survenite la nivel molecular și celular ca urmare a traumatismului suportat [20], ceea ce duce la acumularea de enzime degradante și citokine, soldat cu alterarea structurii colagenului, hidratare excesivă a matricii și fisurarea suprafeței articulare [18, 20]. De asemenea, a fost constatat că circa 50% din pacienți după o leziune severă a genunchiului au dezvoltat gonartroză până la 20 de ani, iar dacă era prezentă și o fractură intraarticulară riscul artrozei creștea până la 75% [18, 21, 22].

Există o ipoteză, că din cauza lipsei vaselor sangvine, nervilor și vaselor limfatice în structura cartilajului articular, răspunsul inflamator la o oarecare leziune a acestuia este

predominant condrocitar, acesta la rândul lui fiind exagerat. A fost presupus că atenuarea precoce a acestui răspuns la leziune ar putea opri degradarea ireversibilă la nivel molecular a condrocitelor și țesuturilor articulare [21]. Până la momentul actual au fost descrise diverse modalități experimentale, non-chirurgicale de tratament a defectelor de cartilaj articular, ca utilizarea unor compuși biologici activi de tip p188 și rotenona [21]. Fiind membranostabilizatori, aceștia inhibă sau blochează proteina p38 activată de stress, inhibă activarea glicogen sintazei kinaza-3 și procesul inflamator legat de IL-6 [23, 24]. De asemenea, a fost testată utilizarea inhibitorilor citokinelor proinflamatorii ca antagoniștii receptorilor interleukinei-1 (IL-1RA) și a factorului de necroză tumorală- α 1 (TNF- α 1). Testele pe model animal au arătat că utilizarea antagoniștilor receptorilor IL-1RA a redus edemul osului subcondral, fibrilarea suprafeței articulare și necroza condrocitelor. De asemenea, utilizarea antagonistului receptorilor TNF- α 1, s-a soldat cu diminuarea expresiei genelor metaloproteinazelor MP-1, MP-3 și MP-13 ceea ce a redus sinteza prostaglandinelor și a crescut sinteza de lubricină [25, 26]. Un alt grup de substanțe cercetate, cu potențial de inhibiție a procesului degradării cartilajului după o leziune la nivel de articulație, au fost agenții pentru protecția matricii cartilaginoase. Din aceste substanțe fac parte captatorii de specii reactive de oxigen, inhibitorii de oxid nitric, inhibitorii de citokine inflamatorii și inhibitorii specifici de MP [27]. În testele ce au fost efectuate *in vitro* și pe model animal, au fost obținute rezultate promițătoare în utilizarea factorilor de creștere cu scop de a stimula regenerarea cartilajului lezat prin activarea procesului anabolic al cartilajului [28]. Rezultate bune au fost obținute și la utilizarea proteinelor morfogenetice osoase BMP-7 și BMP-2, datorită efectelor sale anabolice și anticatabolice asupra cartilajului [29, 30, 172], printre care se enumeră stimularea regenerării și reparării cartilajului articular și asigurarea integrării eficiente a cartilajului nou format cu cel din jur [31]. Efecte similare au fost obținute și la utilizarea de *Insulin-like growth factor-1* în defectele de cartilaj cauzate de artroză [227]. Având în vedere că metodele non-chirurgicale de tratament ale defectelor de cartilaj nu au obținut o răspândire vastă și rămân doar la nivel de laborator și centre de cercetare, regenerarea defectelor de cartilaj articular a devenit în exclusivitate povara chirurgiei ortopedice și medicinei regenerative.

Tratamentul chirurgical al defectelor de cartilaj articular la nivelul articulațiilor mari în mare parte a depins de accesul către acestea. La compararea accesibilității către articulațiile șoldului, genunchiului, gleznei și umărului, tratamentul cartilajului articular la nivel de șold a fost mult mai complicat în realizare [10], iar cazurile ce ar necesita regenerarea cartilajului articular la nivel de umăr și gleznă au fost mult mai rare comparativ cu articulația genunchiului. Pentru a evita degradarea artrozică a articulației, tacticile contemporane de tratament, tind să repare chirurgical și defectele mici de cartilaj articular, care în cazul genunchiului reprezintă <4

cm² [8]. De regulă, scopul tratamentului leziunilor de cartilaj a fost reducerea sindromului algic, creșterea amplitudei mișcărilor în articulație și prevenirea sau întârzierea degradării artrozice a articulațiilor, ce se soldau cu invalidizarea pacientului, unde ca ultima ieșire din situație era efectuarea artroplastiei totale [32]. La ziua de azi au fost descrise numeroase modalități de tratament ale defectelor de cartilaj, din acestea fac parte diverse tehnici chirurgicale prin implicarea măduvei osoase [4, 35], transplantarea de țesut osteocondral alogen [36, 37] sau autolog [38, 39, 40], implantarea de condrocite autologe și CSM într-un defect combinate sau nu cu un suport tridimensional [41, 42, 43, 44]. Necătând la numeroase metode de tratament, obținerea în final a unui țesut cartilagos hialin nu a fost posibilă [44, 45]. Totodată, utilizarea în regenerarea cartilajului articular a grefelor combinate cu celule cu potențial condroprogenitor rămâne una de perspectivă [43, 44, 46]. A fost constatat că grefele combinate obținute pentru regenerarea cartilajului articular trebuie să consistă din structuri ce mimează cartilajul articular și trebuie să fie populate cu celule ce au potențial condroprogenitor [47, 172, 230].

Scopul: Restabilirea defectului experimental de cartilaj în articulația genunchiului prin utilizarea grefelor osteocondrale combinate obținute prin inginerie tisulară.

Obiectivele cercetării:

1. Elaborarea și optimizarea metodelor de izolare și cultivare a celulelor cu potențial condroprogenitor din țesuturi autologe - cartilaj hialin și măduvă osoasă;
2. Conceperea unei grefe osteocondrale pentru recuperarea defectelor de cartilaj articular;
3. Transplantarea grefelor combinate cu celule cu potențial condroprogenitor în defectele experimentale;
4. Determinarea potențialului de regenerare a defectelor critice experimentale de cartilaj articular create la nivelul suprafeței portante a articulației prin utilizarea grefelor combinate, comparativ cu lotul martor.

Noutatea științifică a cercetării. În premieră au fost elaborate și implementate în practica de laborator mai multe tehnici de lucru inovaționale, metode de procesare și dispozitive:

1. Implementarea unei tehnici inovaționale de prelevare a măduvei osoase din care au fost izolate celule stem pentru realizarea testelor *in vivo* cu celule autologe;
2. Elaborarea unui procedeu de cultivare a CSM ce a constat în înlăturarea completă a celulelor de contaminare când CSM ajungeau la o confluență de 40-50%, ceea ce a permis obținerea în primul pasaj a unei purități înalte a CSM transplantate;
3. Reducerea semnificativă a duratei izolării unei cantități mari de condrocite cu o viabilitate înaltă;
4. Elaborarea unei modalități noi de izolare a celulelor prin utilizarea explantelor;

5. Au fost obținute și testate diverse tipuri de grefe osteocondrale obținute prin tehnici de inginerie tisulară din țesut alogen pentru combinare cu celule autologe;
6. A fost elaborat și aplicat în practică un dispozitiv nou special îndreptat spre combinarea grefelor de dimensiuni mici cu celule;
7. A fost realizată în premieră stabilirea cantității reale și a viabilității celulelor la momentul transplantării;
8. A fost elaborat un scor histologic special pentru evaluarea obiectivă a rezultatelor obținute;
9. A fost simplificată modalitatea de identificare a celulelor izolate prin cultivarea acestora în supraconfluență urmată de colorarea histochimică specifică pentru țesutul cercetat.

Importanța teoretică. Rezultatele cercetării vor servi drept dovezi științifice în procesul de obținere și utilizare a grefelor combinate, constituite din celule autologe cu potențial condroprogenitor – condrocite și celulele stem mezenchimale din măduva osoasă, cu o greă obținută prin demineralizarea și decelularizarea țesutului osteocondral alogen.

Valoarea aplicativă a lucrării. Experiența dobândită în procesul obținerii de celule cu potențial condroprogenitor, de grefe ierarhic bifazice ce au fost testate *in vitro*, dar și a grefelor combinate cu ulterioara lor testare *in vivo*, este utilizată ca bază în executarea lucrărilor similare în cadrul laboratorului. De asemenea, lucrarea poate fi utilă în ghidarea clinicienilor în pregătirea și transplantarea grefelor similare.

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele obținute în cadrul studiului experimental au fost implementate în cadrul Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare, în procesul de efectuare a altor teze de doctorat și de instruire a studenților, rezidenților și medicilor la Catedra de anatomie și anatomie clinică, la cursul de Medicină Regenerativă în cadrul USMF “Nicolae Testemițanu”.

Aprobarea rezultatelor cercetării. Rezultatele studiului au fost prezentate la:

1. Al VIII-lea congres național de ortopedie și traumatologie cu participare internațională. Chișinău, Republica Moldova, 26-27 august 2016.
2. Conferința Probleme actuale în traumatologie și osteosinteză. Cernăuți, Ucraina, 27-28 martie 2017.
3. Simpozionul de Medicină regenerativă - știință practică și interdisciplinaritate. Iași, România, 18-20 octombrie 2017.
4. Al 26-lea Congres anual al Asociației Europene a Băncilor de Țesuturi și Celule. Treviso, Italia, 18-20 octombrie 2017
5. Al II-lea Congres Internațional de Biomedicină. Sofia, Bulgaria, 17-19 noiembrie 2017.
6. Congresul Mondial al Societății Internaționale de Inginerie Tisulară și Medicină Regenerativă, TERMIS 2018. Kyoto, Japonia, 4-7 septembrie 2018.

7. Expoziția Internațională Specializată „Infoinvent”. Edițiile a XV-a și a XVI-a. Chișinău, 2017 și 2019.
8. Congresul Medical Internațional pentru Studenți și Medici tineri, MedEspera 2018.
9. Expoziția internațională de inovare și cercetare științifică a studenților „Cadet INOVA” Edițiile a 18-a, a 19-a și a 20-a. Sibiu, România, 2018, 2019 și 2020.
10. Expoziția europeană de creativitate și inovație EUROINVENT Edițiile a 10-a, a 11-a, a 12-a și a 13-a și Conferința Internațională de Cercetare Inovatoare-ICIR EUROINVENT Edițiile a 11-a și a 13-a Iași, România, 2018, 2019, 2020 și 2021.
11. Salonul Internațional al Cercetării Științifice, Inovării și Invenției „Proinvent”. Edițiile a XVI-a, a XVII-a și a XVIII-a. Cluj-Napoca, România, 2018, 2019 și 2020.
12. Conferința Internațională de Estetică - Abordări Plastice și Regenerative în Medicină și Chirurgie, CONFESTESIS-2019. Iași, România, 24-26 octombrie 2019.
13. Simpozionul Internațional de inginerie chimică și materiale, SICHEM 2020. București, România, 17-18 septembrie 2020.
14. Congresul Național al Asociației „Romtransplant”. Iași, România, 23-26 septembrie 2020.
15. Conferința Internațională de Nanotehnologii și Inginerie Biomedicală. Chișinău, 3-5 noiembrie 2021.
16. Conferința Științifică Anuală a USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2017, 2018, 2020 și 2022.

Rezultatele tezei au fost discutate, aprobate și recomandate spre susținere în cadrul ședinței comune a Catedrei de anatomie și anatomie clinică și a Laboratorului de inginerie tisulară și culturi celulare, USMF „N. Testemițanu” din Republica Moldova, Proces verbal Nr. 7 din 25.05.2023; în cadrul Seminarului științific de profil 341. Biotehnologii cu aplicație în medicină, 321. Medicină generală, specialitățile 321.24. Transplantologie, 341.01. Inginerie tisulară și culturi celulare, Proces Verbal Nr. 3, din 21.06.2023.

Sumarul compartimentelor tezei

Teza este expusă pe 170 de pagini și constă din următoarele compartimente: introducere, 6 capitole, discuții de generalizare, concluzii, recomandări practice, un indice bibliografic cu 255 surse. Materialul ilustrativ este prezentat în 12 tabele și 59 figuri.

Capitolul 1 al tezei „**Cartilajul articular – structura, ontogeneza, etiopatogeneza leziunilor de cartilaj articular, clasificare și metode de tratament**” prezintă o culegere a celor mai recente date științifice referitoare la cartilajul articular. Principiile de funcționare a cartilajului articular până la ziua de azi nu sunt complet elucidate, însă este cunoscut faptul că acesta este un țesut cu proprietăți vâsco-elastice activitatea normală a căruia depinde de calitatea stimulilor mecanici cărora este supus zilnic, aportul de nutrienți, evacuarea deșeurilor și vârsta.

Se consideră că lipsa vaselor sangvine, a nervilor și vaselor limfatice în structura cartilajului articular, în caz de leziune, este cauza unui răspuns inflamator exagerat ce duce treptat la creșterea semnificativă a zonei afectate. Există numeroase cazuri de defecte ale cartilajului asimptomatice, iar metodele de tratament nechirurgical nu sunt eficiente. La ziua de azi există numeroase tehnici de tratament chirurgical ce au scopul de a regenera sau restaura cartilajul articular, cu obținerea în final în majoritatea cazurilor a țesutului fibrocartilagenos în loc de cartilaj hialin.

Capitolul 2 al tezei „**Metodologie generală**” conține prezentarea generală a studiului efectuat cu calcularea numărului de animale necesare pentru formarea loturilor pentru studiul experimental *in vivo*. De asemenea, în acest capitol sunt descrise criteriile de includere și excludere a animalelor în cercetare, dar și protocoalele de preparare și stocare a reactivilor necesari pentru efectuarea studiilor *in vitro* și *in vivo*. Protocoalele utilizate fiind cele de preparare a mediilor de izolare și cultură celulară pentru condrocite și CSM, a mediului de diferențiere condrocitară din CSM, protocoale necesare pentru pregătirea soluțiilor enzimaticе, pentru efectuarea testelor de citotoxicitate cu MTT, microscopie fluorescentă cu DAPI și examinare microscopică cu scop de determinare a GAG. Pe lângă acesta, în acest capitol mai sunt descrise tehnica de efectuare a anesteziei animalului și metodele de prelucrare statistică a datelor.

În capitolul 3 al tezei „**Izolarea, cultivarea și identificarea celulelor stem mezenchimale din măduva osoasă**” a fost testată eficacitatea izolării CSM din MO, cultivarea și diferențierea celulelor pe cale condrocitară cu scop de a demonstra că celulele obținute sunt CSM și nu alte celule de origine mezenchimală. De asemenea, a fost demonstrat că chiar un singur ml de măduvă osoasă prelevată de la animalele experimentale prezintă o cantitate suficientă pentru a obține un număr mare de CSM cu capacitate de diferențiere, ce pot fi utilizate pentru testele *in vitro* sau *in vivo* pe animale

Capitolul 4 „**Izolarea și cultivarea condrocitelor din cartilajul articular de iepure**” se referă la optimizarea procesului de izolare și cultivare a condrocitelor din cartilajul articular prin reducerea perioadei de expunere a cartilajului articular hialin la digestia cu soluții enzimaticе utilizate cu scop de a elibera condrocitele din acesta. A fost dovedit că reducerea duratei expunerii la enzime ca urmare a utilizării metodei de monitorizare continuă, permite izolarea unui număr mai mare de condrocite cu o viabilitate înaltă.

Capitolul 5 „**Obținerea grefei bifazice din țesut osteocondral prin tehnici de inginerie tisulară**” este dedicat în întregime procesului de obținere, testare și selectare a grefei ce ulterior a fost combinată cu condrocite sau CSM izolate după metodele stabilite în capitolele precedente. Cu acest scop a fost determinată concentrația de ADN, au fost efectuate teste de biocompatibilitate celulară prin evaluarea citotoxicității și potențialului de populare celulară a

probelor. Pe lângă aceasta, au fost determinate viteza de degradare enzimatică, gradul de hidrofilie și modulul de elasticitate a probelor. În urma testelor efectuate, pentru continuarea cercetărilor *in vivo* a fost selectată grefa osteocondrală demineralizată, decelularizată cu soluție de 1% SDS.

În capitolul 6 „**Testarea *in vivo* a grefelor combinate în regenerarea cartilajului articular**” au fost create loturile experimentale de animale la care într-un defect critic creat pe suprafața portantă a condilului femoral medial au fost implantate grefele selectate în studiul precedent și combinate cu condrocite și CSM autologe. Lotul martor a fost reprezentat prin defectele de cartilaj ce au fost tratate prin transfer de țesut osteocondral autolog prelevate de pe zonele neportante ale cartilajului articular. Animalele au fost scoase din experiment la 6 și 12 săptămâni. Evaluarea rezultatelor a fost efectuată prin colorarea secțiunilor cu Hematoxină-Eozină, Safranin O și Albastru de toluidină cu Fast Green. Cu scop de evaluare obiectivă a fost creat Scorul unificat al cartilajului regenerat, conform căruia 2 experți au evaluat independent rezultatele, iar datele obținute au fost evaluate statistic pentru a putea deduce concluzii obiective.

În ultimul capitol „**Discuții de generalizare**” au fost comparate rezultatele studiilor între ele și clarificate unele aspecte ale izolării și cultivării celulelor. De asemenea, în capitolul respectiv a fost făcută o paralelă cu studii similare elucidând punctele slabe și forte ale lucrărilor.

Compartimentul „**Concluzii generale**” a inclus analiza sumară a rezultatelor obținute în cadrul studiilor efectuate, cu accentuarea eficacității utilizării metodelor și dispozitivelor elaborate în cadrul cercetării, iar compartimentul „**Recomandări practice**” include momente importante în realizarea eficientă a cercetărilor cu caracter similar.

Cuvinte-cheie: celule stem, condrocite, grefe combinate, grefe ierarhic bifazice, țesut osteocondral, demineralizare, decelularizare, transplantare, cartilaj hialin, populare celulară.

1. CARTILAJUL ARTICULAR – STRUCTURA, ONTOGENEZA, ETIOPATOGENEZA LEZIUNILOR DE CARTILAJ ARTICULAR, CLASIFICARE ȘI METODE DE TRATAMENT

1.1 Structura cartilajului articular.

Cartilajul articular reprezintă un țesut conjunctiv de tip hialin înalt specializat al articulațiilor diartrodiale cu proprietăți vâsco-elastice unice, funcția principală a căruia este asigurarea unei suprafețe netede [2, 8, 42, 94, 102, 110], lubrificate pentru un grad scăzut de frecțiune și facilitarea transmiterii sarcinilor către osul subcondral [42, 48, 103]. Cartilajul articular uman are o grosime de aproximativ 2-4 mm, este compus în mare parte din apă ce reprezintă 65-80% din volum și dintr-o matrice extracelulară densă ce conține 2-5% de celule înalt specializate, numite condrocite. Cartilajul articular este lipsit de inervație, vase sangvine și limfatice [2, 7, 15, 48, 49].

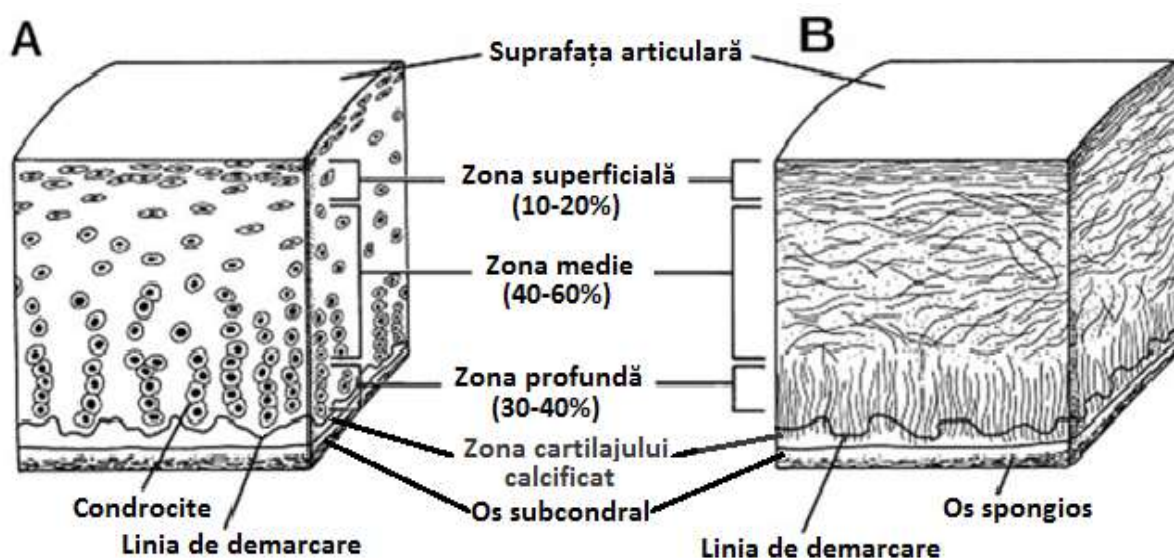


Figura 1.2. Schema structurii cartilajului articular sănătos: A – organizarea celulelor cartilajului articular pe zone; B – repartizarea fibrelor de colagen pe zone (desen preluat și tradus din *Sports Health*. 2009;1(6):461-8 [2]).

Cartilajului articular hialin în dependență de repartizarea fibrelor de colagen și a celulelor din cadrul matricei extracelulare constă din 4 zone și 3 regiuni [2] (figura 1.2). Zonele cartilajului articular sunt: superficială, medie, profundă și de cartilaj calcificat [2, 49, 102].

- Zona superficială reprezintă circa 10-20% din grosimea cartilajului, conține un număr mare de condrocite aplatizate, este în contact direct cu lichidul sinovial, protejează straturile profunde de forțele de frecțiune, tracțiune și compresiune. În această zonă fibrele de colagen au o structură densă și sunt aranjate paralel față de suprafața articulară [2, 50]. Condrocitele zonei

superficiale produc o peliculă fluidă, glicoproteică, foarte subțire numită lubricină, ce asigură lubrifierea suprafețelor articulare și reduce efectul forțelor de frecare și uzură în timpul încărcării ciclice normale din timpul mersului [26, 51, 102].

- Zona medie sau zona de tranziție, din punct de vedere funcțional și anatomic aceasta reprezintă trecerea de la zona superficială la cea profundă [2, 15]. Zona respectivă asigură rezistența cartilajului articular la forțele de compresiune și constituie circa 40-60% din grosimea cartilajului [2]. În cadrul acestei zone fibrele de colagen sunt mai groase ca în zona superficială și au o repartizare oblică, iar condrocitele sunt sferice și cu o densitate mică [2, 48].
- În zona profundă fibrele de colagen au o aranjare perpendiculară față de suprafața articulară [2, 48]. Aceasta zonă asigură cea mai înaltă rezistență față de forțele de compresiune, reprezintă 30% din grosimea cartilajului articular, dispune de cea mai mare grosime a fibrelor de colagen ce au o orientare radială [15, 48], cea mai înaltă concentrație de proteoglicani și cea mai mică concentrație de apă [15]. Condrocitele sunt aranjate în coloane ce au orientare verticală față de linia articulară și paralel fibrelor de colagen. Zona profundă este separată de zona cartilajului calcificat prin linia de demarcare [2, 48].
- Zona cartilajului calcificat joacă un rol important în fixarea cartilajului de os. Aceasta este realizată prin ancorarea fibrelor de colagen a zonelor profunde la osul subcondral [2]. Această zonă deține o populație foarte săracă de condrocite hipertrofiate [2, 8, 48], iar prin perforațiile plăcii osului subcondral din osul subcondral trabecular pătrund ramificații subțiri de artere, vene și nervi [48, 88, 89]. Densitatea acestor perforații este cea mai înaltă în zonele puternic solicitate ale cartilajului articular [2, 52, 90].

Matricea extracelulară a cartilajului articular se împarte în 3 regiuni: pericelulară, teritorială și interteritorială [2, 48]. Delimitarea acestor regiuni se face în dependență de raportul față de condrocite, compoziția chimică, grosime și orientarea fibrelor de colagen [15, 48].

- Regiunea pericelulară este un strat subțire adiacent condrocitului, ce îl înconjoară, este compusă din proteoglicani, glicoproteine și alte proteine necolagenice, având funcția de transmitere a semnalului de acțiune mecanică prin cartilaj [2, 53].
- Regiunea teritorială este compusă dintr-o rețea de fibre de colagen ce înconjoară regiunea pericelulară, cu funcție de protecție contra șocurilor mecanice și încărcării mecanice înalte a acesteia [2, 54, 55].
- Regiunea interteritorială constă dintr-o cantitate mare de proteoglicani și asigură realizarea proprietăților biomecanice a cartilajului articular [54, 56]. Această zonă se caracterizează prin orientarea aleatorie a fasciculelor fibrelor de colagen – în zona superficială fibrele sunt

dispuse paralel cu suprafața cartilajului, în zona medie oblic și în zona profundă perpendicular față de suprafața articulară [2].

1.1.1 Matricea extracelulară

MEC este compusă din agregate mari de proteoglicani (PG) care constau dintr-o moleculă de acid hialuronic la care sunt atașate aproximativ 100 molecule de glicozaminoglicani (GAG) [26, 50, 58]. Din acești PG, agrecanul este principalul PG al cartilajului articular (CA), ce constă dintr-o bază proteică, GAG și lanțuri de oligozaharide [2, 48, 57, 58]. Matricea extracelulară a cartilajului articular este puternic hidratată. În timpul compresiei dinamice a cartilajului ce induce deformarea celulelor și MEC [226], în cartilaj pătrunde apa ce asigură transportul și distribuția de nutrienți, citokine macromoleculare, factori de creștere, enzime și alte substanțe prin cartilaj [2, 225, 226], către condrocite, dar și asigură lubrifierea suprafeței articulare [26, 50, 58, 70, 82]. Aproximativ 30% din apa cartilajului articular se află sub formă de gel în spațiul interfibrilar al fibrelor de colagen, iar la aplicarea unei compresiuni graduale pe cartilaj, aceasta poate migra prin matricea extracelulară [225]. Totuși, rezistența din interiorul cartilajului contra acestui flux de apă este foarte înaltă deoarece permeabilitatea țesutului este foarte joasă [26, 48, 58, 70, 82]. Astfel, rezistența înaltă față de fluxul de apă prin cartilaj și creșterea presiunii apei din interiorul matricii extracelulare formează 2 mecanisme de bază prin care cartilajul articular are capacitatea de a rezista la greutăți semnificative, adesea semnificativ mai înalte ca greutatea corporală [15, 48, 70].

Masa uscată a matricii extracelulare constă în mare parte din proteine colagenice și proteoglicani, cantități mici de lipide, fosfolipide, proteine necolagenice și glicoproteine [2, 15, 48]. Colagenul reprezintă aproximativ 60% din masa uscată a cartilajului, dintre care 90-95% este reprezentat de colagenul tip II ce formează legături cu agregate de proteoglicani [2, 48, 70], iar restul tipurilor de colagen sunt I, IV, V, VI, IX și XI, aceștia fortifică legăturile între fibrele de colagen tip II [2, 48, 58]. Proteoglicanii reprezintă circa 10-15% din matricea extracelulară, cei mai esențiali pentru funcționarea normală a cartilajului sunt agrecanul, decorina, biglicanul și fibromodulina [2, 59].

1.1.2 Condrocitele

Condrocitele sunt celule înalt specializate ce își au originea din celulele stem mezenchimale [2, 48, 58]. Condrocitele sunt celule active metabolic care asigură sintetiza și turnoverul unor volume mari de componente ale matricii extracelulare [49, 51, 55, 58] ca colagenul, glicoproteinele, proteoglicanii și acidul hialuronic [2, 48, 51]. Condrocitele se hrănesc în mare parte prin difuzia nutrienților dinspre suprafața articulară [72, 73], ele funcționează într-un mediu cu nivel de oxigen scăzut și turnover redus [51, 58]. Condrocitele variază după formă, număr și dimensiuni în dependență de regiunea anatomică a cartilajului articular. În zona

superficială acestea sunt aplatizate, mai mici și de o densitate mai mare comparativ cu celulele din zonele mai profunde [2]. Fiecare condrocit își crează un mediu ambiant propriu specializat. Ca consecință condrocitele sunt încercuite într-o structură creată în propria sa matrice extracelulară, numită lacună. Astfel, condrocitele fiind blocate în lacune, sunt lipsite de capacitatea de migrare în vecinătate, ceea ce duce la incapacitatea intrinsecă de regenerare în caz de leziune.

De asemenea, condrocitele sunt celule mecanosensibile, această particularitate contribuie major la producerea de matrice extracelulară și oferă capacitatea funcțională și mecanică de a rezista forțelor de compresie, tracțiune și forfecare în articulațiile diartrodiale [2, 49]. Încărcarea mecanică a CA stimulează metabolismul condrocitelor și induce biosinteza moleculelor ce asigură integritatea țesutului [60, 88, 91]. Prin semnalele mecanice create are loc modularea activității biochimice și modificarea comportamentului celular numită – mecanotransducție [51, 58, 60, 221]. Ca urmare a comprimării cartilajului, în cadrul acestuia au loc modificări complexe ale presiunii hidrostatice și osmotice, a fluxului de fluide, conținutului de apă uzată, concentrației de ioni, densității, în încărcătura electrică fixă a cartilajului, dar și deformarea matricii și a celulelor [58, 89, 90, 223]. Mecanoreceptorii de pe suprafața celulelor detectează aceste modificări și activează canale ionice mecanosensibile și integrine, cu inițierea unor cascade de semnalizare intracelulară inițiind procesul de remodelare a țesutului prin sinteza MEC [60, 88, 90, 225].

1.2 Ontogeneza cartilajului articular

CA hialin este țesut de origine mezodermală, un țesut de tip conjunctiv ce acoperă suprafețele articulare ce asigură transmiterea forțelor mecanice [2, 57, 62]. Pe parcursul dezvoltării, mezodermul dezvoltă niște somite și plăci laterale care apoi vor genera membrele și cartilajul articular [61, 228]. La 4 săptămâni de gestație din celule stem derivate din mezoderm se formează scheletul apendicular în formă de „Y” [61, 62], iar odată cu dezvoltarea membrilor, la 4-7 săptămâni de gestație, are loc creșterea densității celulelor ce ulterior se diferențiază în celule precondrogenice. Din aceste celule apoi se formează primordiile scheletogene care sunt de tip cartilagos [57, 61, 228]. Ulterior, o parte din celulele stem se diferențiază în condrocite persistente care produc cantități mari de MEC și colagen [63], formând cartilajul hialin și condrocite proliferative. Acestea din urmă formează zona de creștere unde condrocitele se hipertrofiază și produc factori de creștere ce asigură formarea vaselor sangvine [57, 62, 63]. Odată cu vascularizarea primordiilor scheletogene cartilaginoase, osteoblastele derivate din CSM secretă MEC ce se mineralizează și formează niște apofize osoase similare cu un ungher, ce devine centrul de osificare primar [61, 63, 228]. Centrul de osificare primar format apoi se transformă în spongioasă primară și ulterior în os trabecular, din care osul continuă să crească în

lungime [61, 62, 63]. La 8-12 săptămâni, la distanță de centrul de osificare primar, în primordiul scheletogen cartilaginos se formează centrul de osificare secundar [57]. Apoi, în imediata apropiere de centrul de osificare secundar, în cadrul primordiului scheletogen la nivelul viitoarei articulații are loc acumularea și condensarea unei populații de celule mezenchimale, numită interzonă [62, 63, 228]. Celulele din interzonă exprimă un nou set de gene ce sintetizează GDF-5 ce servește ca progenitor articular, prin generarea unui aflux continuu de celule noi produse în articulația în curs de dezvoltare [62, 228]. Condrocitele din cartilajul articular au o origine embrionară distinctă comparativ cu condrocitele care formează primordiul scheletogen cartilaginos din care se dezvoltă țesutul osos [228]. Condrocitele primordiului scheletogen sunt celule tranzitorii, ce proliferază, se hipertrofiază și intră în apoptoză înainte de formarea osului encondral. Aceste celule dispar după încetarea funcției plăcii de creștere, pe când condrocitele articulare au un fenotip stabil, permanent ce funcționează pe tot parcursul vieții [63].

În stadiile incipiente ale formării cartilajului articular condrocitele proliferază și produc cantități mari de MEC cu formarea unui țesut cu celule dens compactate [65], iar odată cu maturarea, dar și ca răspuns la aplicarea forțelor mecanice, cartilajul se remodelează, pierde din grosime, iar condrocitele se hipertrofiază [57, 65, 225]. Articulațiile sinoviale au adesea o formă unică, cu suprafețe complexe care se potrivesc între ele datorită ajustării osoase, însă cum acest proces are loc pe parcursul ontogenezei nu este clar [65, 66]. Morfogeneza articulației începe odată cu inițierea cavitației și formarea spațiului sinovial. Se presupune că capetele proximale și distale ale elementelor scheletice dintr-o articulație cresc simultan pentru a se completa reciproc într-o structură interconectată cu suprafețele congruente [57, 66].

Cele mai importante schimbări structurale și biochimice în cartilaj pe parcursul dezvoltării și maturării sunt legate de colagen și proteoglicani. Aceasta se manifestă prin sinteza unor cantități mari de MEC care devine tot mai reticulată odată cu vârsta, iar ca urmare a glicozilării colagenului are loc creșterea rigidității cartilajului. Fibrele de colagen care inițial erau aranjate aleatoriu, se organizează în straturi distincte sub acțiunea forțelor mecanice [57, 62]. De asemenea, pe parcurs concentrația de proteoglicani descrește ca urmare a descompunerii acestora în entități mici de glicozaminoglicani [63, 64]. Scade și concentrația de condroitin sulfat în aggrecan, iar concentrația de acid hialuronic și keratan crește în special în zonele supuse încărcării mecanice [61, 63, 64, 225, 228]. Maturarea completă a cartilajului are loc la momentul când este atinsă și cea a scheletului, la 18-21 ani, aceasta fiind motivul de ce capacitatea de proliferare a condrocitelor este aproape egală cu zero după această perioadă, iar celulele mature mai trăiesc pe parcursul a câteva decenii, densitatea lor reducându-se semnificativ odată cu vârsta. Aceste modificări se mai manifestă și prin activitate metabolică redusă, sinteză scăzută a

MEC, un răspuns scăzut la factori de creștere și capacitatea reparatorie mult mai proastă [57, 62, 63, 64, 225].

1.3 Etiopatogeneza leziunilor de cartilaj articular

CA este un țesut conjunctiv specializat ce acoperă suprafețele articulare și facilitează transmiterea sarcinilor cu un coeficient scăzut de frecțiune [57]. Doar că îmbătrânirea, încărcarea mecanică excesivă și factorii genetici influențează negativ homeostazia acestuia, fiind implicate în patogeneza bolilor degenerative ale articulațiilor [57, 226]. Leziunile de cartilaj sunt o verigă importantă în patogeneza degradării degenerativ distrofice a articulațiilor, cauzele leziunii cartilajului sunt diverse, acestea pot fi legate de artroză, artrite, traumatisme, necroză avasculară, vârstă, obezitate și hipodinamie [1, 2, 34, 40, 57, 67, 87, 127, 132, 206, 226]. De asemenea, un factor important în patogeneza leziunilor de cartilaj poate servi lipsa sau pierderea capacității stratului cartilajinos superficial de sinteză a lubricinei, ce poate fi dobândită [25, 26, 70, 71] cât și de origine congenitală ca urmare a mutațiilor în gena proteoglican 4 [68]. Un alt factor important ce duce la degradarea și leziunea cartilajului articular este dereglarea aportului de nutrienți spre cartilaj [225, 226]. Lichidul sinovial, ca sursă principală de nutrienți pentru cartilajul articular, ca să asigure o nutriție calitativă a acestuia, trebuie să aibă anumite proprietăți fizico-chimice, conținut corespunzător de nutrienți și să fie distribuit corespunzător pe suprafețele articulare, iar pătrunderea lichidului sinovial în grosimea cartilajului este necesar să fie asigurată printr-o încărcare articulară fiziologic normală, realizată în timpul efectuării mișcărilor în articulații [61, 89, 225, 226]. Astfel, în caz de dereglare a acestui proces, ar putea fi afectată transportarea nutrienților necesari cu lichidul sinovial în grosimea cartilajului și acumularea deșeurilor acide precum lactatul și a CO₂, asigurând o nutriție inadecvată a condrocitelor [89, 226]. Pătrunderea fluidului spre interiorul cartilajului și ieșirea din acesta în timpul mișcărilor articulare, asigură pomparea substanțelor dizolvate în lichidul sinovial prin MEC, asigurând nutriția și îndepărtarea produselor metabolice [60, 89, 226]. De asemenea, trebuie de ținut cont și de faptul că încărcarea mecanică excesivă, constantă și îndelungată a cartilajului comparativ cu încărcarea fiziologic normală, influențează negativ metabolismul cartilajului, deoarece cartilajul din material cu proprietăți poroelastice devine unul cu proprietăți de material solid [89, 225], împiedicând tranzitul lichidului sinovial prin cartilaj, ducând la un dezechilibru cantitativ între activitatea anabolică și cea catabolică, ce se soldează cu deteriorarea MEC și pierderea de GAG și collagen [72, 73, 226]. De asemenea, la dereglarea procesului de circulație a apei și a nutrienților prin cartilajul articular duce și fibrozarea acestuia [146, 200], aceasta fiind o consecință a proceselor patologice ce au loc la nivel de articulație, sau ca rezultat al tentativelor eșuate de regenerare a cartilajului articular. Ținând cont de modalitatea de nutriție a cartilajului articular, fibroza acestuia include un cerc vicios ce duce la degradarea mai rapidă a

cartilajului [91, 147, 165, 200]. Alte cauze ce duc la leziuni de cartilaj este instabilitatea articulară cauzată de leziuni ligamentare [74], menisc [10, 75], o leziune anterioară de cartilaj [20] și cauze congenitale [76, 77]. În acest caz din motivul repartizării anormale a forțelor mecanice în cadrul articulației are loc expunerea unor părți ale suprafeței articulare la stres mecanic excesiv, ce va duce ulterior la un proces de lezare progresivă a cartilajului articular, soldându-se în final cu artroză [18].

Conform trendului modern, factorul patogenetic central în apariția defectelor de cartilaj este dereglarea aprovizionării cartilajului articular cu nutrienți și înrăutățirea procesului de evacuare a deșeurilor [225, 226]. Doar că, odată ce leziunea de cartilaj este constituită, indiferent de cauză se activează un răspuns inflamator condrocitar exagerat ce nu poate fi mediat, deoarece cartilajul articular este lipsit de vascularizare, inervare și vase limfatice. În consecință are loc creșterea semnificativă a ariei leziunii cartilajului, ducând ulterior la dezvoltarea artrozei [2, 22, 89]. În procesul patogenetic al dezvoltării artrozei cauzate de leziunea cartilajului articular, în special a celei posttraumatice îl au MP, dezintegrina A și metaloproteinazele (ADAM), dezintegrina A și metaloproteinazele cuplate cu motive de trombospondină (ADAMTS) și catepsinele. Acestea sunt familii de enzime proteolitice extracelulare ce provoacă degradarea componentelor matricei extracelulare a cartilajului după leziuni articulare [21, 79, 80]. Enzimele ADAMTS la fel ca și MP și ADAM sunt metaloendopeptidaze de zinc asociate cu matrici în multe domenii proteice și fac parte din superfamilia metzincin a proteazelor. Enzimele ADAMTS au roluri diverse în morfogeneza tisulară și remodelarea fiziopatologică a țesuturilor, în procesele inflamatorii și în biologia vasculară. Enzimele umane ADAMTS se împart în 19 grupuri [81], printre care există așa subgrupuri ca agrecanaze sau proteoglicanaze ce clivează proteinele cu același nume, dar și versican, brevican și neurocan [82], procologen N-propeptidaze ce scindează proteina esențială în maturarea fibrelor de colagen în structura helicoidală tridimensională [83], enzime ce clivează matricile proteice oligomerice ale cartilajului [84], proteinaza factorului von-Willebrand și altele [21]. A fost constatat că odată ce un anumit grad de artroză este constituit, are loc creșterea expresiei factorului de creștere a celulelor endoteliale vasculare (VEGF) în lichidul sinovial, ceea ce duce la moartea condrocitelor și activarea condroclastelor ce asigură degenerarea continuă a cartilajului, fapt specific pentru artroză [85, 86].

Ca urmare a cascadei de procese patogenetice cartilajul devine slăbit, aceasta se manifestă prin reducerea proprietăților mecanice, pierderea de GAG, denaturarea rețelei colagenice, dereglarea integrității structurale a matricii, reducerea capacității de lubrifiere a suprafeței articulare cu uzura și distrugerea accelerată a cartilajului [90, 225, 226]. Ca urmare a pierderii de GAG are loc reducerea densității sarcinii electrice negative fixe a cartilajului, ce limitează

capacitatea acestuia de reținere a unui volum constant de lichid, reducând astfel proprietățile mecanice ale cartilajului [87]. De asemenea, alterarea structurii colagenului reduce atât volumul de lichid captat de către cartilajul articular, dar și permeabilitatea MEC pentru lichide [87, 90, 223].

Cele descrise anterior se referă în special la partea cartilajului articular ce primește nutriția prin difuzia din lichidul sinovial. Zonele profunde de cartilaj ce se nutresc prin difuzia nutrienților prin placa osului subcondral, pot suferi modificări structurale degenerative în caz de oprire a acestui proces [88, 91]. Chiar dacă nutriția zonelor profunde ale cartilajului articular nu este critică pentru întregul strat cartilagininos [88, 90], deoarece viteza de difuzie prin placa osului subcondral este de aproximativ 5 ori mai slabă comparativ cu difuzia lichidului sinovial [89], aceasta este de o mare importanță în asigurarea bunăstării zonelor profunde ale cartilajului articular [89, 90, 91].

1.4 Clasificarea leziunilor de cartilaj

La moment există mai multe clasificări ale leziunilor de cartilaj, de la cele mai simple în dependență de zona de interes – condrale și osteocondrale [10], la cele mai complexe:

1. Clasificarea ICRS (International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society) [13]:

- Gradul 0: cartilaj normal, fără leziuni;
- Gradul I: fisurare superficială:
 - a. Indentare ușoară;
 - b. Fisuri și crăpături mici;
- Gradul II: <50% în adâncime;
- Gradul III: de la 50% până la pierderea totală a grosimii:
 - a. Extinderea mai mult de 50% din grosimea cartilajului;
 - b. Extinderea până la stratul de cartilaj calcificat;
 - c. Extinderea până la osul subcondral;
 - d. Delaminare a cartilajului, formare de blistere;
- Gradul IV: extinderea leziunii prin osul subcondral:
 - a. Penetrarea unei zone < 50% din diametrul orizontal al osului subcondral, în raport cu defectul de cartilaj;
 - b. Penetrarea unei zone > 50% din diametrul orizontal al osului subcondral, în raport cu defectul de cartilaj [92].

2. Clasificarea Outerbridge [93, 94]:

- Gradul 0: cartilaj articular normal;
- Gradul I: înmuierea, formarea de blistere sau edemarea cartilajului;
- Gradul II: fisuri superficiale și crăpături pe o suprafață <1 cm în diametru;

- Gradul III: fisuri în toată grosimea, până la osul subcondral pe o suprafață >1 cm în diametru;
- Gradul IV: eroziunea cartilajului articular cu expunerea osului subcondral.

3. Clasificarea Bauer–Jackson [95]:

- Gradul I: leziune liniară;
- Gradul II: leziune stelată;
- Gradul III: formarea de lambou cartilaginos;
- Gradul IV: defect de cartilaj sub formă de crater;
- Gradul V: leziune cu aspect fibrilar al cartilajului;
- Gradul VI: expunerea osului subcondral.

1.5 Metode chirurgicale de reparare a leziunilor de cartilaj articular

Metodele de tratament conservator nu rezolvă problema leziunii structurii cartilajului articular, iar regenerarea spontană în general lipsește pentru defectele critice de cartilaj $\geq 3 \text{ cm}^2$ [8, 42], ca urmare repararea sau stimularea procesului de regenerare a cartilajului se efectuează prin tehnici de tratament chirurgical [47, 96]. Tehnicile respective sunt diverse fiecare având avantajele și dezavantajele proprii, dar și un anumit nivel de eficacitate:

1. Tratament paliativ;
2. Tehnici de stimulare a regenerării cartilajului articular prin implicarea măduvei osoase:
 - Artroplastia de abraziune;
 - Forajul subcondral;
 - Microfracturi;
 - AMIC;
3. Transplant de țesut osteocondral:
 - Autolog;
 - Alogen;
4. Tehnici de regenerare a cartilajului articular prin Inginerie tisulară:
 - ACI generația I și II;
 - MACI;
 - MASI.

De asemenea, tehnicile de restabilire a cartilajului articular mai pot fi clasificate în proceduri reparatorii și de restaurare [12, 95, 230]. Tehnicile reparatorii constau în reconstituirea defectului într-o manieră ce nu neapărat restabilesc arhitectura cartilajului [12], însă pot atenua simptomele. Acestea constau în penetrarea osului subcondral pentru expunerea rețelei vasculare a osului spongios ca în defectul de cartilaj să se scurgă sânge din MO cu CSM pentru a forma cheag [12, 95]. Pe când tehnicile chirurgicale de restaurare au ca scop reconstrucția completă a microarhitecturii cartilajului și restabilirea funcțiilor biomecanice și fiziologice ale acestuia [12,

230]. Astfel de tehnici sunt transplantul de țesut osteocondral și tehnicile de inginerie tisulară [12, 97, 230].

1.5.1 Tratament paliativ

Lavajul și debridarea artroscopică a articulației, pentru prima dată a fost descrisă de Burman în 1935 [2]. Procedura constă în spălarea articulației sinoviale lezate cu ser fiziologic în timpul artroscopiei, asociată cu înlăturarea fragmentelor de cartilaj lezat și decolat, a osteofitelor, meniscurilor degenerate și a sinoviei hipertrofiată [98]. Aceasta poate fi efectuată cu shaver, laser sau electrocauter. Eficiența acestei metode nu are bază științifică și biologică, este o abordare terapeutică ce la moment se indică doar în înlăturarea bucăților de cartilaj ce duc la blocarea articulației sau leziuni de menisc [95].

1.5.2 Tehnici de stimulare a regenerării cartilajului prin implicarea măduvei osoase

Artroplastia de abraziune

Popularizată la începutul anilor 1980 de Johnson [2, 101] reprezintă o intervenție chirurgicală paliativă indicată în cazurile de leziune severă a cartilajului articular într-o articulație, la pacienți cu necesități funcționale reduse, ca alternativă artroplastiei totale [99]. Metoda constă în lavajul și debridarea artroscopică a marginelor defectului de cartilaj articular [95], pentru crearea unui contur uniform al defectului față de suprafața articulară și fixarea cheagului fibrinic de marginile avivate ale cartilajului [95, 99, 100]. Apoi, din zona lipsită de cartilaj cu un burghiu sau chiuretă se înlătură osul devitalizat până la o adâncime de 1-3 mm ca sângele să pătrundă în defect și să formeze cheagul fibrinic [100]. Metoda respectivă a prezentat rezultate contradictorii, fără vre-o diferență comparativ cu rezultatele tratamentului medicamentos sau placebo [99]. În literatură a fost menționat că în circa 33% cazuri funcția articulară s-a deteriorat și mai mult la termen de 5 ani după efectuarea procedurii [101].

Forajul subcondral

O metodă de stimulare a regenerării cartilajului prin implicarea măduvei osoase în premieră a fost efectuată de Smille și Dundee în 1957, dar popularizată de Pridie din 1959 [2]. Aceasta metodă constă în debridarea artroscopică a marginelor leziunii [4], după care în craterul format, cu un burghiu subțire sau o broșă Kirschner se efectuează forajul osului subcondral [11, 103], cu înlăturarea minuțioasă a stratului de cartilaj calcificat, drept urmare are loc acumularea sângelui la nivelul defectului cu formarea cheagului [4, 102]. Găurile se fac paralel la distanță de 3-4 mm una față de alta și de adâncimea necesară pentru a porni sângerarea [4, 11, 103], iar cu scop de a evita necroza termică a osului din timpul forajului, a fost necesară implementarea unui instrumentar standartizat [4, 11]. Din punct de vedere morfologic în loc de cartilaj hialin s-a format fibrocartilaj, iar din punct de vedere clinic la termen de 5 ani postoperator rezultate clinice excelente prezentau 70% dintre pacienți [102, 103].

Microfracturile

Primele date despre utilizarea tehnicii de microfracturi în osul subcondral în tratamentul leziunilor de cartilaj a fost la începutul anilor 1980 [2, 107], dar dezvoltată și popularizată de Steadman [25, 102]. Această metodă este considerată standart de aur în tratamentul leziunilor de cartilaj articular cu dimensiunile sub 2 cm² [104, 105]. Metoda constă în debridarea artroscopică a cartilajului lezat și a unor porțiuni mici marginale de cartilaj sănătos, pentru a forma un prag de înălțimea cartilajului [35, 231]. Apoi, de la baza craterului format se înlătură completamente stratul de cartilaj calcificat, după care cu un set de sule subțiri angulate la 30°, 45°, 90° și cu un ciocan se fac găuri perpendiculare față de suprafața osului în osul subcondral [102], de 3-4 mm adâncime, la distanță de 2-4 mm una de alta, fără a leza placa osului subcondral [104, 106]. Ca urmare a procedurii este necesară o conduită postoperatorie specială. Cartilajul rezultat ca urmare a acestei proceduri, la fel a fost de tip fibrocartilagos cu proprietăți mecanice slabe [35, 107, 231].

Tehnica AMIC (Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis)

Este o modificare a tehnicii Microfracturilor, fiind dezvoltată în anii 2000 în Germania și aplicată pe larg în Suedia [104, 108, 111]. Metoda constă în utilizarea unei membrane din colagen tip I/III, pentru a acoperi defectul de cartilaj în care se formează cheagul din măduva osoasă acumulată în defect după efectuarea microfracturilor [108, 109, 110], cu scop de a obține o umplere mai bună a defectului și a păstra stabilitatea mecanică a cheagului [104, 105]. Această tehnică poate fi asociată cu aplicarea suplimentară de PRP [104, 111] sau concentrat celular de măduvă osoasă autologă (CCMOA) [109, 110]. Membrana de colagen tip I/III se suturează sau se lipește cu clei fibrinic de marginile cartilajului sănătos [108, 111]. Necătând la rezultatele clinice bune, examenul imagistic prin RMN a arătat că defectele tratate nu prezentau o umplere normală [109, 110].

1.5.3 Transplantul de țesut osteocondral sau resurfatarea suprafeței articulare

Transferul de țesut osteocondral autolog, tehnica de Mozaicoplastie

Transferul sau transplantarea de țesut osteocondral pentru prima dată a fost raportată de Outerbridge în 1995 [112] și popularizată de Hangody, Morgan și Bobic în 1997 [2, 114]. Aceasta poate fi efectuată pe articulație deschisă prin aborduri mici sau artroscopic. Candidații pentru o astfel de intervenție sunt persoanele cu vârsta până la 50 ani, IMC sub 35 și cu o leziune de cartilaj până la 2 cm², din cauza disponibilității limitate a grefei [38, 113, 172]. Conform altor surse, transferul de țesut osteocondral autolog poate fi utilizat în tratamentul defectelor de cartilaj <4 cm², situate în regiunea portantă a suprafeței articulare, fără leziuni ligamentare sau de menisc ireparabile [112, 114]. Metoda constă în transferul mai multor grefe osteocondrale de formă cilindrică, mai numite dopuri osteocondrale, cu înălțimea între 6 și 15 mm diferite ca diametru

[38, 112, 237], prelevate cu un burghiu cav din regiunea neportantă a trohleei femurale de la nivelul aceleiași sau altei articulații [40, 115]. După care grefele prelevate se implantează în găurile preformate cât mai aproape de marginea cartilajului articular sănătos cu ajutorul unui instrument gradat, modelând conturul suprafeței cartilajinoase normale [40, 112, 238]. Metoda a prezentat rezultate foarte bune la 10 ani postoperator, iar riscul complicațiilor postoperatorii după 5 ani era de 13% [115]. În alt studiu, efectuat pe sportivi, la termen de 3 ani comparativ cu microfracturile, a arătat că la 96% din pacienții tratați prin transfer de țesut osteocondral autolog au fost înregistrate rezultate bune și excelente, iar din cei tratați prin tehnica de microfracturi rezultate bune și excelente au prezentat 57% din pacienți [39]. La examenul histologic după un an postoperator la pacienții tratați prin mozaicoplastie era prezent țesut cartilajinos hialin, pe când la cei tratați prin microfracturi era prezent țesut de tip fibrocartilajinos [38, 116, 172]. Din neajunsurile acestei tehnici sunt morbiditatea zonei de prelevare, imposibilitatea tratării pacienților cu defecte mari de cartilaj din cauza stocului redus de țesut grefabil, imposibilitatea aplicării metodei de tratament la pacienți cu osteonecroză și degradare artrozică generalizată a articulației [114], deficiențe tehnice legate de prelevarea și inserarea grefei sub același unghi și imposibilitatea utilizării metodei în cazul leziunilor mai profunde 10 mm, aceasta fiind legată de dificultatea obținerii unei grefe atât de lungi din prima încercare [32, 112, 114]. Într-un studiu, la termen de 10 ani după realizarea transferului de cartilaj articular, a fost determinat că aproximativ 90% din pacienți prezentau rezultate bune sau excelente [39, 117].

Transplantarea de țesut osteocondral alogen

Este o metodă utilizată în cazul când diametrul defectului de cartilaj este mai mare de 2.5 cm și nu poate fi acoperit cu autogrefă din zona neportantă a suprafeței articulare fără cauzarea unor prejudicii suplimentare articulației [36, 119, 238]. Comparativ cu utilizarea de grefe autologe, utilizarea alogrefelor evită lezarea părții donatorii și nu este limitată de dimensiunea defectului, ca urmare pot fi transplantați chiar și condilii femurali [5, 37]. De asemenea, deoarece cartilajul articular nu este vascularizat, respectiv nu este nici imunogen [118], ceea ce permite utilizarea grefelor alogene în tratamentul defectelor de cartilaj [118, 119]. În calitate de alogrefe osteocondrale pot fi utilizate atât grefe prelevate în primele 24-72 ore, acestea fiind păstrate în medii de conservare, cât și grefe crioprezervate [120, 121, 238]. Grefele proaspăt prelevate conțin un număr mare de condrocite viabile, doar că prezintă un oarecare risc de rejet sau transmitere a diferitor maladii [118, 120]. Din contra, grefele crioprezervate prezintă un risc redus de rejet, cât și de transmitere a maladiilor [5, 118], însă lipsa de condrocite vii împiedică realizarea turnover-ului matricei extracelulare, ceea ce este un factor nefavorabil supraviețuirii cartilajului pentru perioadă îndelungată [5, 119, 120]. Pentru asigurarea supraviețuirii cartilajului articular alogen pe o perioadă mai îndelungată este necesar ca numărul de condrocite vii să nu fie

mai mic de 70% [120, 121]. Conform datelor literaturii, alogrefele ce au fost obținute din genunchi prelevat integral cu capsula intactă de la donatori cu vârsta sub 30 ani și păstrate la +4C° în soluție Ringer lactat timp de 24 ore, au prezentat o rată de succes în 85% cazuri după transplantare în 126 de genunchi a 123 pacienți, iar supraviețuirea grefelor fiind de 95% la termen de 5 ani și 77% la termen de 10 ani [122]. De asemenea, este necesar de menționat că grefele alogene pot fi modelate după forma și dimensiunea defectului ce necesită a fi suplinit [123, 124, 237]. Pe lângă aceasta, îmbunătățirea tehnicilor de conservare a cartilajului alogen în direcția creșterii viabilității condrocitelor din alogrefele osteocondrale proaspăt prelevate [5, 118, 119], cât și accelerarea remodelării grefei în țesutul gazdă, sunt investigate în mod continuu [125], deoarece ambii factori par a fi importanți în longevitatea și funcționarea alogrefei transplantate [5, 125]. Într-un studiu în care au fost transplantate grefe osteocondrale alogene proaspete, rata de supraviețuire a grefelor era de 82% la termen de 10 ani și 66% la termen de 20 ani după transplantare [126].

Ca urmare a utilizării tehnicilor de transfer al țesutului osteocondral autolog și transplantarea de grefe osteocondrale alogene, a fost determinată o rată înaltă de supraviețuire a grefelor, dar și un nivel înalt de satisfacere a pacienților la utilizarea ambelor tipuri de grefe, cu reluarea activității sportive de către unii din ei [125, 126, 127].

De asemenea, grefele autologe și alogene se clasifică drept grefe ierarhice, deoarece constau din tipul de țesut ce trebuie regenerat și bifazice, deoarece au o structură ce constă din 2 componente – cartilaj și țesut osos [200]. Transferul de țesut autolog a fost utilizat în tratamentul defectelor experimentale în lotul martor.

1.5.4 Tehnici de regenerare a cartilajului articular prin Inginerie tisulară

Tehnica ACI (Autologous Chondrocyte Implantation)

Este o metodă de reparare a defectelor de cartilaj articular ce a fost elaborată în Suedia la sfârșitul anilor 1980 de către Peterson și Brittberg [2, 128], la moment prin această metodă au fost tratați peste 35 mii de oameni din toată lumea [41, 132]. Se recomandă persoanelor cu vârsta până la 55 de ani cu dimensiunea defectelor de cartilaj cuprinsă între 2 și 12 cm² [128, 132]. Tehnica constă din 2 etape:

- Prima etapă constă în prelevarea prin artroscopie de pe suprafața articulară neportantă, sănătoasă, a 200-300 mg de cartilaj articular, din care mai apoi în condiții specifice de laborator se izolează și se cultivează condrocitele până la concentrația de 5-10x10⁶ celule/cm³ de cartilaj lezat, în mediu pentru 4-6 săptămâni [41, 42].
- Următoarea etapă constă în debridarea defectului cartilajinos și avivarea marginilor cartilajului [2, 42, 128, 129], urmată de prelevarea unui lambou periostal de pe tibia proximală a cărui diametru să fie cu 2 mm mai mare ca cel al defectului de cartilaj [128, 129, 132]. Lamboul se

suturează de marginile cartilajului sănătos [41, 134], la necesitate sutura se etanșează cu colagen, acid hialuronic sau clei fibrinic [41, 128]. În final condrocitele cultivate se injectează sub periostul ce acoperă defectul cu o seringă [129].

În tehnica ACI de I generație cu scop de a reține condrocitele în defect se utilizează lamboul periostal, iar în cea de generația II se utilizează o membrană de colagen tip I/III [128, 130, 132, 133]. Necătând la rezultatele bune ce au fost prezentate, tehnica are și multe neajunsuri ca: necesitatea efectuării minimum a 2 intervenții chirurgicale, posibila izolare a unui număr mic de condrocite [2, 41, 42, 128, 134], o perioadă îndelungată de cultivare în pasaje ce duce la degradarea fibroblastică a condrocitelor [2, 42, 129, 132, 133] și reducerea semnificativă a calității matricii cartilaginoase sintetizate [130, 132, 133]. De asemenea, există complicații legate de lamboul periostal ca detașarea acestuia, delaminarea și calcifierea lamboului [2, 41, 133], hipertrofia periostală tardivă, scurgerea celulelor și blocarea genunchiului [128, 129], costul înalt al procedurii, complicații de ordin septico-purulent [2, 131].

Tehnica MACI (Matrix-assisted Autologous Chondrocyte Implantation)

Mai numită și generația III de ACI a început să fie utilizată din anul 2000 [2, 41]. Inițial a fost înregistrată ca marcă comercială a Genzyme Biosurgery [231]. Tehnica constă în utilizarea unei structuri biologice tridimensionale, numită matrice, ce se combină cu condrocite și se implantează în regiunea defectului [128, 132, 231]. Grefa combinată se fixează de marginile cartilajului avivat cu câteva suturi sau clei fibrinic [128, 231]. Din puținele studii efectuate a fost constatată repararea defectelor de cartilaj cu rezultat funcțional bun în 80% cazuri [12].

Tehnica MASI (Matrix-assisted Autologous Stem-cells Implantation)

După esență este aceeași tehnică ca și MACI doar că în loc de condrocite sunt utilizate CSM care la fel sunt combinate cu o matrice tridimensională și transplantată într-un defect [43, 44]. Spre deosebire de tehnica MACI, aceasta nu necesită prelevarea de cartilaj articular și izolarea de condrocite [135, 136]. CSM pentru transplantare pot fi obținute din sinovia articulară ce se prelevează prin artroscopie [135] sau din măduva osoasă [136]. Rezultatele ce au fost obținute după utilizarea acestei tehnici la termen de 2 ani după transplantare, par să fie mai bune comparativ cu cele obținute prin utilizarea tehnicii MACI [135].

Tehnicile actuale de reparare a cartilajului articular utilizând terapia celulară permit conturarea implantului în dependență de defectul ce necesită a fi regenerat [43], făcând aceste tehnici mai indicate în tratarea unor defecte mai mari de 3-4cm² [10, 135], dar și a celor localizate în zone cu topografie variabilă [10].

2. METODOLOGIE GENERALĂ

Studiul realizat a fost aprobat de Comitetul de Etică a Cercetării USMF „Nicolae Testemițanu”, fiind examinat la ședința din 14 decembrie 2016, cu emiterea avizului favorabil nr. 31 din 14.12.2016.

2.1 Prezentarea generală a studiului efectuat

Pentru realizarea scopului propus iepurele a fost o alegere perfectă, comparativ cu utilizarea rozătoarelor. Deoarece, pe lângă faptul că iepurele are particularități anatomice și filogenetice similare cu cele ale omului, acesta este bine cunoscut și utilizat pe scară largă în laboratoare de cercetare [7, 132, 137]. De asemenea, iepurii sunt animale docile, ocupă puțin spațiu, necesită puțină îngrijire și sunt suficient de mari pentru majoritatea procedurilor chirurgicale, în special, pentru testarea biomaterialelor [7, 16]. Studiul experimental pe iepuri a fost efectuat în perioada anilor 2016-2019.

În cercetarea efectuată m-am condus de primul din conceptele “celor trei R”, adoptat de Congresul Internațional de Standardizare Biologică (San Antonio, SUA, 1979) [236]. Ca urmare, în cercetare au fost utilizați 55 iepuri de casă, cu vârsta de 5 ± 0.5 luni, masa corpului de 3.51 ± 0.49 kg, 30 femele și 25 masculi. Criteriile de includere și excludere din experiment sunt prezentate în tabelul 2.1.

Conform formulei (1) a fost stabilit numărul de animale necesare pe grup:

$$n = \left(\frac{t \cdot CV}{\varepsilon} \right)^2 \quad (1);$$

unde n – numărul de animale în fiecare lot de cercetare; t – valorile limite de distribuție ale t -Student test, ce corespunde nivelului de 95.0% exactitate; CV – valoarea a coeficientului de variație din surse bibliografice. Numărul de animale într-un lot ce a asigurat veridicitatea datelor, la o eroare de 5.0 %, pentru indicii $\alpha = 0.05$ ($t = 1.98$, $df > 120$) și coeficientul de variație $CV = 9\%$.

$$n = \left(\frac{1.96 \cdot 9\%}{5\%} \right)^2 = 12.44$$

Au fost create 3 loturi a câte 12 iepuri: primul lot consta din iepurii defectele experimentale ale cărora au fost tratate cu grefe OCDD combinate cu condrocite, al doilea lot era alcătuit din iepurii a căror defecte experimentale au fost tratate cu grefe OCDD combinate cu CSM și lotul martor consta din iepurii defectele de cartilaj a cărora au fost tratate prin transfer de țesut osteocondral autolog. Au fost înregistrate 7 cazuri de eșec, dintre care 2 fracturi intraoperatorii și 5 decese la termeni diferiți, care au fost înlocuiți cu alții. Doar un iepure cu fractură a fost utilizat ulterior în calitate de donator de țesuturi.

Tabelul 2.1. **Criterii de includere și excludere din experiment.**

Criterii de includere în experiment:	Criterii de excludere din experiment:
<ul style="list-style-type: none"> - vârsta cuprinsă între 4 și 6 luni; - masa corpului > 2.5 kg; - vaccinați la termen conform graficului vaccinărilor pentru animale; - practic sănătoși. 	<ul style="list-style-type: none"> - infecții ale țesuturilor moi preoperator; - plăgi și defecte ale țesuturilor moi la nivelul bazinului și genunchilor preoperator; - patologii congenitale ale membrelor; - nevaccinați, cu patologii infecțioase; - redoare severă a articulațiilor operate; - dezaxare în membrele operate; - fracturi la nivelul membrelor inferioare; - infectarea grefelor; - moartea animalului experimental.

În calitate de donatori de celule și țesuturi pentru efectuarea cercetărilor au servit 13 iepuri. Celulele obținute au fost CSM izolate din MO și condrocitele izolate din CA hialin, iar de la femurele distale a fost colectat țesutul osteocondral pentru pregătirea grefelor OCDD. Iepurii donatori de țesuturi au fost eutanasiați în camera cu CO₂.

Teza are o structurare Tradițională complexă, iar studiile prezentate în cadrul acesteia au fost realizate în 3 etape, ce sunt prezentate în tabelul 2.2.

Tabelul 2.2. **Designul studiului.**

Nr. etapei	Denumirea etapei
Etapa I	Izolarea și cultivarea celulelor cu potențial condroprogenitor și obținerea din țesut osteocondral alogen, prin tehnici de inginerie tisulară, a unei grefe ierarhic bifazice demineralizate și decelularizate potrivite, pentru regenerarea defectului experimental.
Etapa II	Studiul experimental <i>in vivo</i> . Plastia defectului experimental critic de țesut osteocondral cu grefe alogene obținute, combinate cu celule stem mezenchimale din măduva osoasă autologă și condrocite autologă.
Etapa III	Evaluarea rezultatelor testelor <i>in vivo</i> comparativ cu lotul martor.

2.2 Prepararea și păstrarea reactivilor

Pentru realizarea cercetărilor cu celule au fost pregătite următoarele soluții și medii de cultură:

1. Mediu de cultură pentru condrocite: mediu de nutriție DMEM (Sigma, Marea Britanie) – 500 ml, ser fetal bovin (SFB) (Lonza, Belgia) – 55 ml, factor de creștere a fibroblastelor-2 (FGF-2) (Prospec, SUA) – 5.5 μg, factor de creștere transformator β-2 (TGFβ-2) (Prospec, SUA) – 550 ng/ml, vitamina C – 13.75 mg, ultraglutamină de 200 mM (Lonza, Belgia) – 5.5 ml, penicilină – 55000 U, streptomycină – 55 mg și amfotericina B – 137.5 μg. Mediul a fost sterilizat cu sistem de filtrare cu pori de 0.22 μm în diametru (Sofra, China) și păstrat în frigider la 4-8°C.

2. Mediul pentru izolarea și cultivarea CSM: 11,4 ml de componentă B au fost adăugate la 500 ml de componenta A al Mediului pentru Expansiunea Celulelor Stem Mezenchimale HiMesoXL (HiMedia, India) și 5 ml de soluție de antibiotic antimicotic (HiMedia, India).

Mediul a fost sterilizat cu sistem de filtrare cu pori de 0.22 μm (Sofra, China) și păstrat în frigider la 4-8°C.

3. Mediul pentru diferențierea condrocitară: adăugarea componentei B la 100 ml de componenta A ale mediului de diferențiere condrocitară HiChondroXL (HiMedia, India) și 1 ml de soluție de antibiotic antimicotic (HiMedia, India). Mediul a fost sterilizat cu sistem de filtrare cu pori de 0.22 μm (Sofra, China) și păstrat în frigider la 4-8°C.

4. Mediul pentru cultura CSM: mediu de nutriție DMEM/F-12 Ham (Sigma, Marea Britanie) 500 ml, SFB (Lonza, Belgia) – 55 ml, penicilină – 55000 U, streptomycină – 55 mg și amfotericina B – 137.5 μg . Mediul a fost sterilizat cu sistem de filtrare cu pori de 0.22 μm (Sofra, China) și păstrat în frigider la 4-8°C.

5. Soluție colagenază 0.6% pentru izolarea condrocitelor prin digestie enzimatică: mediu de nutriție DMEM (Sigma, Marea Britanie) – 100 ml și colagenază de *Clostridium histolyticum* (Sigma, Marea Britanie) – 600 mg. Soluția a fost sterilizată prin filtru de seringă cu porii de 0.2 μm (Isolab, Germania), împărțită în alicote a câte 10 ml și păstrată în congelator la temperaturi mai jos de -20°C.

6. Soluție Tripsină-EDTA 0.25%: Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) fără calciu și magneziu, cu roșu de fenol (Gibco, Marea Britanie) – 100 ml, EDTA – 37.2 mg (Sigma, Germania), Tripsină din pancreas porcină (Sigma, SUA) și soluție NaOH de 0.1 N, sub controlul pH-ului. Soluția a fost sterilizată prin filtru de seringă cu porii de 0.2 μm (Isolab, Germania), împărțită în alicote a câte 5 ml și păstrată în congelator la temperatura de -20°C.

7. Mediu pentru conservarea celulelor: DMSO (Alchimia, Italia) cu 10% de SFB (Lonza, Belgia). Mediul obținut a fost folosit imediat.

Pregătirea reactivilor pentru testul de citotoxicitate cu MTT:

1. Soluția stock MTT de 0.5% m/v: în 30 ml de HBSS fără fenol roșu (Sigma, Marea Britanie), în condiții obscure s-au adăugat 150 mg de pulbere MTT (Sigma, Marea Britanie) ce a fost dizolvată pe un agitator magnetic (MS 3000, Biosan). Soluția de MTT a fost sterilizată prin filtrare cu filtru de seringă PES, cu porii de 0.22 μm (Isolab, Germania), fiind împărțită pe alicote în tuburi a câte 4.5 ml, care au fost acoperite cu folie de staniol și congelate la -20°C.

2. Soluția de lucru MTT 0.5% v/v pentru CSM a fost pregătită în DMEM/F-12 Ham (Sigma, Marea Britanie), iar pentru condrocite în DMEM (Sigma, SUA), prin diluarea a 2.5 ml soluție stock MTT de 0.5% m/v în 47.5 ml mediu de cultură specific tipului de celule, în eprubete de 50 ml. Înainte de utilizare soluțiile de lucru au fost încălzite până la 37°C și utilizate în aceeași zi.

Pentru examinarea probelor la microscopia fluorescentă cu DAPI au fost pregătite următoarele reactive:

1. Soluția de 4% paraformaldehidă a fost obținută prin dizolvarea a 6 gr. de paraformaldehidă (PFA) (Sigma, Germania) în 130 ml de DPBS (Sigma, Marea Britanie) prin agitare la 60°C, cu adăugarea ulterioară a câte o picătură de 1M NaOH până la limpezirea soluției. Apoi, volumul soluției a fost adus la 150 ml și filtrat prin hârtie de filtru și pus la păstrare în congelator la -20°C.

2. Soluția stock de 1mM DAPI în DMSO – în condiții obscure, 5 mg pulbere DAPI (Sigma, Germania) au fost diluate în 11 ml de DMSO (Alchimia, Italia), soluția a fost agitată până la dizolvarea completă a DAPI. Apoi, soluția obținută a fost împărțită pe alicote, câte 1 ml în tuburi Eppendorf de 1.5 ml, care au fost acoperite cu folie de staniol și păstrate în congelator la -20°C.

3. Soluția de lucru DAPI a fost obținută prin dizolvarea a 1μl DAPI în 1mM în DMSO la 20 ml de DPBS (Sigma, Marea Britanie). Soluția a fost utilizată imediat după pregătire.

4. Soluția de permeabilizare membrară a fost obținută prin dizolvarea în 40 ml de PBS (Sigma, Marea Britanie) a 2 ml de Triton-X 100 (HiMedia, India), 360 mg de NaCl (Sigma, Germania) și 6 mg de MgCl₂ (Stanchem, Polonia). Soluția a fost păstrată în frigider la 4°C timp de 5 zile.

Pentru efectuarea testului de degradare enzimatică au fost pregătite următoarele reactive:

1. Reactivul de ninhidrină a fost obținut prin dizolvarea a 2.83×10^{-3} moli de SnCl₂·2H₂O în 250 ml de soluție tampon citrat (Sigma, Germania) cu pH =5. Apoi, a fost amestecat cu soluția de 2-Metoxietanol (Sigma, Germania) ce conținea 10 gr de ninhidrină (Sigma, Germania). Recipientul a fost învelit în folie de staniol pentru a fi ferit de lumină. Reactivul a fost stocat în frigider la 4°C timp de 2 săptămâni.

2. Soluția colagenază de 0.01% a fost obținută prin dizolvarea în 120 ml de PBS pH 7.4, a 12 mg de colagenază din *Clostridium histolyticum* (Sigma, Germania). Soluția a fost stocată în frigider la 4°C timp de 2 săptămâni.

Pentru examinarea histologică au fost pregătite următoarele reactive:

1. Soluția de 10% Formaldehidă buferizată a fost obținută prin adăugarea de soluție formaldehidă de 40% în PBS, raportul de 1:3. Sub controlul pH-lui (pH-150M, ГЗИП), utilizând soluția de 5 M NaOH, nivelul pH-ului a fost adus la 7.4. Soluția obținută a fost filtrată prin filtru de 0.45 μm (Biosigma, Italia) și păstrată la temperatura camerei.

2. Soluția de 0.4% Albastru de Toluidină a fost obținută prin adăugarea la 150 ml de 0.1M Bufer acetat de natriu cu pH de 4 a 600 mg de pulbere de Albastru de Toluidină O (Sigma, SUA). Reactivul a fost păstrat în frigider la 4°C

3. Soluția de 0.1M Bufer acetat de natriu a fost obținută prin adăugarea la 100 ml de apă distilată a 2.04 gr de acetat de sodiu (Sigma, Germania) și reducerea pH-ului până la 4 prin adăugarea de Acid acetic glacial (Stan Chem, Polonia).

4. Obținerea soluției de 0.02% Fast Green prin adăugarea la 125 ml de apă distilată a 0.025 gr de pulbere Fast Green (Sigma, SUA). Soluția a fost păstrată la temperatura camerei, ferită de lumină.
5. Soluția de 0.001% Fast Green a fost obținută prin diluarea a 10 ml soluție de 0.02% Fast Green în 190 ml apă distilată. Soluția a fost păstrată la temperatura camerei, ferită de lumină.
6. Soluția de 0.1% Safranin O a fost obținută prin dizolvarea în 150 ml de apă distilată a 150 mg pulbere Safranin O (Sigma, SUA). Soluția a fost păstrată în frigider la 4°C.
7. Soluția de 1% acid acetic a fost obținută prin diluarea a 2 ml de 99.8% acid acetic glacial (Stan Chem, Polonia) în 198 ml apă distilată. Soluția a fost folosită imediat.

Pregătirea pieselor histologice, secționarea, aplicarea pe lame și colorarea cu Hematoxină-Eozină a fost efectuată în cadrul Secției de Morfopatologie a Spitalului Municipal Nr. 3, ”Sfânta Treime”. Colorarea secțiunilor cu Albastru de Toluidină și Safranin O a fost efectuată de sine stătător în cadrul Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare.

2.3 Anestezia animalelor

Pentru realizarea cercetărilor experimentale la animalele de laborator, toate intervențiile au fost efectuate cu anestezie generală. În ziua intervenției, iepurii pe nemâncate au fost cântăriți. Subcutan, la nivelul șoldului sau spatelui s-a injectat soluție xylla 5 mg/kg (De Adelaar, Olanda), soluție diazepeks 0.5% – 2 mg/kg (Grindex, Letonia) și soluție ketamin 35 mg/kg (Farmako, Moldova) [140]. La fiecare 30 de minute s-a adăugat câte o jumătate din doza inițială de preparate pentru prelungirea anesteziei. Cu un trimer a fost înlăturată blană de la nivelul părții dorsale a bazinului sau membrului inferior la care a fost planificată intervenția chirurgicală. Regiunea operatorie a fost aseptizată cu soluție de 10% povidon-iod (EGIS, Ungaria) și alcool 70% (Eladum Pharma, Moldova). Cu scop de potențare a anesteziei la nivelul regiunii unde a fost preconizată intervenția chirurgicală au fost injectate suplimentar 4 ml lidocaină de 1% (Balkan Pharmaceuticals, Moldova). Câmpul operator a fost delimitat cu cearșafuri sterile. Pentru prelevarea de țesuturi necesare în obținerea grefelor alogene demineralizate și decelularizate, animalele experimentale au fost eutanasiate în camera cu CO₂.

2.4 Metode de prelucrare statistică a rezultatelor obținute

Analiza statistică a rezultatelor obținute a fost realizată cu ajutorul programului Excel din Microsoft Office versiunea 2020, prin intermediul căruia variabilele continue au fost exprimate ca medie ± deviere standard ($X \pm DS$), au fost create tabelele și diagrame din cadrul tezei, iar cu ajutorul programului SPSS (Statistical Package for the Social Sciences. Versiunea 18.0, Inc. Chicago, IL, SUA), a fost efectuată prelucrarea statistică a datelor obținute în cadrul studiilor și create graficele.

Pentru compararea și precizarea diferențelor statistic semnificative între parametrii evaluați în dependență de valoarea medie a fost aplicat testul parametric Independent Samples t -Test (2) pentru compararea loturilor când dimensiunile eșantionului pentru fiecare grup este egal (testul Levene $p > 0.05$), iar în cazul în care dimensiunile eșantionului pentru fiecare grup diferă și valoarea lui p nu este de încredere a fost utilizat testul t -Welch (testul Levene $p < 0.05$). De asemenea, atunci când una sau mai multe dintre ipotezele pentru testul t pentru eșantioane independente nu sunt îndeplinite, este posibil de utilizat testul nonparametric Mann-Whitney U [232]. Ipoteza pentru Independent Samples t -Test poate fi exprimată în felul următor:

$H_0: \mu_1 = \mu_2$ (mediile celor 2 populații sunt egale);

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ (mediile celor 2 populații nu sunt egale);

unde μ_1 și μ_2 sunt mediile populației pentru grupul 1 și grupul 2, H_0 este ipoteza nulă iar H_1 ipoteza alternativă. În cazul când dimensiunile eșantionului pentru fiecare grup este egal atunci:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (2);$$

iar $S_p = \sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$, unde \bar{x}_1 este media primului eșantion; \bar{x}_2 este media celui de-al doilea eșantion; n_1 - numărul de observații ale primului eșantion; n_2 - numărul de observații ale celui de-al doilea eșantion; s_1 - deviația standard a primului eșantion; s_2 - deviația standard a celui de-al doilea eșantion și S_p - deviația standard cumulată.

Testul One-Way ANOVA, de asemenea este un test parametric ce compară mediile a două sau mai multe grupuri independente pentru a determina dacă există dovezi statistice că mediile populației asociate sunt semnificativ diferite. Spre deosebire de Independent Samples t -Test, testul One-Way ANOVA poate compara mediile din trei sau mai multe grupuri [233].

Testul statistic chi-patrat (χ^2) este un test nonparametric, ce determină dacă există vreo asociere între variabilele categoriale (3). Pentru analiza datelor acest test folosește tabele de contingență. Testul chi-patrat (χ^2) nu poate compara variabile continue între ele sau face comparație între variabile categoriale și continue [234]. Ipoteza pentru testul chi-patrat (χ^2) poate fi exprimată în felul următor:

H_0 : „[Variabila 1] nu se asociază cu [Variabila 2]”

H_1 : „[Variabila 1] se asociază cu [Variabila 2]”

unde H_0 este ipoteza nulă, iar H_1 ipoteza alternativă [234]. S-a calculat după formula:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^R \sum_{j=1}^C \frac{(o_{ij} - e_{ij})^2}{e_{ij}} \quad (3);$$

unde o_{ij} este numărul de celule observat în rândul i și coloana j a tabelului, iar e_{ij} este numărul de celule așteptat în rândul i și coloana j a tabelului.

Coeficientul de corelație Pearson ρ (“rho”) este un coeficient de corelație parametric a rangurilor variabilelor (4). În cazul în care o variabilă crește, iar a doua variabilă, de asemenea, crește, a fost determinată o corelație pozitivă, coeficientul de asociere fiind mai aproape de 1. În cazul în care o variabilă scade, iar cealaltă variabilă crește, atunci între ele există o corelație negativă, coeficientul de asociere fiind mai aproape de -1. În cazul în care coeficientul este 0, asocierea lipsește – ipoteza este nulă. Corelația dintre 2 variabile poate fi prezentată în felul următor:

$$R_{xy} = \frac{cov(x,y)}{\sqrt{var(x)*var(y)}} \quad (4);$$

unde $cov(x,y)$ este covarianța eșantionului pentru x și y ; $var(x)$ este varianța eșantionului x , iar $var(y)$ este varianța eșantionului y . Coeficientul de corelație Pearson, a fost interpretat după Hopkins în modul următor: $\rho < 0.1$ coeficientul de asociere este neglijabil sau foarte mic; pentru $0.1 \geq \rho < 0.3$ asocierea este mică; pentru $0.3 \geq \rho < 0.5$ gradul de asociere este moderat; $0.5 \geq \rho < 0.7$ coeficientul de asociere este mare; pentru $0.7 \geq \rho < 0.9$ – foarte mare; pentru $\rho > 0.9$ – coeficientul de asociere este aproape perfect și indică existența unei legături foarte puternice între două variabile. Coeficientul de corelație este interpretat în paralel cu valoarea p , care reprezintă probabilitatea de a obține rezultatele prezente. În cazul în care această probabilitate este mai mică de 5% ($p < 0.05$), coeficientul de corelație este statistic semnificativ.

De asemenea, cu scopul identificării diferențelor semnificative între cele 3 loturi de animale, la nivelul indicilor studiați a fost aplicat testul nonparametric Kruskal-Wallis (5), ce este o alternativă nonparametrică a testului ANOVA și o extindere a posibilităților testului Mann-Whitney U care este utilizat pentru compararea doar a două grupuri. Aceasta s-a aplicat în cazul în care grupele cercetate nu îndeplinesc cerințele testelor parametrice. Testul permite compararea în același timp a medianelor a două și mai multe loturi, determinând diferențele semnificative între grupe, însă fără a elucida cu certitudine lotul ce diferă de celelalte. Pentru a elucida lotul ce diferă de celelalte poate fi folosit uneori testul Dunn, testul Mann–Whitney U în pereche cu corecția Bonferroni. Ipoteza pentru testul Kruskal-Wallis poate fi exprimată în felul următor:

H_0 : medianele populației sunt egale;

H_1 : medianele populației nu sunt egale;

unde H_0 este ipoteza nulă, iar H_1 ipoteza alternativă.

Testul statistic Kruskal-Wallis (H) se definește în felul următor (5):

$$H = \left(\frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} \right) - 3(N + 1) \quad (5);$$

unde N este dimensiunea totală a eșantionului; n_j este dimensiunea eșantionului din grupul j și R_j este suma rangurilor din grupul j .

Testul Mann-Whitney U este un test nonparametric al ipotezei nule conform căreia pentru valorile selectate aleatoriu X și Y din două populații, probabilitatea ca X să fie mai mare decât Y este egală cu probabilitatea ca Y să fie mai mare decât X . Altfel spus acesta permite compararea a două grupuri, condiții sau tratamente fără prezumția că valorile sunt distribuite în mod normal (6). Acest test se bazează pe ranguri. Ipoteza pentru testul Mann-Whitney U poate fi exprimată în felul următor:

H_0 : distribuțiile ambelor populații sunt identice;

H_1 : distribuțiile ambelor populații nu sunt identice;

unde H_0 este ipoteza nulă iar H_1 ipoteza alternativă. Cu ajutorul testului s-au făcut calcule statistice a cărei distribuție sub ipoteza nulă este cunoscută. În cazul eșantioanelor mici, distribuția este tabelată, iar în cazul eșantioanelor mai mari, aproximarea folosind distribuția normală este destul de bună. Testul reunește observațiile din cele două eșantioane într-un singur eșantion combinat, ținând evidența din care probă provine fiecare observație și apoi le aranjează după rang, de la cel mai mic la cel mai mare. Formula de calcul pentru testul Mann-Whitney U este:

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1+1)}{2} - R_1 \text{ și } U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2+1)}{2} - R_2 \quad (6);$$

unde n_1 și n_2 reprezintă numărul de ranguri în grupul 1 și respectiv grupul 2; iar R_1 și R_2 reprezintă suma rangurilor din grupul 1 și grupul 2 respectiv.

De asemenea, pentru efectuarea testelor statistice am folosit și testul nonparametric, Kolmogorov–Smirnov par (7). Acesta este un test statistic complex și permite detectarea unor modele ce nu pot fi detectate cu Independent Samples t -Test sau t -Student test la compararea a două eșantioane [235]. Ipoteza nulă pentru testul Kolmogorov–Smirnov par este:

H_0 : ambele eșantioane provin dintr-o populație cu aceeași distribuție; iar formula de calcul este:

$$D_{m,n,\alpha} = c(\alpha) \sqrt{\frac{m+n}{mn}} \quad (7);$$

unde m și n sunt dimensiunile primului și, respectiv celui de-al doilea eșantion; iar $c(\alpha)$ este valoarea inversului distribuției Kolmogorov la nivelul de semnificație α , ce poate fi calculată sau luată din tabel [235].

3. IZOLAREA, CULTIVAREA ȘI IDENTIFICAREA CELULELOR STEM MEZENCHIMALE DIN MĂDUVA OSOASĂ

3.1 Introducere

Celulele stem mezenchimale sunt celule multipotente ce se pot diferenția în diferite linii celulare în funcție de micromediul în care sunt păstrate [141, 142, 143, 144, 145, 151]. Aceste celule pe larg au fost utilizate în cercetări legate de regenerarea țesutului osos, cartilajinos, tendon, menisc, leziuni degenerative ale aparatului locomotor, sistemului nervos și organelor interne [146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153]. Modalitățile de obținere a măduvei osoase de la animalele de laborator cu scop de izolare și cultivare a CSM pentru teste *in vitro* și *in vivo* sunt diferite. Inițial majoritatea extragerilor de măduvă osoasă au constat în sacrificarea animalelor și spălarea sub jet a diafizelor și epifizelor oaselor tubulare lungi, însă aceasta modalitate permite obținerea de celule stem pentru testele *in vitro*, iar pentru testele *in vivo*, celulele obținute puteau fi utilizate ca celule alogene [151, 154, 155, 156]. O altă metodă de obținere a MO este aspirarea acesteia de la nivelul metafizelor oaselor tubulare lungi. Această metodă necesită efectuarea unei anestezii profunde, incizia țesuturilor moi cu scop de expunere a zonei de interes și deschiderea canalului medular prin perforare cu burghiu [151, 157, 158, 159]. Această modalitate permite efectuarea experimentelor asupra animalului cu celule autologe, însă anestezia profundă, intervenția chirurgicală la nivel de femur distal, care cu siguranță nu va fi ultima și perioada de recuperare postoperatorie poate periclita reușita experimentului din cauza suferinței sau chiar morții animalului [151, 160]. O altă metodă este efectuarea unei anestezii de scurtă durată cu potențare locală și colectarea măduvei osoase din osul iliac printr-un ac introdus perpendicular în osul iliac, cu riscul mare de a străbate ambele corticale ale osului și leza organele bazinului [142, 143]. În cadrul laboratorului nostru a fost elaborat un procedeu similar de colectare a MO din osul iliac, în calitate de reper fiind procedura de colectarea a MO de la oameni [152, 161, 162, 163].

3.2 Metode

3.2.1 Izolarea și cultivarea CSM

În experiment au fost utilizați 9 iepuri, 3 masculi și 6 femele, cu vârsta între 4 și 5 luni, masa medie de 3.74 ± 0.26 kg. După efectuarea anesteziei și înlăturarea blănii de la nivelul bazinului cu un trimer, a fost aseptizat și delimitat câmpul operator cu material steril. A fost pregătită o seringă de 5 ml cu 1250-2000 U heparină (Balkan Pharmaceuticals, Moldova). Măduva osoasă a fost colectată din aripa osului iliac după o tehnică similară cu cea utilizată la oameni [152, 162, 163]. Cu un ac de 18 G (Van Oostveen, Olanda) însoțit de un trocar, din anterior spre posterior, paralel planului osului iliac, a fost străpunsă pielea și s-a ajuns până la

crista osului iliac. Cu mișcări încete, rotatorii și de avansare cu acul, crista osului iliac a fost perforată. Din ac a fost înlăturat trocarul, a fost conectată seringă heparinizată și a fost aspirată măduva osoasă [141, 142] (figura 3.1). Seringa cu măduvă osoasă a fost dusă imediat în laborator pentru procesare, iar animalul înapoi în vivariu.



Figura 3.1. Recoltarea de măduvă osoasă din osul iliac la iepure. Pregătirea animalului pentru prelevarea măduvei osoase (a, b), perforarea corticalei osului iliac cu acul de 18G (c, d) și aspirarea măduvei osoase (e).

În laborator seringă cu MO prelevată a fost introdusă în hota cu flux laminar (LN 090, Nuve). Preventiv, la baia de apă (BAE-2, Raypa) au fost încălzite gradientul de concentrație HiSep LSM 1077 (HiMedia, India), PBS (Lonza, Belgia) și mediul pentru izolarea și cultivarea CSM – HiMeso XL. Într-o eprubetă sterilă de 15 ml a fost turnat gradient de concentrație în volum egal cu volumul de măduvă osoasă prelevată [151]. Măduva osoasă prelevată a fost amestecată cu PBS (Lonza, Belgia) în raport de 1:1 și aplicată cu precauție pe suprafață gradientul de concentrație fără ca acestea să se amestece. Eprubetă a fost centrifugată la forța de 400 x g timp de 15 minute. După centrifugare, stratul cu celule mononucleate a fost prelevat și mutat în altă eprubetă [151]. Celulele mononucleate izolate au fost spălate cu PBS, iar după centrifugare la 170 x g timp de 10 minute (figura 3.2), celulele au fost spălate cu mediu de izolare și cultură pentru CSM. După centrifugare repetată, supernatantul a fost înlăturat, iar celulele resuspendate în 5 ml mediu de izolare și cultură pentru CSM [151] și introduse într-un flacon de cultură celulară de 25 cm² (Nunc, Danemarca). Flaconul a fost introdus în incubator (Smart Cell, Heal Force) la 37°C cu 5% CO₂ cu schimbarea a jumătate de mediu de nutriție fiecare 2-3 zile, iar de la o confluență celulară de 40-50% mediul de cultură a fost schimbat în

totalitate pentru înlăturarea maximală a celulelor de contaminare (figura 3.3). La confluența de 70-80% a celulelelor atașate de suprafața de cultură celulară, mediul de cultură celulară a fost înlăturat, suprafața de cultură celulară a fost spălată de 2 ori cu PBS, după care celulele au fost detașate prin tripsinizare cu 1 ml soluție de 0.25% tripsină-EDTA preîncălzită.

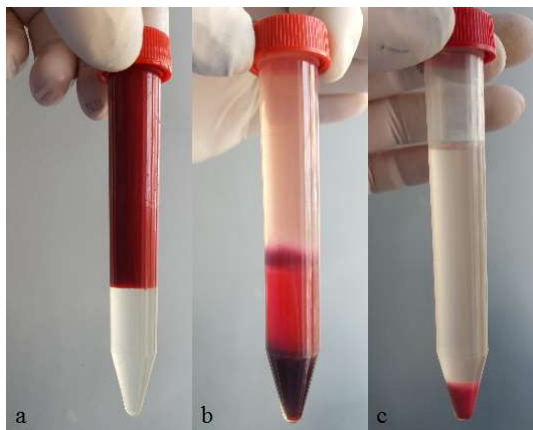


Figura 3.2. Procesarea măduvei osoase prelevate. Eprubeta de 15 ml cu PBS amestecat cu măduvă osoasă situat pe gradient de concentrație în raport de 1:1:1 (a), separarea pe straturi după centrifugare (b) și stratul cu celule nucleate de măduvă osoasă separat în altă eprubetă după spălare cu PBS (c).

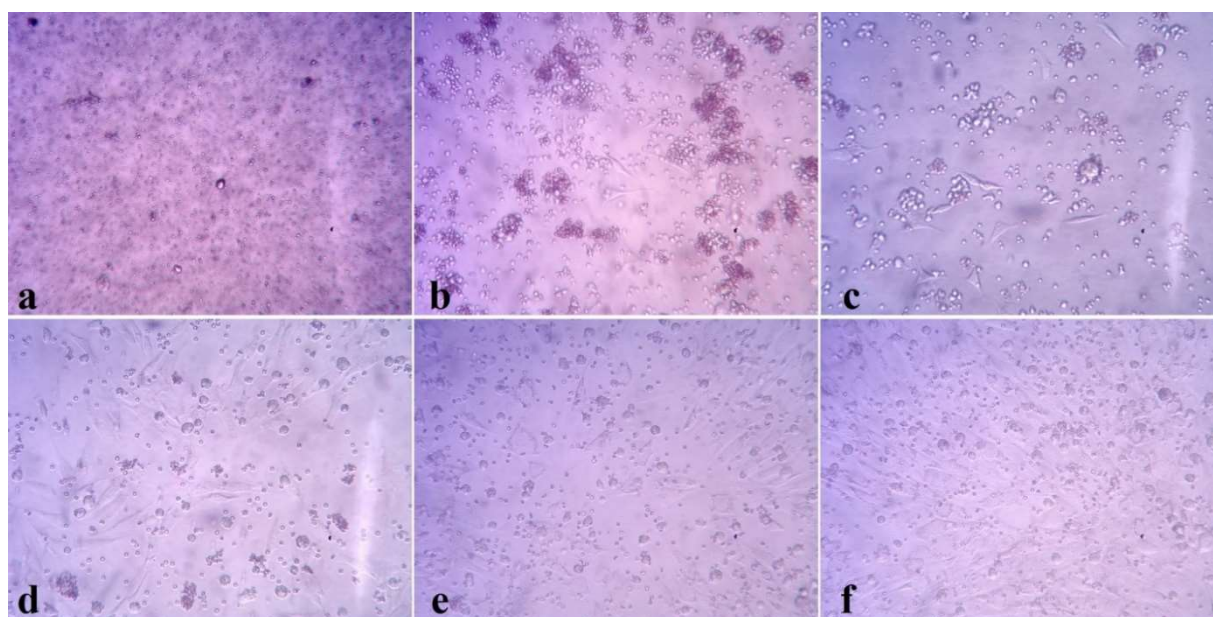


Figura 3.3. Izolarea și cultivarea CSM din măduva osoasă (MT-2, Olympus) cu DMEM/F-12 Ham și 10%SFB. Concentrat de celule nucleate de măduvă osoasă (a) (x40); la 2-3 zile prezente celule fusiforme, unice atașate de suprafața de cultură (b) (x40); la 4-5 zile a fost determinată creșterea numărului de celule (c) (x60); la 6-8 zile s-au format coloniile celulare (d) (x60); (e) la 9-11 zile apare tendința spre confluere a celulelor (d) (x40); la 10-14 zile confluență celulară de 80-90% a celulelor cu un grad de contaminare celulară minimal (f) (x40).

În timpul tripsinizării flaconul a fost introdus în incubator (Smart Cell, Heal Force) pentru 2-5 minute. După aplicarea flaconului a 2-3 lovituri flaconului, la microscop au fost vizualizate celulele detașate. Soluția de tripsină a fost inactivată cu 3-4 ml de mediu de izolare și cultură pentru CSM. Suspensia celulară a fost transferată într-o eprubetă de 15 ml și centrifugată la 170 x g timp de 10 minute [151].



Figura 3.4. Numărarea celulelor prin excludere cu soluție de 0.4% albastru de tripan.

După înlăturarea supernatantului, celulele au fost resuspendate în mediul de cultură celulară. Numărarea celulelor a fost efectuată în hemocitometru (figura 3.4) cu excluderea celulelor moarte prin colorare cu soluție de 0.4% albastru de tripan (Sigma, Marea Britanie) (8, 9, 10) și determinarea ratei celulelor vii (11).

$$N_{c/ml} = M_{cn_p} \times F_d \times 10^4 \quad (8);$$

$$N_{tcc} = N_{c/ml} \times V \quad (9);$$

$$N_{cv} = M_{cvn_p} \times F_d \times 10^4 \times V \quad (10);$$

$$V_{cc}\% = (N_{cv} \times 100\%) / N_{tcc} \quad (11);$$

N_{tcc} – Numărul total de celule cultivate; $N_{c/ml}$ – Numărul de celule într-un ml suspensie; M_{cn_p} – Media celulelor în n patrate ale hemacitometrului; M_{cvn_p} – Media celulelor vii în n patrate ale hemacitometrului; $V_{cc}\%$ - Rata procentuală a viabilității celulelor detașate; N_{cv} – numărul de celule vii detașate; F_d – Frația de diluție [164].

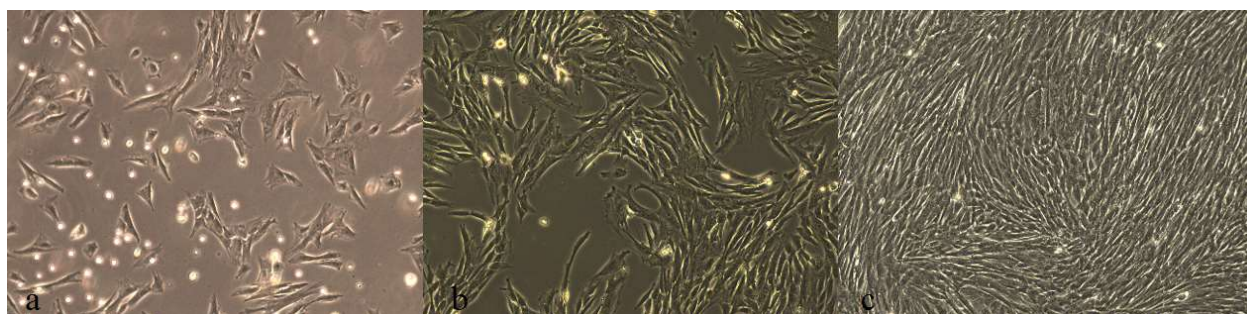


Figura 3.5. Cultura CSM în pasajul II x20 (DM IL, Leica). CSM atașate la suprafața de cultură cu urme de celule de măduvă osoasă după 24 ore (a); CSM la a 3-a zi de cultivare (b) și confluența de 90% a CSM la ziua a 5-a (c).

Pentru cultivarea celulelor în al II-lea pasaj, acestea au fost introduse în flacoane de cultură celulară de 75 cm² (Nunc, Suedia) la o densitate de $1 \times 10^4 \pm 1 \times 10^3$ celule/cm², cu schimbarea completă a mediului de cultură fiecare 2 zile până la o confluență de 80-90% (figura 3.5). Celulele din pasajul II au fost congelate la -84°C a câte 5×10^5 celule/ml cu mediu pentru conservarea celulelor și au fost utilizate ulterior pentru testele *in vitro*. De asemenea, celulele din pasajul II au fost utilizate cu scop de identificare a CSM prin diferențiere condrocitară.

3.2.2 Identificarea CSM

Potențialul de diferențiere a CSM este considerat un criteriu fiabil pentru identificarea lor și distingerea acestora de preadipocite, preosteocite sau precondrocite [141, 142, 151, 155, 158, 164]. În calitate de mediu pentru diferențiere celulară a fost utilizat mediul HiChondroXL (HiMedia, India). Diferențierea condrocitară a celulelor stem mezenchimale a fost efectuată conform protocolului de lucru descris în una din cercetările efectuate [151]. Într-o eprubetă sterilă de 15 ml au fost introduse 1×10^6 celule/ml de mediu de cultură celulară. Eprubeta a fost centrifugată la 45 x g timp de 10 minute. După înlăturarea supernatantului, în eprubetă a fost adăugat 1 ml mediu de diferențiere condrocitară HiChondroXL (HiMedia, India). Celulele au fost resuspendate prin pipetare, iar eprubeta s-a introdus într-un stativ și incubată cu capacul întredeschis la 37°C, 5% CO₂, mediul umed (Smart Cell, Heal Force). Mediul de diferențiere condrocitară a fost schimbat fiecare 48 de ore, preventiv centrifugând eprubeta, timp de 20 zile [151]. În zilele 5-7 de diferențiere, la fundul eprubetei a fost observată formarea de agregate de formă sferică sau ovală (figura 3.6). După 20 zile de diferențiere condrocitară sferile formate au fost introduse în formaldehidă buferizată de 10% și examinate după colorarea secțiunilor cu Hematoxilină-Eozină și colorări specifice pentru glicozaminoglicanii prezenți în cartilaj – Safranin O și Albastru de Toluidină cu Fast Green [164, 165, 166, 167].

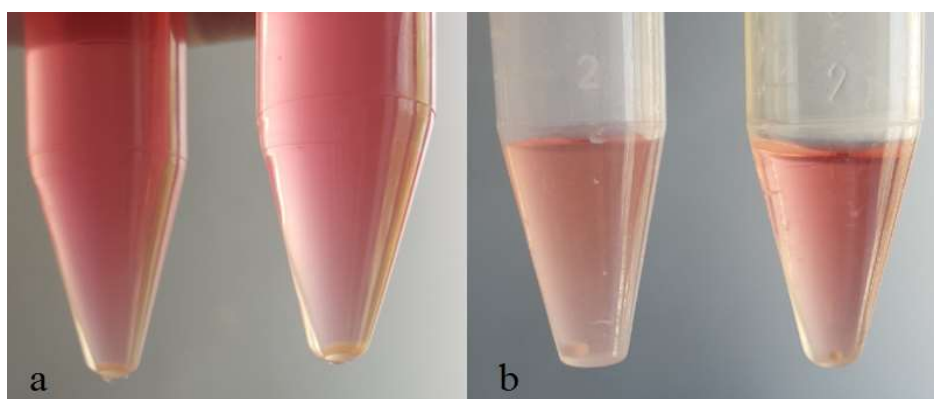


Figura 3.6. Diferențierea celulară pe linie condrocitară în eprubete de 15 ml din polipropilen. Aspect a 1×10^6 CSM la începutul diferențierii pe linie condrocitară (a) și formarea agregatelor condrocitare (b).

3.3 Rezultate

Durata procesului de prelevare a măduvei osoase de la începutul anesteziei a durat în mediu 36 ± 3 minute, fără înregistrarea cărorva complicații. În mediu au fost prelevate 3.39 ± 1.27 ml de măduvă osoasă. Durata medie de cultivare a celulelor în primul pasaj până la confluența de 70-80% a fost de 7 ± 1 zile. A fost determinată o corelație puternică între volumul de măduvă osoasă prelevată și numărul de zile necesare pentru a obține confluența celulară necesară ($p < 0.001$). Cu cât volumul de MO era mai mare cu atât confluența era mai rapidă și invers. Cu toate acestea, nu a fost determinată nici o corelație dintre numărul de celule obținute în primul pasaj și volumul de MO prelevat ($p > 0.5$), aceasta poate fi explicat prin faptul că durata de cultivare a celulelor pentru a obține confluența celulară necesară era diferită. Cantitatea de CSM a variat de la caz la caz, drept urmare nivelul de confluență stabilit vizual nu a putut fi considerat metodă de apreciere obiectivă. Deci, în urma cultivării celulelor în primul pasaj au fost obținute circa $7.47 \times 10^5 \pm 6.9 \times 10^4$ CSM per flacon, iar după 5 zile de cultivare în pasajul II în flacoane de 75 cm^2 , până la o confluență celulară de 80-90% au fost obținute $4.12 \times 10^6 \pm 4.64 \times 10^5$ celule per flacon. Ținând cont de faptul că în pasajul II durata de cultivare a CSM în toate cazurile era aceeași, a fost determinat că numărul de celule obținute în pasajul II depinde în mod direct de numărul celulelor viabile obținute în pasajul I ($p < 0.001$). Ca urmare, durata medie de cultivare a celulelor pe parcursul primelor 2 pasaje a fost de 12 ± 1 zile, viabilitatea celulară fiind de 100% în toate cazurile.

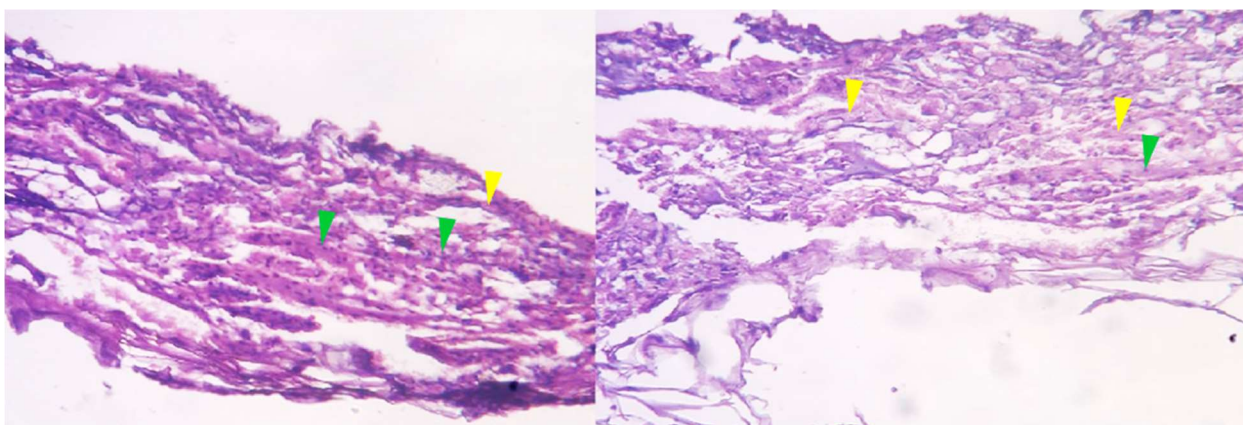


Figura 3.7. Colorarea cu Hematoxină-Eozină a agregatelor condrocitare x60 (MT-2, Olympus). S-a determinat prezența unei densități mari de nuclee (verde), dar și formarea de MEC (galben).

În procesul de diferențiere condrocitară, a fost determinată formarea de agregate celulare care erau de formă sferică neregulată fixate de fundul eprubetei, care ulterior s-au desprins și pluteau liber prin mediu [151]. De asemenea, în primele zile de diferențiere, celulele puteau fi ușor dispersate prin pipetare, iar după ce au format agregate cu aspect de ou, acest lucru nu mai

era posibil [151]. Chiar dacă agregatele celulare erau constituite din același număr de celule acestea puteau fi de dimensiuni diferite, aproximativ 1.5-3 mm în diametru (figura 3.6).

La examenul histologic cu Hematoxină-Eozină a fost determinată o celularizare bogată a agregatelor obținute, evidențiată printr-o densitate mare de nuclee, dar și formarea de matrice extracelulară (figura 3.7). La colorarea cu Albastru de Toluidină și Fast Green, piesa histologică a fost colorată intens în culoare violetă și albastră, ceea ce este specific pentru GAG ce sunt prezenți în țesutul cartilaginios (figura 3.8).

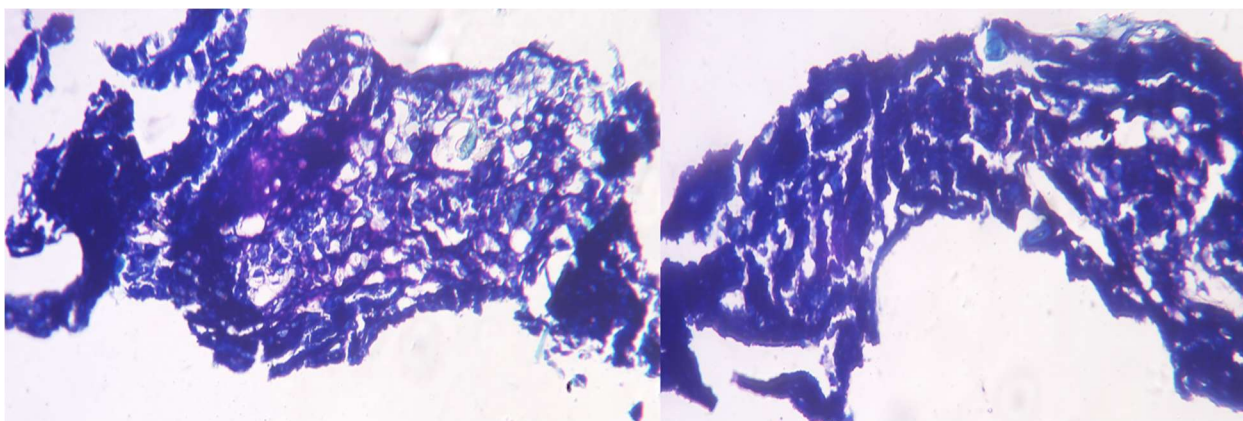


Figura 3.8. Colorarea cu Albastru de Toluidină și Fast Green a agregatelor formate x40 (MT-2, Olympus). Prezența unei colorări în albastru-violet închis demonstrează prezența în MEC a unui conținut înalt de GAG.

La colorarea cu Safranin O a fost determinat un număr mare de nuclee, ce au avut o colorare întunecată, iar matricea extracelulară sintetizată de către celule bogată în GAG, a fost colorată în roșu, lucru specific pentru țesutul cartilaginios (figura 3.9).

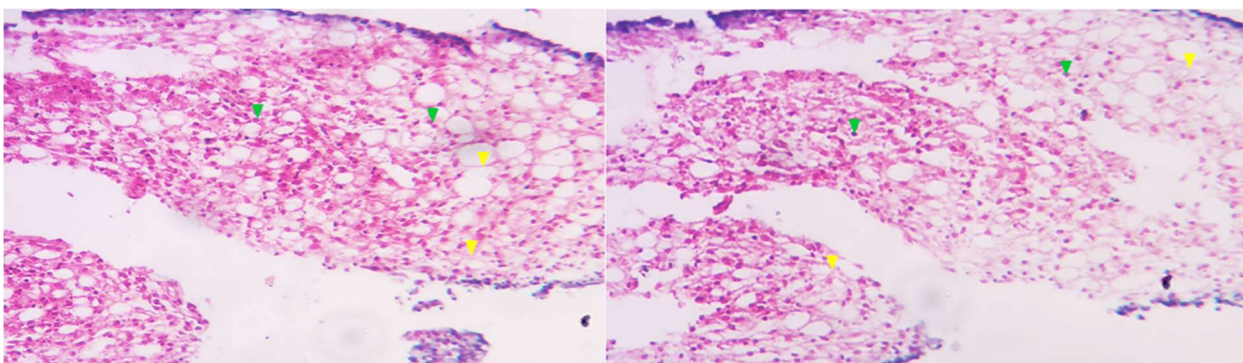


Figura 3.9. Colorarea cu Safranin O a agregatelor formate x60 (MT-2, Olympus). A fost determinată colorarea MEC în roșu (galben) datorită prezenței de GAG, și o densitate mare de nuclee (verde).

3.4 Discuții

Tehnica utilizată de prelevare a MO este o modificare a tehnicii prin care osul iliac de iepure în condiții similare este străpuns perpendicular cu un ac de biopsie de 18 G [142] descrise în literatură. Punctarea osului iliac în plan paralel cu osul iliac și nu perpendicular, a permis un control mai bun al acului de seringă utilizat, deoarece acesta a fost introdus printr-un os mai moale, drept urmare a fost evitată așa complicație ca perforarea concomitentă a ambelor corticale cu lezarea organelor interne. De asemenea, tehnica utilizată a permis fixarea sigură a acului în osul iliac, ce a permis colectarea în mod cert a MO [151]. Astfel, colectarea de MO prin această tehnică permite în final efectuarea testelor preclinice *in vivo* cu CSM proprii fără a supune animalul la mari suferințe și risc pentru viață, ceea ce ar putea influența negativ rezultatele experimentelor [160]. Metodele de obținere a MO sau a CCMOA pentru izolarea CSM ce au fost descrise în literatură, implică sacrificarea iepurilor [146, 151, 155, 156]. Acest fapt a făcut imposibilă testarea *in vivo* a capacității de regenerare a țesuturilor prin utilizarea grefelor combinate cu celule autologe, dar și efectuarea sub anestezie generală a unor proceduri invazive foarte traumatizante pentru iepuri ce aveau ca scop recoltarea de MO din metafizele sau canalele medulare a oaselor tubulare lungi, ca femurul și tibia [151, 157, 158, 173]. Osul iliac este mai mic comparativ cu cel femural, la un iepure adult aceasta variază între 4.3 mm și 4.8 mm (figura 3.10). Iar datorită faptului că osul iliac la nivel de cristă iliacă este mai moale, aceasta ușor a fost perforat manual cu un ac de 18G [151]. Drept urmare, volumul de măduvă osoasă ce a fost colectat dintr-un os putea ajunge la 4.5-5 ml, fără a aduce daune sănătății animalului și de a-l expune la riscuri care ne puteau costa timp și bani [151, 160]. Totodată, chiar și cel mai mic volum de MO colectat a fost suficient pentru a obține într-o perioadă relativ scurtă, de 13 zile, aproximativ 4.55×10^6 de CSM, ceea ce a fost un rezultat foarte bun.



Figura 3.10. Dimensiunile comparative ale oaselor iliac și femural. Aspectul oaselor iliac și femural de iepure (a). Aprecierea grosimii osului iliac (b) și osului femural (c).

Din literatură era cunoscut că în MO numărul de CSM este foarte mic, între 0.001% și 0.01% din numărul total de celule nucleate [141, 151], sau între 1:100000 și 1:10000 de celule [174-176]. Conform datelor literaturii CSM puteau fi multiplicat de 500 de ori pe parcursul a 50

de generații obținând în final miliarde de celule [151, 174, 175]. Totuși, la cultivarea *in vitro* începând cu al 6-lea pasaj, CSM își pierde caracteristicile de celule stem și capacitatea de diferențiere [175, 176]. Altfel spus, dacă am fi continuat cultivarea celulelor obținute în pasaje, la o densitate de $8-10 \times 10^3$ celule/cm², la al 4-lea pasaj am avea câteva miliarde de celule cu potențial de diferențiere. Așadar, chiar și 1 ml de MO prelevată dintr-un singur os iliac de iepure prezintă un volum suficient pentru a obține un număr mare de CSM cu capacitate de diferențiere, ce ar putea fi utilizate pentru testele *in vitro* sau *in vivo* pe animale, fapt ce pe nedrept a fost ignorat în literatură [144, 145, 149, 155, 157, 158]. În cadrul activității de cercetare *in vitro*, CSM au fost utilizate cu succes în testarea diferitor matrici tridimensionale de origine biologică [168], în special, a grefelor OCDD [170, 246], a materialelor din biosticlă predestinate obținerii implantelor stomatologice [169] și diferitor tipuri de nanoparticule [190, 239], în special cu scop de ghidare în câmpul magnetic [171]. De asemenea, CSM au fost utilizate în terapia celulară a unor patologii ale țesuturilor moi și dure [163, 237, 238, 240].

Identificarea celulelor stem reprezintă o etapă importantă în lucrul cu acestea. La moment cele mai utilizate modalități de identificare a CSM sunt RT-PCR, diferențierea celulară pe cale adipogenică, osteogenică și condrogenică [141, 142, 151], flowcitometrie [141, 174], imunofluorescență [174, 176]. În cercetarea noastră am identificat CSM din măduva osoasă doar prin diferențiere pe cale condrogenică. Așadar, conform criteriilor Societății Internaționale de Terapie Celulară, CSM nu au fost complet identificate, însă după părerea noastră aceasta este suficient, deoarece CSM din măduva osoasă sunt celule multipotente cu potențial de diferențiere terminală în celulă specializată. Cu toate acestea, diferențierea pe linie condrocitară a fost confirmată prin colorarea specifică doar pentru cartilaj cu Safranin O și Albastru de Toluidină cu Fast Green [151, 165, 177].

Este necesar de menționat că CSM obținute după modalitatea elucidată au fost utilizate în calitate de martor la identificarea altor tipuri de celule izolate, ca condrocite [164], celule osoase [189], hepatocite [154] și fibroblaste [178].

În concluzie CSM sunt celule larg utilizate nu doar în cercetările de laborator, dar și în clinică. Pentru testele preclinice pe iepuri cu scop de izolare a CSM era suficientă o cantitate mică de MO și o durată scurtă de timp, lucru diferit de procesul de izolare a CSM din MO umană.

4. IZOLAREA ȘI CULTIVAREA CONDROCITELOR DIN CARTILAJUL ARTICULAR DE IEPURE

4.1 Introducere

Țesutul cartilaginios hialin este un țesut cu o capacitate foarte redusă de regenerare, [6, 130, 139, 151, 164, 179] drept consecință leziunile acestuia pot avea urmări grave asupra articulațiilor diartrodiale, în special a celor mari [41, 95, 134, 135, 137]. A fost constatat că numărul pacienților cu leziuni de cartilaj articular crește anual cu circa un milion de cazuri [41]. Până la moment pentru a repara, sau stimula procesul de reparare a defectelor cartilajului articular au fost utilizate metodele descrise anterior, toate rezultând cu generarea unui țesut de tip fibrocartilaginios cu proprietăți mecanice reduse și un potențial de uzură foarte ridicat comparativ cu cartilajul hialin normal [35, 95, 137, 164]. Cu toate acestea, tehnica de transplantare a condrocitelor autologe, ca tehnică de restaurare, la moment este considerată "Standard de Aur" în regenerarea reparatorie a cartilajului articular [182, 183]. Deoarece una din etapele acestei tehnici constă în obținerea culturilor condrocitare din cartilajul articular prelevat, aceasta implică utilizarea unei sau mai multor tipuri de enzime necesare pentru digestia enzimatică a cartilajului și eliberarea condrocitelor. A fost constatat că viteza de realizare a acestei etape depinde în mod direct de concentrația soluțiilor enzimaticice folosite și durata de expunere a cartilajului [139, 164, 184, 185, 186, 187], iar durata digestiei enzimaticice necesare pentru izolarea unui număr suficient de condrocite variază de la 3 până la 24 de ore. Cu acest scop cel mai des în literatură a fost descrisă utilizarea colagenazei [132, 164, 184, 186, 188], cu cât concentrația acesteia în soluție este mai mare cu atât durata de expunere este mai scurtă. La o perioadă de expunere de 24 ore s-au recomandat concentrațiile de 0.15% și 0.3%, iar pentru 4 ore de 1.2% [164, 184, 250]. De asemenea, pentru digestia enzimatică a cartilajului a fost descrisă utilizarea soluției de tripsină-EDTA 0.25% la 37°C timp de 3 ore [164, 187, 188], sau utilizarea etapizată a mai multor enzime cu perioadă scurtă de predigestie de 30 min în tripsină-EDTA 0.25%, urmată de utilizarea colagenazei tip A 0.21 U/mg de cartilaj timp de 12 ore [132, 164, 250] sau predigestia în soluție enzimatică cu conținut de Dispază 0.8 U/mg de cartilaj cu hialuronidază 0.1% sau pronază 0.4% timp de 60 minute, urmat de digestia în colagenază tip II de 0.1%, 0.15% și 0.2% timp de 6 sau 10 ore [164, as 186]. Izolarea inițială a unui număr mare de condrocite a permis reducerea duratei de cultură celulară, dar și a numărului de pasaje celulare necesare pentru obținerea numărului suficient de celule pentru transplantare. Totodată, condrocitele prezintă o opțiune preferabilă în tratamentul defectelor de cartilaj, deoarece profilul lor molecular este similar cu cel al celulelor gazdă din cartilajul sănătos din jurul defectului [164, 166, 167].

Procesul de monitorizare continuă pe parcursul izolării condrocitelor din cartilajul articular hialin a permis reducerea timpului de izolare a condrocitelor, dar și de obținere unui număr mai mare de celule pentru cultură. Acest fapt este foarte important, din motivul dediferențierii fibroblastice a condrocitelor [164, 251], complicație ce apare pe parcursul cultivării condrocitelor în numeroase pasaje, cu scop de a obține numărul necesar de condrocite pentru transplantare. Ca urmare, a fost constatat că cu cât numărul de condrocite izolate este mai mare cu atât numărul de pasaje și gradul de dediferențiere fibroblastică a condrocitelor este mai mic.

4.2 Metode

4.2.1 Izolarea și cultivarea condrocitelor

Sub anestezie generală după înlăturarea blăunii, aseptizarea și delimitarea câmpului operator la nivelul articulației genunchiului, prin abord parapatelar medial de aproximativ 1-1.5 cm lungime, a fost deschisă articulația genunchiului [164, 166, 167, 250]. După hemostază, articulația a fost spălată cu soluție de NaCl 0.9%, după care de pe suprafața neportantă a condilului femural, de la nivelul șanțului trohlear, au fost prelevate bucăți de cartilaj articular. Cartilajul prelevat a fost introdus într-o eprubetă de 15 ml cu mediu de cultură pentru condrocite, preîncălzit la 37°C. După suturarea plăgii pe straturi, animalul a fost reîntors în vivariu, iar cartilajul prelevat dus în laborator pentru procesare [164, 251]. În condiții sterile, sub hota cu flux laminar (LN 090, Nuve), cartilajul prelevat a fost spălat cu PBS cald (HiMedia, India) de 3 ori. Apoi, mărunțit cu un bisturiu până la fragmente de 1-2 mm³ și introdus într-o eprubetă sterilă de 15 ml cu 5 ml de 0.25% tripsină-EDTA pentru predigestie [132, 164]. Bucățile de cartilaj au fost agitate timp de 10 minute pe un agitator orbital (ES-20, Biosan) la 150 rpm, 37°C. Apoi eprubeta a fost centrifugată timp de 3 minute la 50 x g. După înlăturarea supernatantului, bucățile de cartilaj a fost spălate cu PBS cald și centrifugate repetat (figura 4.1). Bucățile de cartilaj au fost resuspendate în câte 2 ml de soluție colagenază 0.6% după care au fost formate 2 grupuri, fiecare câte 9 cazuri. În grupul I bucățile de cartilaj cu soluția de colagenază au fost introduse în eprubete de 15 ml, iar în grupul II în flacoane pentru cultură celulară de 25 cm² (Nunc, Suedia). Aceste flacoane au fost selectate cu scop de a putea monitoriza prin microscopie dinamica procesului de eliberare a condrocitelor din țesut sub acțiunea enzimelor (figura 4.2). Vasele din ambele grupe au fost introduse în incubator (Heal Force, Start Cell) la 37°C cu 5%CO₂ și amplasate pe agitator tip rocker (MR-1, Biosan). Eprubeta a fost pusă pe un agitator prin rotație în poziție orizontală, iar flaconul a fost plasat pe una din fețele sale laterale [164, 251]. Vasele din ambele grupe au fost agitate la 20-25 oscilații/minut. Durata de digestie enzimatică în grupul I a fost fixă, de 360 minute, iar în grupul II a variat în dependență de cantitatea de celule prezente în câmpul de vedere. Astfel, după 120 minute de digestie enzimatică a cartilajului, procesul a fost monitorizat sub microscop fiecare 10-20 de minute, cu întreruperea procesului când

condrocitele eliberate din țesut au ocupat aproximativ 50-60% din câmpul de vedere, chiar dacă cartilajul nu era complet digerat. Digestia enzimatică a cartilajului cu soluție collagenază de 0.6% a fost întreruptă în ambele grupe prin diluarea cu 10 ml de PBS (HiMedia, India). În grupul II pentru separarea celulelor libere de cartilajul nedigerat, suspensia celulară a fost filtrată prin filtre de nailon cu porii de 70 μm (Sigma, Marea Britanie) în eprubete de 50 ml.



Figura 4.1. Prelevarea cartilajului articular și tripsinizarea lui: (a) pregătirea preoperatorie a animalului; (b) deschiderea articulației genunchiului; (c) prelevarea de cartilaj de pe suprafața neportantă a condililor femurali; (d) cartilajul după mărunțire și spălare; (e) tratarea cu tripsină-EDTA 0.25%; (f) cartilajul articular după tripsinizare.

Eprubetele cu condrocite izolate din ambele grupe au fost centrifugate la 170 x g timp de 10 minute. Supernatantul a fost înlăturat prin aspirație, iar condrocitele au fost spălate cu 10 ml mediu de nutriție și centrifugate repetat. Apoi, condrocitele din ambele grupe au fost resuspendate în 5 ml mediu de nutriție și numărate în Hemocitometru prin excluderea celulelor moarte cu soluție de 0.4% albastru de tripan după modalitatea descrisă în studiul anterior (8, 9, 10) [164]. Condrocitele obținute în ambele grupe au fost introduse în câte un flacon de cultură celulară de 25 cm^2 (Nunc, Suedia), densitatea de populare a suprafețelor de cultură cu celule a variat de la 2×10^3 celule vii/ cm^2 până la 8×10^3 celule vii/ cm^2 . Astfel, condrocitele din grupul I au fost cultivate câte $3 \times 10^3 \pm 8.3 \times 10^2$ celule vii/ cm^2 , iar condrocitele din grupul II erau cultivate câte $6.3 \times 10^3 \pm 1.4 \times 10^3$ celule vii/ cm^2 ceea ce era aproximativ de 2 ori mai mult comparativ cu grupul I. Toate celulele izolate au fost cultivate în aceleași condiții, incubate în mediu umed la 37°C , 5% CO_2 (Smart Cell, Heal Force) cu schimbarea a câte jumătate din mediu fiecare 2-3 zile. La confluența condrocitelor de 70-80%, acestea au fost detașate de suprafața de cultură celulară cu tripsină-EDTA 0.25%, numărate și utilizate după necesitate. O parte din celule au fost cultivate în pasajul 2 în flacoane de 75 cm^2 (Nunc, Suedia) la o densitate de $1.4 \times 10^4 \pm 5.4 \times 10^3$ celule/ cm^2 , ce apoi au fost conservate în SFB cu 10% DMSO și păstrate la -84°C pentru teste *in vitro* [164],

iar o parte din condrocitele cultivate în primul pasaj au fost combinate cu grefe OCDD și transplantate într-un defect osteocondral experimental [166, 167]. Culturile celulare ce nu au ajuns la confluență după o perioadă îndelungată de cultivare și prezentau colonii celulare hipertrofiate au fost decantate, deoarece aceste celule nu se mai multiplicau în pasajul II.

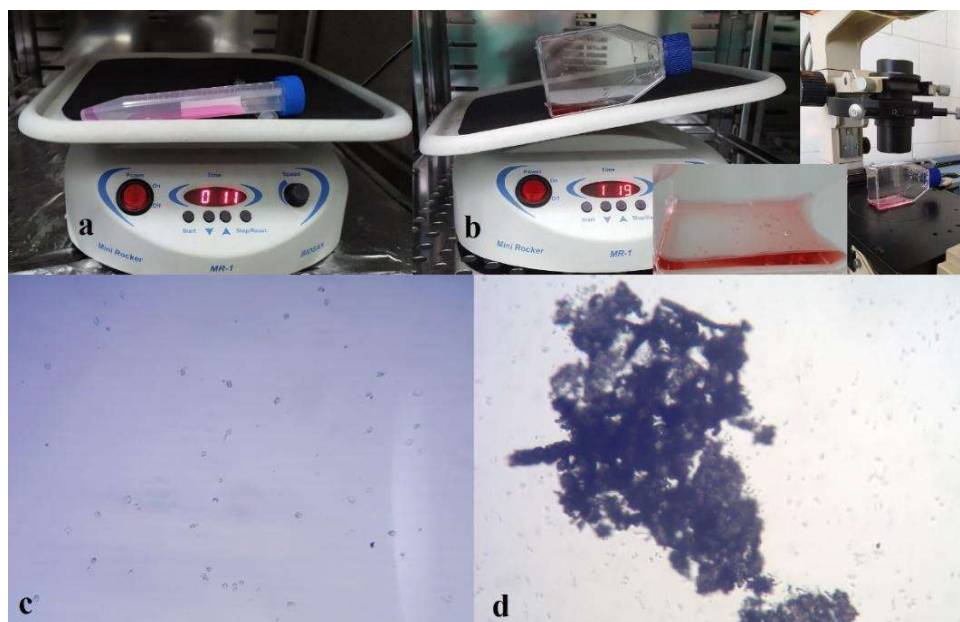


Figura 4.2. Digestia enzimatică cu collagenază 0.6% pe agitator tip rocker în incubator: (a) în eprubetă timp de 360 minute și (c) condrocitele izolate; (b) digestia enzimatică în flacon de cultură celulară întors pe partea laterală cu posibilitatea monitorizării sub microscop a procesului de eliberare a condrocitelor din cartilaj și (d) digestia enzimatică a cartilajului cu eliberarea condrocitelor [170].

4.2.2 Identificarea condrocitelor

Celule din ambele grupe, cultivate în primul pasaj, au fost introduse câte 1×10^4 celule în câte 2 godee a unei plăci de 24 godee, care au fost cultivate în supraconfluență pe parcursul a 16 zile cu schimbarea completă a mediului de cultură odată la 2 zile [167, 189]. După cultivare în supraconfluență, celulele au fost identificate prin colorarea histochimică specifică pentru GAG a matricei extracelulare specifice țesutului cartilaginios cu Safranin O și Albastru de Toluidină cu Fast green [164, 166, 251]. În calitate de lot martor au fost utilizate CSM din MO de iepure, extragerea cărora a fost prezentată în studiul anterior [151, 164, 189]. CSM după decongelare au fost cultivate până la o confluență de 60-70% și introduse, de asemenea, a câte 1×10^4 celule per godeu în două godee.

Colorarea celulelor în monostrat cu Safranin O a fost efectuată în 2 godee, câte unul din fiecare grupă și un godeu cu CSM. După îndepărtarea mediului de nutriție din godeele în care au fost cultivate celulele și spălarea cu PBS (HiMedia, India), s-a turnat câte 1 ml soluție

glutaraldehydă de 0.1% pentru 20 min la temperatura camerei. După 3 spălări cu PBS, în godee s-a turnat câte 1 ml de 0.001% Fast Green pentru 5 minute și apoi acid acetic de 1% pentru 10 secunde. Godeele au fost spălate repetat cu PBS și în ele s-au turnat câte 1 ml soluție 0.1% Safranin O pentru 15 minute. Apoi godeele au fost spălate de 5 ori cu PBS și examinate microscopic. În godee cu aceleași tipuri de celule a fost realizată colorarea cu Albastru de Toluidină și Fast Green. După îndepărtarea mediului de cultură celulară și spălarea cu PBS, în godee s-au adăugat câte 1 ml de soluție Albastru de Toluidină 0.4% pentru 10 minute. Godeele au fost spălate de 3 ori câte 30 secunde cu apă distilată, urmat de turnarea în godee a câte 1 ml de Fast Green 0.02%. După spălare de 2 ori cu apă distilată a fost efectuată examinarea microscopică [164, 165].

4.3 Rezultate

Ca urmare a implementării noii metode de izolare a condrocitelor, numărul acestora a crescut semnificativ. Durata de expunere la collagenază în grupul I - control, a fost fix 360 minute, atunci când durata de expunere în grupul II - experimental, a variat, fiind în mediu 140 ± 10 minute.

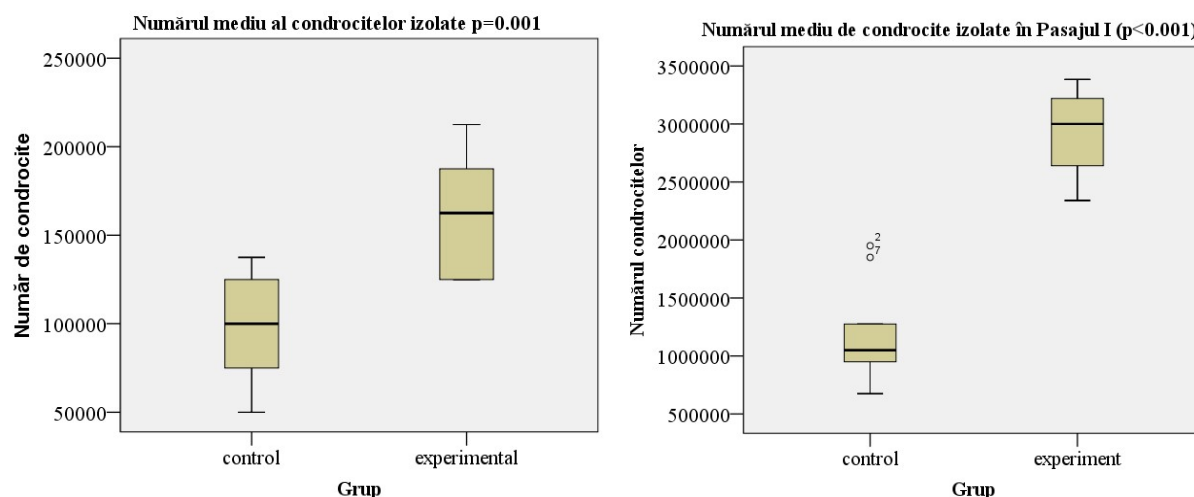


Figura 4.3. **Reprezentarea comparativă a numărului de condrocite izolate (stânga) și numărul total de condrocite obținut în primul pasaj (dreapta).**

Ca urmare, în grupul control în mediu au fost izolate $9.2 \times 10^4 \pm 3.1 \times 10^4$ condrocite [164], atunci când în grupul experimental, prin monitorizarea continuă, au fost izolate aproape de 2 ori mai multe – $1.6 \times 10^5 \pm 3.4 \times 10^4$ celule ($p = 0.001$) (figura 4.3). De asemenea, durata îndelungată de expunere la collagenază a influențat negativ numărul celulelor izolate în grupul control comparativ cu cel experimental ($p < 0.001$). Pe când la compararea valorilor procentuale, după numărarea celulelor în hemocitometru prin excludere cu 0.4% trypan albastru, în grupul de control a fost obținută o rată de viabilitate celulară de 85.36% (95% IÎ:72.73-97.97), iar în grupul experimental de 98.09% (95% IÎ:93.10-101.49). O diferență necritică ($p = 0.055$), însă care în caz

de izolare a unui număr mic de celule, din motiv că celelalte au fost digerate de colagenază, orice reducere a viabilității poate avea efecte negative asupra potențialului de cultivare a acestora [151, 164]. Având în vedere că numărul de celule viabile, din grupul control, ce au fost puse la cultivare în primul pasaj au fost de $7.5 \times 10^4 \pm 2.1 \times 10^4$, iar în grupul experimental de $1.6 \times 10^5 \pm 3.5 \times 10^4$ celule ($p=0.001$), durata de cultivare a condrocitelor ce include aderarea la suprafața de cultură celulară, multiplicarea, formarea de colonii cu tendință spre confluență, dar și confluența până la 70-80%, în ambele grupe a fost diferită. În grupul control durata de cultivare a primului pasaj a fost de 17 ± 2 zile, iar în grupul experimental de 11 ± 3 zile ($p = 0.001$) (figura 4.4). Ca urmare, numărul de celule obținute în primul pasaj în grupul control a fost de $1.2 \times 10^6 \pm 4.3 \times 10^5$ celule, iar în grupul experimental de $2.92 \times 10^6 \pm 3.6 \times 10^5$ celule, cu viabilitatea de 100% în ambele grupe, ceea ce reprezintă o diferență semnificativă ($p < 0.001$).

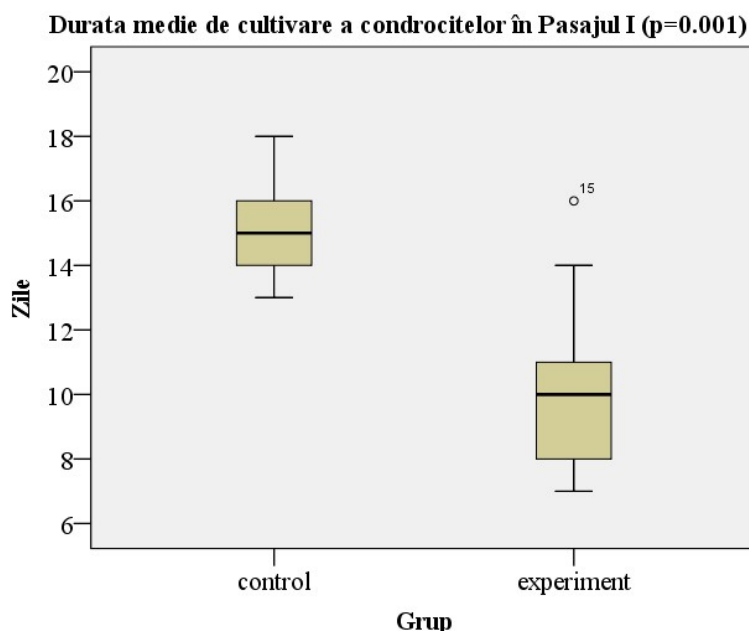


Figura 4.4. Confluența condrocitelor pe parcursul primului pasaj.

Utilizarea tehnicilor histochemice de colorare a matricii extracelulare secretate de condrocite pe parcursul a 16 zile de cultivare în supraconfluență, ne-a permis colorarea în roșu-oranj a acesteia cu Safranin O, pe când în lotul martor colorarea lipsea sau era foarte slab exprimată. Același lucru este caracteristic și pentru colorarea cu Albastru de Toluidină și Fast Green, unde matricea extracelulară s-a colorat în albastru-violet. Astfel, a fost demonstrat că celulele izolate din cartilajul articular hialin, ce secretă matrice extracelulară specifică cartilajului sunt condrocite (figura 4.5).

4.4 Discuții

Izolarea și cultivarea condrocitelor este o etapă primordială în procesul de transplantare a condrocitelor autologe necesare în repararea cartilajului articular [6, 41, 42, 128, 130, 132, 133,

134, 164, 182]. De asemenea, condrocitele pot fi utilizate și *in vitro* cu scopul testării diferitor substanțe [169, 171, 190], implante, grefe predestinate tratamentului defectelor de cartilaj sau altor leziuni intraarticulare [164, 170, 185, 246].

Etapa de laborator, în procesul de transplantare a condrocitelor autologe, a asigurat numărul necesar de celule pentru transplantare, însă această etapă fiind și cea mai vulnerabilă. Pe lângă riscul înalt de contaminare și infectare a condrocitelor izolate, a fost determinat că efect negativ are și cultivarea condrocitelor în numeroase pasaje cu scop de a obține cantitatea suficientă de celule pentru transplantare. Factorul negativ în procesul de cultivare a condrocitelor este degradarea fibroblastică a condrocitelor sau așa numita dediferențiere condrocitară [164, 179, 187].

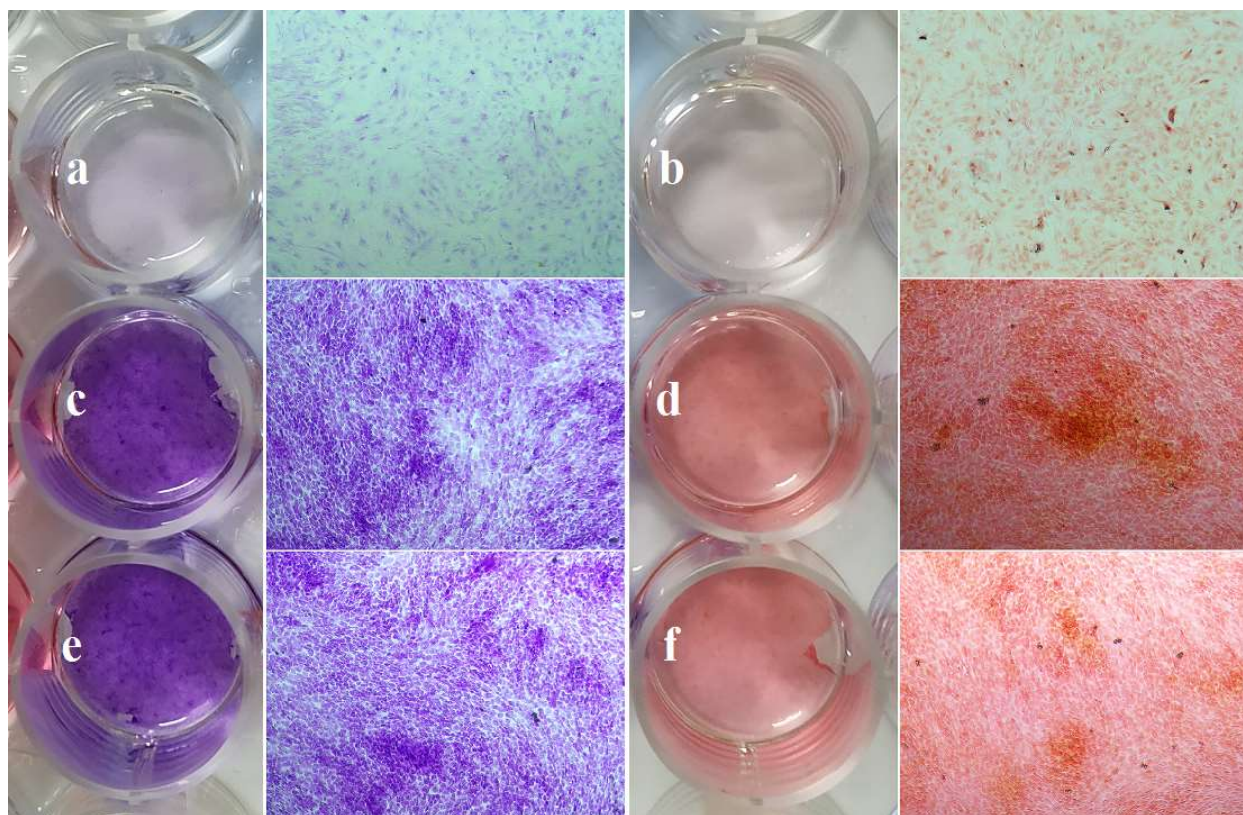


Figura 4.5. Colorarea specifică pentru cartilaj cu Safranin O și Albastru de Toluidină cu Fast green (Optika, IM-3F) (x100): CSM din măduvă osoasă – martor (a, b); condrocite din grupul control (c, d), condrocite din grupul experimental (e, f).

Dediferențierea condrocitară a fost definită ca schimbarea formei condrocitului din rotundă în fusiformă similară fibroblastelor, diminuarea expresiei genelor GAG, COL2A1 și ACAN, intensificând expresia genelor COL1A1, astfel reducând sinteza de GAG, collagen tip II și agrecan, dar stimulând-o pe cea a collagenului de tip I [179, 187, 191, 192]. Aceste modificări au apărut începând cu al doilea pasaj [164, 187] și s-au intensificat pe parcursul cultivării, devenind evidente după 5 pasaje consecutive [19]. Astfel, dediferențierea fibroblastică a condrocitelor a

reduc calitatea matricii extracelulare sintetizate după transplantare, aceasta devenind de tip fibrocartilagos [166, 167, 179, 191, 192]. Ca urmare, reducerea duratei de cultivare în pasaje a fost esențială, deoarece reduce nu doar riscul de infectare a culturilor condrocitare, dar și gradul de degradare fibroblastică a acestora [164, 193]. Pentru a obține un număr suficient de condrocite normale pentru transplantare, în literatură au fost descrise metode de rediferențiere a condrocitelor. Din astfel de metode fac parte cultura condrocitelor pe suprafețe neaderente [185], cultura condrocitelor direct pe matricile tridimensionale cu ulterioara lor transplantare [191], cultivarea în condiții de presiune scăzută a oxigenului [194], stimularea mecanică [195], dar și utilizarea factorilor de diferențiere condrocitară [196], metodă utilizată în cadrul studiului [164].

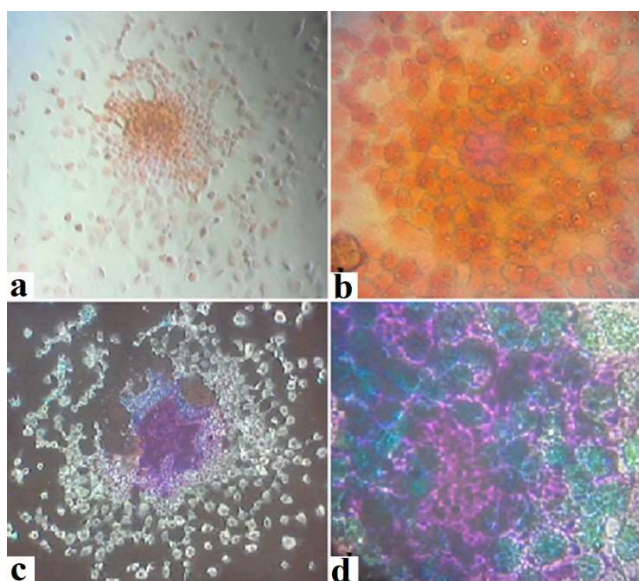


Figura 4.6. Colonii izolate de condrocite supraconfluente, formate ca urmare a unui număr mic de condrocite în cultură, colorate cu Safranin O (a) (x60), (b) (x150) și Albastru de Toluidină cu Fast green (c) (x60), (d) (x150) (MT-2, Olympus) [164].

Monitorizarea continuă a procesului de eliberare a condrocitelor prin digestie enzimatică din cartilaj articular a fost orientată spre obținerea unui număr mare de condrocite pentru a fi apoi cultivate într-un număr redus de pasaje până la obținerea cantității necesare de celule, dar și reducând gradul de degenerare fibroblastică a condrocitelor. La obținerea unui număr mic de condrocite viabile și cultivarea lor la o cifră mai mică de $3-3.5 \times 10^3$ celule/cm² [164, 184, 193], a fost observată formarea de colonii condrocitare izolate, neconfluente, ca în 7 cazuri din grupul I (figura 4.6), iar în 2 din aceste cazuri, unde densitatea de populare celulară de 2×10^3 celule/cm², la transferul în pasajul II a avut loc stagnarea multiplicării celulare [164]. Odată ce numărul de celule este suficient ca coloniile celulare să se formeze uniform pe o suprafață de cultură celulară, numărul de celule obținute per pasaj va fi mai mare, iar creșterea izolată a coloniilor

celulare dictată de un număr mic de celule izolate, va ocupa o suprafață de cultură celulară mai restrânsă, ca urmare numărul de celule obținute per pasaj va fi mai mic [164, 166, 167].

Pe lângă obținerea condrocitelor prin digestie enzimatică a cartilajului articular, o altă modalitate, de asemenea, eficientă de izolare celulară este cea prin explant [130, 154, 189]. Având în vedere că în urma izolării condrocitelor prin monitorizare continuă în permanență rămâneau bucăți de cartilaj nedigerat, a fost posibilă combinarea a 2 metode de izolare a condrocitelor [164]. În prima etapă a avut loc obținerea unui număr mare de condrocite prin digestie enzimatică, iar în a doua etapă, cartilajul nedigerat a fost utilizat în calitate de explant pentru izolarea condrocitelor prin cicluri de reglare volumetrică [178] în microplăci pentru culturi celulare (figura 4.7). De asemenea, cartilajul nedigerat a putut fi supus repetat digestiei enzimatică cu o doză proaspătă de soluție de collagenază [164].

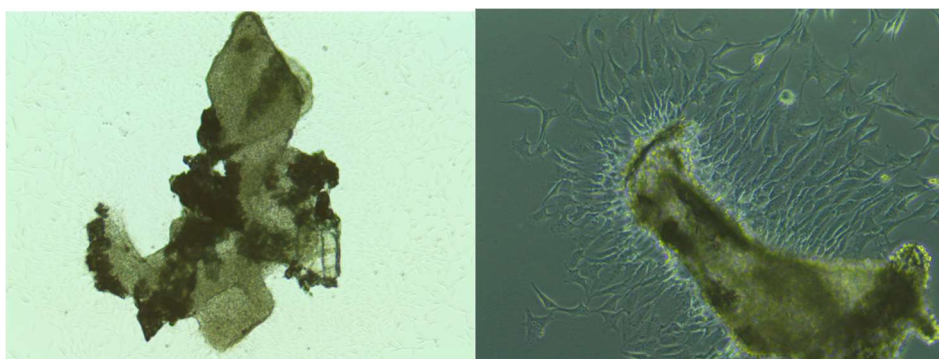


Figura 4.7. Colonii de condrocite formate prin explant, din bucăți de cartilaj nedigerat x40 și x100 (IM-3F, Optika). Izolarea condrocitelor prin cicluri de reglare volumetrică [164].

Identificarea celulelor izolate este o componentă indispensabilă a procesului de cultivare celulară, atât a condrocitelor, cât și a altor tipuri de celule [151, 164, 178]. Utilizarea metodelor histochemice de colorare cu Safranin O și Albastru de Toluidină cu Fast green, predestinate analizei histologice a cartilajului au fost suficiente pentru identificarea prezenței GAG și PG specifici țesutului cartilagos articular la cultivarea condrocitelor în supraconfluență [166, 167].

În concluzie, condrocitele sunt celule larg utilizate cu scop de testare preclinică și clinică a regenerării țesutului cartilagos hialin, dar și în tratamentul defectelor de cartilaj articular. Obținerea unui număr suficient de condrocite pentru transplantare într-un număr redus de pasaje, ar putea să fie cheia succesului în procesul de regenerare a țesutului cartilagos.

5. OBȚINEREA GREFEI BIFAZICE DIN ȚESUT OSTEOCONDRALE PRIN TEHNICI DE INGINERIE TISULARĂ.

5.1 Introducere

Matricele tridimensionale utilizate la ziua de azi în calitate de suport celular pentru regenerarea de cartilaj articular în mare parte tind să mimeze componența matricii extracelulare a acestuia [94, 166, 167, 170, 172, 197, 198, 200]. Aceste structuri tridimensionale ar trebui să corespundă anumitor cerințe specifice, de ordin arhitectural, să dețină o biocompatibilitate excelentă, proprietăți fizico-chimice corespunzătoare acțiunii mecanice, dar și activității biologice inerente, cu scop de a asigura un micromediu necesar regenerării cartilajului articular, cât și a osului subcondral [94, 166, 167, 172, 203]. Astfel, utilizarea unui suport tridimensional ce reprezintă o structură bifazică, ierarhică așa cum este țesutul osteocondral [167, 170, 200, 246] ce a fost demineralizat, decelularizat și perforat longitudinal pentru o invazie și populare celulară mai eficientă pare să fie mai rezonabilă [164, 167, 241]. Leziunile de cartilaj cauzate de artroză, traume, uzură legată de vârstă și patologii articulare cronice, duc la lezarea osului subcondral și a joncțiunii osteocondrale [170, 247], drept urmare într-o multitudine de cazuri de defecte de cartilaj este afectat și osul subcondral ce, de asemenea, necesită înlocuire [202, 219]. Materialul de grefare, fie el de origine biologică sau sintetică, utilizat în regenerarea defectului cartilajinos nu va putea adera la țesutul subiacent devitalizat cu scop de a regenera defectul de cartilaj [166, 201]. Ca urmare, în timpul intervenției chirurgicale o parte din osul subcondral se înlăturată, deoarece fixarea grefei în os era mai sigură, iar regenerarea os-os decurgea mult mai rapid comparativ cu cea cartilaj-cartilaj [167, 202]. Astfel de fixare a asigurat o stabilitate mai bună a cartilajului articular regenerat, cu păstrarea ierarhiei țesutului osteocondral în cadrul grefei, ce este esențială în regenerarea cartilajului articular [200, 244]. Este cunoscută, de asemenea, patentarea dopului osteocondral demineralizat [204], doar că acest țesut osteocondral nu a fost decelularizat [170, 215, 241, 245] sau perforat pentru repopulare cu celule autologe ce au potențial condroprogenitor.

În studiul efectuat am utilizat țesut OC de iepure ce a fost demineralizat și apoi decelularizat în soluții cu concentrații diferite de detergent ionic – Sodiu dodecil sulfat și anionic – Triton X-100 [170]. Este cunoscut că cu cât concentrația de detergent este mai înaltă cu atât procesul de decelularizare decurge mai repede, însă are loc deteriorarea calității țesutului decelularizat [151, 170, 205, 215]. Pentru a determina efectele surfactanților asupra țesutului osteocondral ce a fost preventiv demineralizat au fost utilizate câte 3 concentrații diferite de detergenți.

5.2 Metode

5.2.1 Pregătirea probelor de țesut osteocondral

De la 5 iepuri eutanasiați au fost prelevate femurile distale, ce au fost congelate la -84°C . Înainte de procesare, cu un osteotom au fost înlăturate țesuturile moi și excesul de os. După spălarea de sânge cu apă distilată, 20 de condili femurali au fost introduși în soluție de 0.6M HCl [252] (Sigma, SUA). Masa medie a condililor femurali era de 689 ± 91 mg (figura 5.1). Pentru demineralizarea unui condil au fost utilizate câte 250 ml soluție 0.6M HCl Sigma, SUA) ce a fost schimbată zilnic până la demineralizarea osului.



Figura 5.1. Pregătirea țesutului osteocondral pentru demineralizare.

Bucățile de țesut osteocondral (OC) au fost spălate într-un volum mare de apă distilată, de 3 ori a câte 60 de minute și introduse în soluția de H_2O_2 de 3% (Eurofarmaco, Republica Moldova) pentru 24 ore pe un agitator magnetic (MS-3000, Biosan). Au fost utilizate câte 50 ml soluție H_2O_2 per condil, cu schimbarea soluției de 3 ori (figura 5.2). A doua zi probele au fost spălate de 4-5 ori cu apă distilată, apoi ținute în PBS cu pH 7.4. Soluția PBS a fost schimbată fiecare 6-12 ore, cu controlul pH-ului până la neutralizarea acidității.



Figura 5.2. Demineralizarea și spălarea probelor de țesut osteocondral.

5.2.2 Decelularizarea țesutului OC demineralizat

După demineralizare și spălare, au fost create 6 grupuri experimentale de țesut OC. În dependență de agentul de decelularizare utilizat și doza acestuia au fost create grupele decelularizate cu diverse concentrații de Dodecil sulfat de sodiu (Sigma, Marea Britanie) - SDS 2%, SDS 1% și SDS 0.5%; și grupele decelularizate cu diverse concentrații de Triton X-100

(HiMedia, India) - TrX 2%, TrX 1% și TrX 0.5% [252]. Lotul martor era reprezentat de țesutul OC demineralizat. Decelularizarea a fost realizată cu ajutorul unui agitator orbital cu incubare (ES-20, Biosan) la 200 rpm, temperatura camerei (figura 5.3), pe parcursul a 24 ore. După decelularizare probele au fost spălate timp de 3 zile cu apă distilată prin agitare și schimbarea apei de 2 ori pe zi. Probele au fost introduse în eprubete de 50 ml și păstrate în frigider la 4°C (figura 5.4).



Figura 5.3. Procesul de decelularizare a țesutului osteocondral demineralizat.

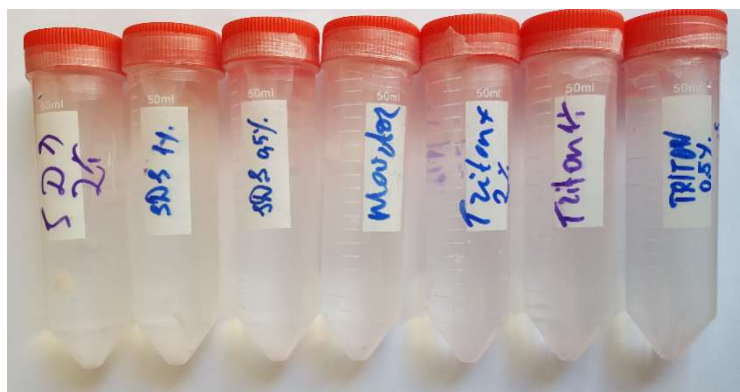


Figura 5.4. Loturile de țesut demineralizat și de țesut demineralizat și decelularizat.

5.2.3 Determinarea cantității de ADN restant în probe

ADN-ul restant în probe a fost extras folosind kit-ul de purificare a ADN-ului genomic Thermo Scientific GeneJET (Thermo Scientific, Lituania) [170]. Pentru extragerea ADN-ului, am folosit micro-pipete (Thermo Scientific, Lituania) și vârfuri pentru ele, soluție de etanol 96% (Luxfarmol, Republica Moldova), tuburi Eppendorf de 1.5 ml, microcentrifugă (TGL-16K, Zhuhai Hema Medical Instrument), baie de apă (BAE-2, Raypa), spectrofotometru (NanoDrop 2000C, Thermo Fisher) și mănuși din cauciuc.

După spălare în apă distilată, probele au fost centrifugate la 4000 rpm timp de 20 de minute pe tifon steril pentru desicare [170, 245]. Probele au fost tăiate cu diferite lame de

bisturiu, câte 6 bucăți din fiecare probă de țesut OCDD, 6 bucăți din proba martor și 6 bucăți de țesut OC normal, fiecare a câte 20 mg (figura 5.5).



Figura 5.5. **Extractia ADN-ului cu trusa de purificare genomica Thermo Scientific GeneJET.**

Toate probele au fost introduse individual în tuburi Eppendorf de 1.5 ml, în care s-au turnat câte 180 μ l de soluție pentru digestie, urmată de adăugarea a 20 μ l de Proteinaza K cu pipetarea ulterioară [212, 215]. Probele au fost plasate în baia de apă la 56°C până la digerarea completă, care a durat 3 ore. Pe durata incubării în baia de apă, probele au fost periodic agitate. După digestia probelor în tuburile Eppendorf s-au turnat suplimentar 20 μ l de ARN-ază.



Figura 5.6. **Coloanele pentru extragerea ADN-ului și soluțiile de lucru.**

După o pipetare minuțioasă probele su fost lăsate la temperatura camerei pentru 10 minute, apoi au mai fost adăugate încă câte 200 μ l soluție de liză. Suspensia a fost amestecată bine timp de 15-20 secunde până la obținerea unei mase omogene, la care ulterior au mai fost adăugate câte 400 μ l soluție etanol de 50% și s-a amestecat repetat. Suspensia obținută a fost introdusă într-o coloană de purificare ADN GeneJET genomic ADN, aceasta fiind fixată într-un tub de colectare (figura 5.6). Apoi, coloanele au fost centrifugate timp de 1 min la 6000 x g, după care au fost introduse în alte tuburi de colectare. În fiecare coloană au fost adăugate 500 μ l soluție tampon de spălare I cu etanol în proporție de 1: 3, urmată de centrifugarea repetată timp de 1 min la 8000 x g și ulterioara schimbare a tubului de colectare. În fiecare coloană repetat s-au turnat câte 500 μ l de soluție tampon de spălare I cu etanol 1: 3, urmat de centrifugare timp de 4 minute la 16000 x g. Apoi coloanele de purificare au fost introduse într-un tub Eppendorf de 1.5 ml în care s-au adăugat câte 200 μ l soluție tampon de eluție în centrul coloanei, pentru eluția ADN-ului. Eluția a avut loc timp de 2 minute la temperatura camerei după care s-a centrifugat repetat la 8000 x g

timp de un minut [170]. Suspensia scursă în Eppendorf a fost scanată la spectrofotometru (NanoDrop 2000c, ThermoFisher) la lungimile de undă 260 și 280 nm, la valoarea de referință de 50 ng/μl (figura 5.7).



Figura 5.7. Spectrofotometru NanoDrop 2000c.

5.2.4 Examenul histologic

Pentru a efectua examenul histologic probele au fost decalcificate în soluție de acid azotic 10% v/v (Chem-Lab, Belgia) la temperatura camerei și procesate în histoprosesorul MTP Carousel de la SLEE medical (Nieder-Olm, Germania). Probele au fost încorporate în parafină în Centrul modular de încorporare a țesuturilor EC 350 de la Especialidades Médicas Myr (Tarragona, Spania). Ulterior, probele au fost secționare la grosimea de 4 μm pe microtom CUT 5062 de la SLEE medical (Mainz, Germania) și aplicate pe lamele. Probele au fost colorate cu Hematoxină-Eozină și Albastru de Toluidină cu Fast Green.

5.2.5 Evaluarea *in vitro* a biocompatibilității probelor obținute.

5.2.5.1 Testul de citotoxicitate cu MTT

Pregătirea celulelor pentru teste

Au fost decongelate câte un criotub cu CSM și condrocite a câte 5×10^5 celule fiecare și introduse în flacoane de cultură celulară de 75 cm² cu 15 ml mediu nutritiv corespunzător tipului de celulă. Mediul nutritiv a fost schimbat fiecare 2 zile până la o confluență de 80-90%. După tripsinizare, celulele au fost resuspendate în mediul de cultură pentru diluare până la concentrația de 1×10^4 celule/ml, apoi în plăci cu 48 de godeuri au fost turnate câte 500 μl suspensie celulară/godeu.

Pregătirea probelor

Cu o lamă de bisturiu, au fost tăiate 18 bucăți de țesut OC demineralizat și decelularizat din fiecare lot cu dimensiuni de 1x2x3 mm. În calitate de martor a servit țesutul OC demineralizat. Apoi, bucățile au fost introduse în eprubete de 15 ml și sterilizate cu alcool 70% (Eladum Pharma, Republica Moldova) timp de 120 min (figura 5.8). Probele au fost spălate de

două ori cu apă distilată sterilă și monitorizate în HBSS cu roșu de fenol (Sigma, Marea Britanie) la temperatura camerei peste noapte, pentru a determina prezența modificărilor de pH.



Figura 5.8. Probe de țesut osteocondral pregătite pentru teste.

Ziua următoare soluția de HBSS cu roșu de fenol a fost schimbată doar în tuburile în care au avut loc modificări de culoare, după care probele au fost depozitate în frigider la 4-8°C până la începutul testării. Ziua următoare, după distribuirea CSM și a condrocitelor prin plăcile cu 48 de godee (CytoOne, Germania), câte 3-4 bucăți din fiecare tip de țesut OCDD și martor au fost introduse în fiecare placă cu CSM și condrocite, numărul godeelor de control au variat între 7 și 11. Rezultatele au fost evaluate la 24, 48 și 72 ore (figura 5.9).

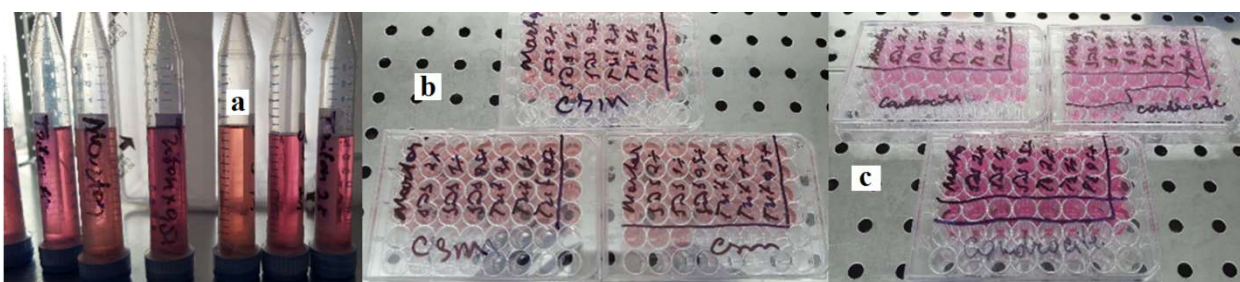


Figura 5.9. Probele pentru testul de citotoxicitate cu MTT, (a) modificarea culorii HBSS cu roșu de fenol, (b) plăcile în care au fost testate probele pe CSM și (c) plăcile în care au fost testate probele pe condrocite.

Efectuarea testului cu MTT

După primele 24 de ore de incubare a celulelor cu probele experimentale, câte o placă cu CSM și condrocite au fost scoase din incubator. Din godee cu mare prudență, cu o pincetă ascuțită, fără a atinge fundul godeelor au fost scoase toate probele, după care cu o micropipetă a fost înlăturat tot mediul de nutriție. În condiții obscure în fiecare godeu s-au turnat câte 500 μl soluție de lucru MTT 0.5% v/v pregătite pentru CSM și pentru condrocite respectiv. Plăcile au fost învelite cu folie de staniol și introduse în incubator (Smart Cell, Heal Force) la 37°C, 5%CO₂. Plăcile cu CSM au fost incubate timp de 2 ore, iar cele cu condrocite timp de 3 ore, apoi soluțiile cu MTT au fost extrase din plăci, iar înapoi au fost turnate câte 500 μl de isopropanol (Stanchem, Polonia). Plăcile au fost învelite în folie de staniol și agitate (ES-20, Biosan) la 150 rpm timp de 10 minute [252]. După solubilizarea formazanului câte 200 μl de soluție albastru-

violet de formazan solubilizat au fost transferate în godeele plăcilor de 96 godee (Sofra, China) și scanate cu spectrofotometru (TECAN) la 570 nm lungime de undă (figura 5.10).



Figura 5.10. Efectuarea testului de citotoxicitate cu MTT.

5.2.5.2 Testul de populare celulară

Pregătirea probelor

Cu un bisturiu din țesuturile OCDD și martor au fost secționare câte 4 bucăți de țesut de aproximativ 1x3x4.5 mm, care mai apoi au fost introduse în eprubete sterile de 15 ml și sterilizate timp de 120 minute cu alcool de 70% (Eladum Pharma, Republica Moldova) (Figura 5.11). Apoi, eprubetele cu probe au fost introduse în hota cu flux laminar (LN 090, Nuve) unde au fost spălate cu PBS (HiMedia, India) de 3 ori, după care în eprubete s-a turnat HBSS cu roșu de fenol (Sigma, Marea Britanie) și au fost păstrate pentru 24 ore la temperatura camerei.



Figura 5.11. Pregătirea probelor pentru testul de populare celulară.

Ziua următoare, HBSS din eprubetele în care s-a schimbat culoarea a fost înlocuit cu HBSS proaspăt și au fost lăsate repetat peste noapte, iar celelalte probe în care pH-ul nu a suferit modificări au fost introduse în frigider la 4°C. Cu o zi înainte ca celulele să fie adăugate la probe, acestea au fost introduse în plăci cu 96 godee (Sofra, China). Probele au fost împărțite în 2 grupuri – cele ce vor fi testate cu CSM și cele ce vor fi testate cu condrocite, după care la fiecare probă în godeu au fost turnate câte 200 μl mediu de cultură celulară specific pentru tipul de celule ce a fost utilizat [170].

Popularea probelor

Peste 24 ore au fost pregătite suspensiile celulare de CSM și condrocite cu o concentrație de 5×10^4 celule/ml. Din plăcile de 96 godee cu probe a fost înlăturat tot mediul de cultură celulară turnat anterior [170, 253]. În fiecare godeu s-au turnat câte 200 μl de suspensie cu 1×10^4 celule, după care plăcile au fost incubate la 37°C, 5%CO₂. Ziua următoare în fiecare godeu au fost turnate suplimentar câte 100 μl mediu pentru culturi celulare, iar la ziua a treia probele populate cu celule au fost transferate în plăci cu 48 de godee, la care s-au turnat câte 500 μl mediu de cultură celulară pentru tipul celulelor utilizate (figura 5.12). Fiecare 48 ore mediile de cultură au fost schimbate pe jumătate. La termen de 7 și 14 zile probele au fost scoase de la incubare și colorate cu DAPI.

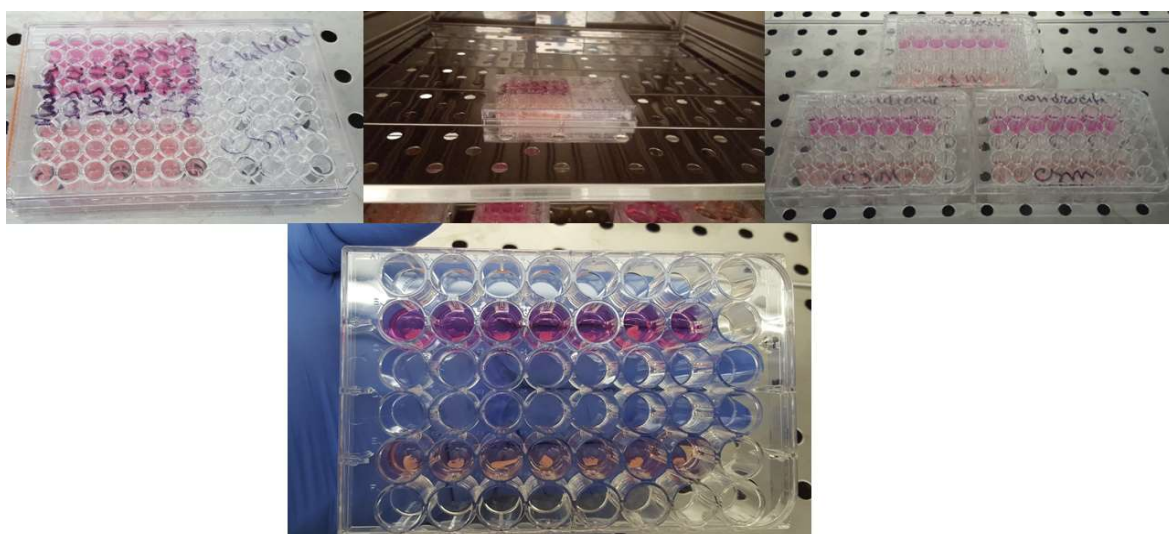


Figura 5.12. Popularea probelor cu CSM și condrocite.

Colorarea probelor cu DAPI

Probele scoase din incubator la 7 și 14 zile, au fost spălate cu PBS cu calciu și magneziu (Sigma, Marea Britanie), după care în fiecare godeu s-a turnat câte 1 ml de soluție paraformaldehidă 4%. Plăcile au fost sigilate cu parafilm și lăsate peste noapte la temperatura camerei [170, 252, 253]. Probele au fost spălate de 2 ori cu PBS cu calciu și magneziu și lăsate peste noapte în 1 ml de aceeași soluție. Ziua următoare, după înlăturarea PBS, în godee au fost

adăugate câte 500 μ l soluție de permeabilizare membranară, după care plăcile au fost introduse în frigider la 4°C pentru 30 de minute. Probele apoi au fost spălate cu PBS de 3 ori a câte 10 minute și transferate cu o pincetă în alte godee curate. În condiții de luminozitate redusă la fiecare probă au fost adăugate câte 500 μ l soluție de lucru DAPI, apoi plăcile a fost învelite în folie de staniol și lăsate la temperatura camerei pentru 30 minute. După înlăturarea soluției de lucru DAPI, godeele au fost spălate repetat de 3 ori câte 10 minute cu PBS cu calciu și magneziu, după care în godee au fost turnate câte 100 μ l soluție de lucru DAPI, iar probele au fost examinate prin microscopie fluorescentă (DM IL, Leica).

5.2.5.3 SEM a probelor populate cu celule

În aceleași condiții descrise anterior, probele de țesut OCDD și martor au fost populate cu CSM și condrocite. Celulele au fost cultivate timp de 14 zile. Apoi, la extragerea din incubator au fost spălate cu PBS cu calciu și magneziu (Sigma, Marea Britanie) de 2 ori, fixate în soluție glutaraldehidă de 2.5% cu pH-ul de 7.2-7.4 (Alfa Aesar, Germania) și ținute în frigider la 4°C peste noapte. Ulterior, probele au fost spălate repetat cu PBS și apă distilată urmate de prelucrarea cu diferite concentrații de alcool (Luxfarmol, Republica Moldova). Soluțiile de alcool de diferită concentrație au fost schimbate consecutiv fiecare 10 minute pentru dehidratarea probelor, începând cu 10%, 30%, 50%, 70%, 90% și 96%. Probele au fost lăsate la temperatura camerei până la uscare, după care a fost efectuată metalizarea suprafețelor probelor cu un strat ultrasubțire de aur la presiunea de 0.1 mbar timp de 30 secunde în 108 Auto Sputter Coater (Cressington, SUA) (Figura 5.13) și scanate la microscopul electronic Vega 5130 instrument de la Tescan (Brno, Czech Republic) în Laboratorul de testare a materialelor de la UTM.



Figura 5.13. Acoperirea probelor cu strat subțire de aur în dispozitivul Cressington Sputter Coater 108 auto (a) și microscopul pentru scanarea electronică Vega 5130, Tescan (b).

5.2.6 Testul de umflare

Pentru realizarea testului au fost utilizate coloanele din kit-ul de purificare a ADN-ului GeneJET genomic ADN (ThermoFisher, Lituania), ce au fost fixate la seringi de 1 ml printr-un fragment mic de tub de la picurătoare. Din fiecare probă de țesut OCDD au fost tăiate și cântărite câte trei bucăți, care mai apoi au fost introduse câte una în coloanele de purificare. Cu seringă a

fost injectat în coloană 1 ml de PBS pH 7.4. Probele au fost plasate în termostat la 37°C timp de 24 de ore (figura 5.14). În calitate de martor au servit probele de țesut OC demineralizat. A doua zi, lichidul din coloane a fost aspirat înapoi în seringă și a fost apreciat volumul de PBS reținut de probe. Gradul de umflare a fost determinat după formula (12):

$$GU_{max} = \frac{mf - mi}{mi} \times 100 (\%), \quad (12);$$

unde $mf = mi + mabs$;

mi este masa inițială a probei, iar $mabs$ reprezintă masa de solvent absorbită după 24 ore;

$mabs = \text{densitatea} \times \text{volumul absorbit}$;

Calcululele au fost făcute reieșind din faptul că densitatea soluției de PBS este 1.12 mg/ml (g/l).



Figura 5.14. Pregătirea probelor și realizarea testului de umflare.

5.2.7 Testul de degradare enzimatică

Pentru realizarea testului câte 3 probe din fiecare tip de țesut OCDD și martor au fost liofilizate (VaCO II, Zirbus) la 0.05mbar timp de 16 ore, după care au fost cântărite pe un cântar analitic (Isolab, Germania) și introduse în flacoane din sticlă de 10-12 ml cu capac din cauciuc. La fiecare 5 mg de probă, în flacoane au fost turnate câte 2 ml de soluție collagenază 0.01%, apoi probele au fost introduse în termostat la 37°C (figura 5.15). La termen de 2, 4, 24, 48, 72 ore, 7 și 14 zile din flacoane au fost extrase câte 200 μl de suspensie de proteină degradată ce a fost introdusă în tuburi pentru teste din sticlă (Isolab, Germania).



Figura 5.15. Probe de țesut osteocondral în incubator în timpul testului de degradare enzimatică.

Înapoi în flacoane au fost turnate câte 200 μl soluție proaspătă de collagenază de 0.01% [170, 252, 253]. În tuburile pentru teste cu suspensia proteică ce a fost extrasă a fost adăugat câte 1 ml de reactiv de nihidrină. Tuburile au fost acoperite cu folie de staniol și introduse în baia de

apă (BAE-2, Raypa) la 100°C, timp de 20 minute. După fierbere, conținutul tuburilor a fost transferat în baloane cotate de 5 ml (Isolab, Germania), în care a fost turnat isopropanol (Stancem, Polonia) în proporție de 1:1 cu apă distilată până la zenit. Conținutul baloanelor cotate a fost turnat înapoi în tuburile pentru teste. Din fiecare tub, în godeele unei plăci de 96 godee (Sofra, China) au fost transferate câte 30 μl de soluție de culoare albastră, ce a fost suplinită cu isopropanol și apă distilată 1:1 până la 150 μl. Placa a fost agitată timp de 10 minute la 150 rpm (ES-20, Biosan) și scanată la spectrofotometru (TECAN) cu lungimea de undă 570 nm (figura 5.16).

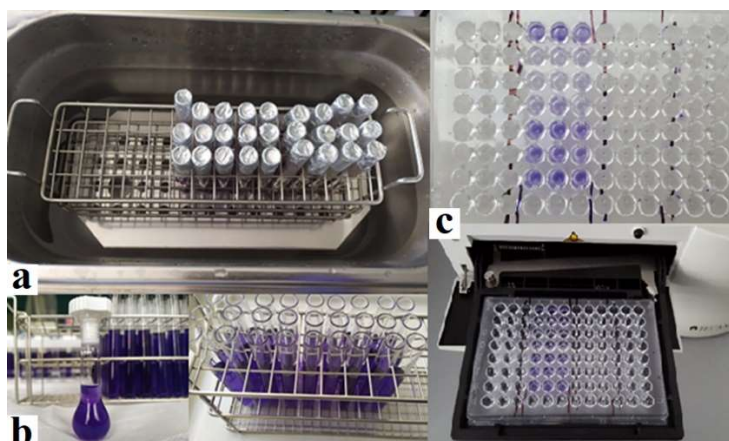


Figura 5.16. Procesarea suspensiei proteice în cadrul testului pentru degradarea enzimatică: fierberea tuburilor cu suspensie proteică și reactiv de ninhidrină (a), diluarea proteinei fierte cu isopropanol (b) și scanarea la spectrofotometru (c).

Elaborarea curbei standard de glicină

Într-un pahar de sticlă cu 6 ml de apă distilată au fost dizolvate 50 mg de glicină, apoi volumul a fost adus la zenit într-un balon cotat de 10 ml. Cu o micropipetă, din balon au fost transferate într-un godeu a plăcii cu 24 godee (TPP, Suedia) 2 ml soluție de glicină, iar înapoi au fost turnate alți 2 ml. După omogenizarea conținutului, procesul a fost repetat încă de 19 ori.

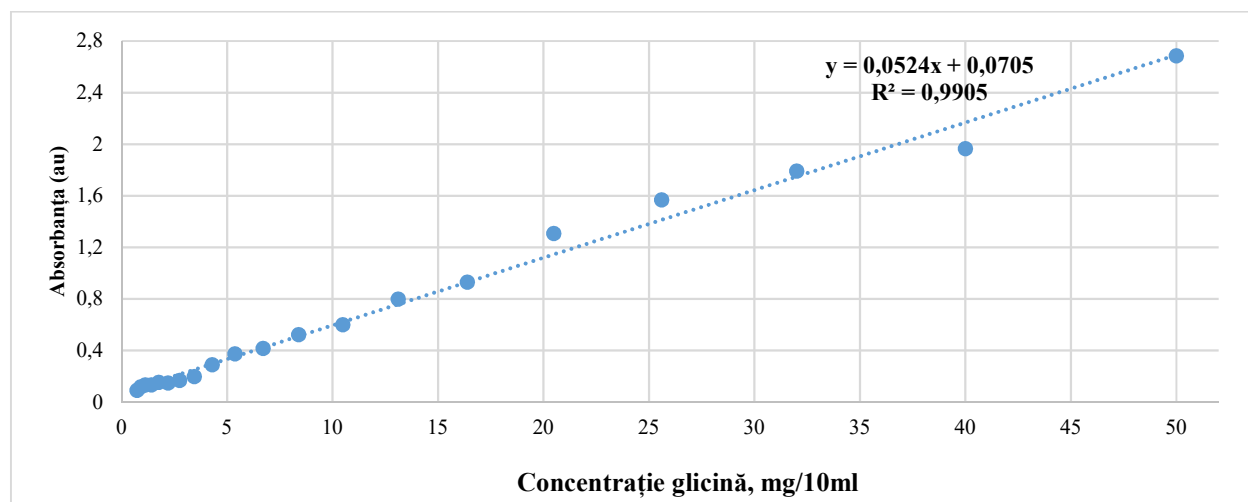


Figura 5.17. Curba standard de glicină.

Concentrațiile soluțiilor de glicină din balonul cotate de 10 ml fiind următoarele: 1 – 50 mg; 2 – 40 mg; 3 – 32 mg; 4 – 25,6 mg; 5 – 20,48 mg; 6 – 16,384 mg; 7 – 13,107 mg; 8 – 10,485 mg; 9 – 8,388 mg; 10 – 6,71 mg; 11 – 5,368 mg; 12 – 4,294 mg; 13 – 3,435 mg; 14 – 2,748 mg; 15 – 2,199 mg; 16 – 1,759 mg; 17 – 1,407 mg; 8 – 1,125 mg; 19 – 0,9 mg; 20 – 0,72 mg. Apoi, din godeele plăcii au fost prelevate câte 200 μ l de soluție glicină de diversă concentrație și introduse în tuburi pentru teste (Isolab, Germania). Soluțiile de glicină au fost procesate conform metodei descrise la procesarea suspensiei proteice. Rezultatele obținute au fost introduse în grafic (figura 5.17), cu includerea liniei de trend și formulei de calcul (13) pentru aprecierea concentrației de proteină digerată la 10 ml în dependență de absorbanta la lungimea de undă de 570 nm:

$$y = 0,0524x + 0,0705 \quad (13);$$

unde y este absorbanta la 570 nm; iar x – concentrația de proteină digerată la 10 ml;

prin urmare $x = \frac{y-0,0705}{0,0524}$.

5.2.8 Determinarea modulului de elasticitate

Modulul de elasticitate al probelor a fost apreciat cu ajutorul analizorului de texturi TA.XT plus. Pentru a analiza gradul de elasticitate bucăți de țesut OCDD și martor au fost liofilizate la 0.05 mbar (VaCO II, Zirbus). Probele au fost apoi ținute în PBS pH 7.4 timp de 4 ore la temperatura camerei, după care a fost calculată aria suprafețelor fiecărei probe și efectuat testul mecanic (figura 5.18).

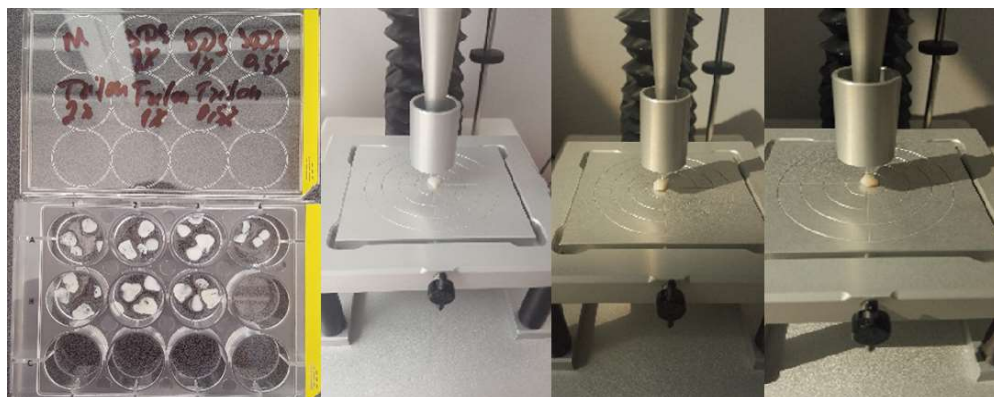


Figura 5.18. Aprecierea modulului de elasticitate a probelor de țesut demineralizat și decelularizat cu analizorul de texturi TA.XT plus.

5.3 Rezultate

5.3.1 Cuantificarea ADN-ului

La utilizarea kit-ului de purificare a ADN-ului genomic Thermo Scientific GeneJET (Thermo Scientific, Lituania) și a protocolului de lucru furnizat de producător, a fost determinat că țesutul OC normal de iepure conține 40.65 ± 15.25 ng/ μ l de ADN [170]. Ca urmare a utilizării a 0.6M HCl pentru demineralizarea osului din complexul osteocondral a fost determinat că

acesta, de asemenea, a contribuit la eliminarea semnificativă a ADN-ului din țesuturi, cu aproximativ 78% ($p < 0.001$). Decelularizarea țesutului OC demineralizat cu diverse concentrații de surfactanți timp de 24 ore, de asemenea, a redus conținutul ADN-ului din probe. În final, timp de 24 ore ADN-ul a fost înlăturat până la un conținut mai mic de 5% prin utilizarea soluțiilor de SDS cu concentrația de 1% și 2%, dar și soluția de TrX cu concentrația de 1% (figura 5.19). Diferența dintre cantitatea de ADN restant în proba martor și în probele experimentale comparativ cu țesutul OC normal este reprezentată în tabelul 5.1. La compararea concentrației de ADN în lotul martor – țesut OC demineralizat, cu cea a probelor experimentale, de asemenea, a fost determinată o diferență semnificativă ($p < 0.01$).

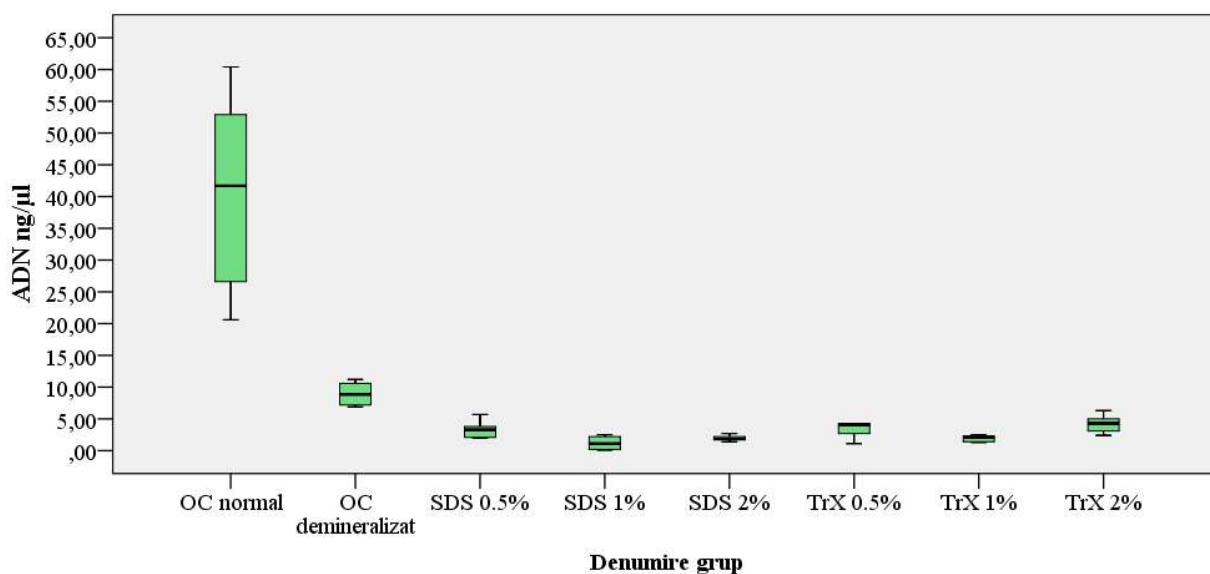


Figura 5.19. Concentrația de ADN în țesutul OC normal, demineralizat și demineralizat-decelularizat.

Tabelul 5.1. Cantitatea de ADN restant în țesuturile OC după demineralizare și decelularizare raportate la țesutul OC normal.

Tip probă	Cantitatea de ADN (ng/μl) $\bar{X} \pm DS$	p	Concentrația de ADN (%)	95% ÎÎ:
OC demineralizat	8.93 ±1.93	p <0.001	21.96%	16.97-26.97
SDS 0.5%	3.37 ±1.37	p <0.001	8.29%	4.73-11.82
SDS 1%	1.2 ±1.01	p <0.001	2.95%	0.34-5.55
SDS 2%	1.95 ±0.46	p <0.001	4.79%	3.60-5.98
TrX 0.5%	3.42 ±1.29	p <0.001	8.41%	5.06-11.74
TrX 1%	1.95 ±0.49	p <0.001	4.79%	3.53-6.06
TrX 2%	4.23 ±1.39	p <0.001	10.40%	6.81-14.01

A fost determinat că concentrația și tipul de surfactant influențează viteza decelularizării țesutului osteocondral. La compararea eficacității decelularizării prin utilizarea aceluiași concentrații de surfactanți, a fost determinat că la concentrațiile de 0.5% și 1% de SDS și TrX

nivelul de decelularizare nu prezintă diferențe majore ($p > 0.1$), iar la utilizarea acestor surfactanți cu concentrația de 2% a fost obținută o diferență semnificativă a concentrației de ADN ($p = 0.003$), în cazul utilizării de 2% TrX conținutul de ADN fiind mai mare, rezultatele sunt prezentate în tabelul 5.2.

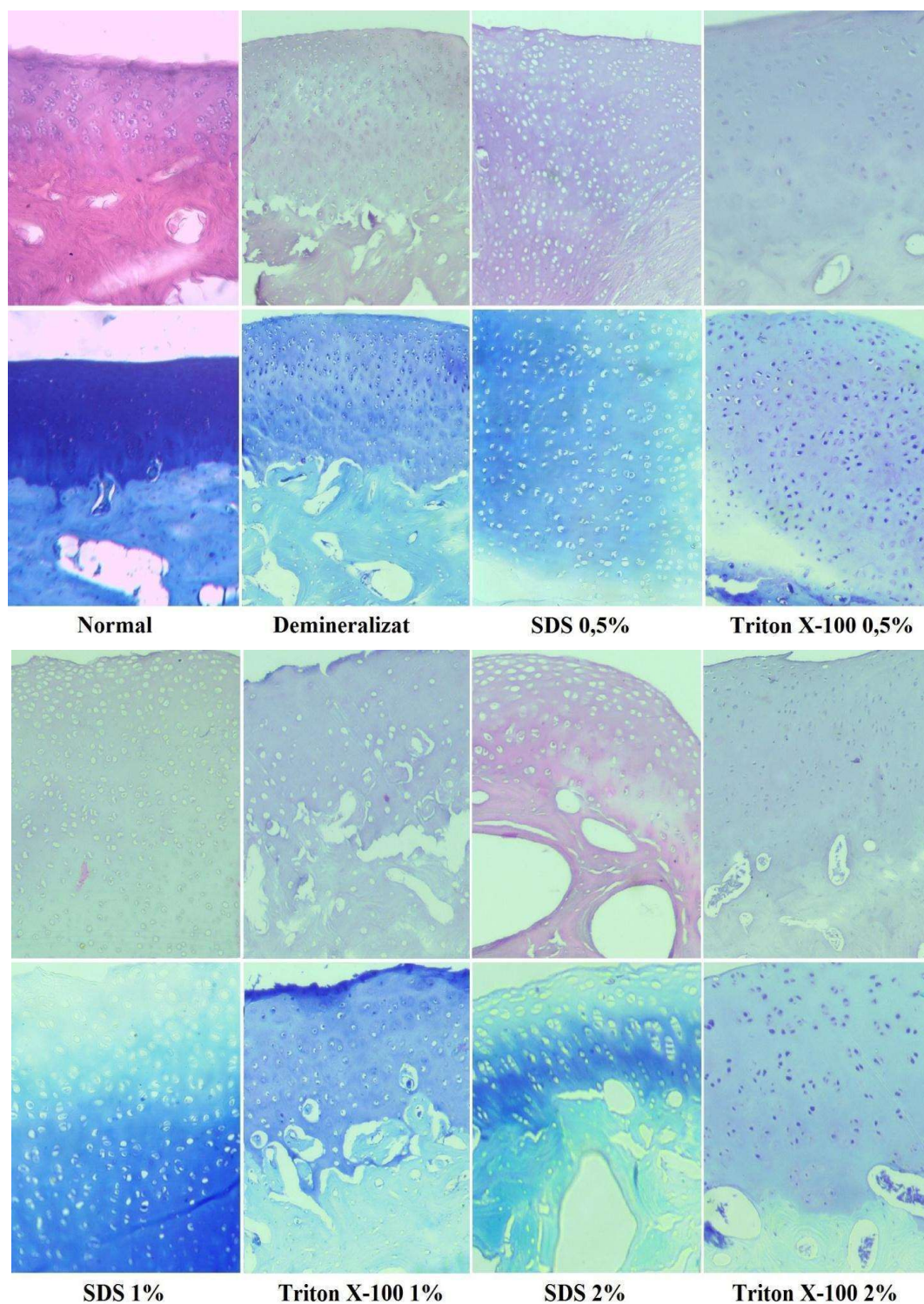


Figura 5.20. Examenul histologic al țesutului OC normal, demineralizat și demineralizat-decelularizat cu SDS și TrX de diferite concentrații la magnificarea x100.

Tabelul 5.2. **Compararea conținutului de ADN după decelularizare cu diferiți surfactanți de aceeași concentrație.**

Grupele comparate	t-test
SDS 0.5% și TrX 0.5%	p =0.95
SDS 1% și TrX 1%	p =0.133
SDS 2% și TrX 2%	p =0.003

5.3.2 Examenul histologic

La examenul histologic a fost reconfirmat faptul că decelularizarea țesutului OC depinde de tipul și concentrația surfactantului utilizat. A fost determinată prezența nucleelor sau fragmentelor de nucleu predominant în țesuturile OC decelularizate cu TrX. De asemenea, a fost determinată o intensitate diferită a colorării specifice cu Albastru de Toluidină și Fast Green pentru identificarea de GAG în cartilajul decelularizat. La decelularizarea țesutului OC demineralizat cu SDS, intensitatea colorării era mai înaltă comparativ cu utilizarea de TrX, ceea ce denotă o concentrație mai înaltă de GAG în probele tratate cu SDS (figura 5.20), dar cu mult mai joasă comparativ cu proba martor sau cartilajul normal [170, 253].

5.3.3 Testul de viabilitate celulară cu MTT

În urma efectuării testului de viabilitate celulară cu MTT la 24, 48 și 72 ore a fost determinată o activitate metabolică celulară înaltă, în special la contactul probelor cu condrocitele (figura 5.21). Aceste rezultate indică prezența a diverși factori de creștere în probele OCD și OCDD testate, aceștia fiind favorabili activității condrocitare, cea mai înaltă activitate fiind înregistrată la termen de 72 ore cu peste 140% (95% ÎI: 121.98-165.88), ca urmare a contactului condrocitelor cu proba de țesut OC demineralizat ($p < 0.05$), aceasta nefiind tratată cu surfactanți. De asemenea, cea mai mică activitate de 116.34% (95% ÎI: 114.02-118.66) a fost a probei de țesut OC demineralizat și apoi decelularizat cu TrX de 1%. Comparativ cu condrocitele activitatea metabolică a CSM era mai restrânsă, dar bună. În primele 24 ore viabilitatea CSM a variat în mediu între 90% și 100%, iar la 48 și 72 ore între 80-90%, fără vre-o diferență statistică între grupe ($p > 0.5$) (figura 5.21).

5.3.4 Testul de populare celulară

După cultivarea CSM și condrocitelor pe probele de țesut OCD și OCDD cu diverse concentrații de surfactanți, a fost determinat că multiplicarea celulară este mai abundentă în cazul condrocitelor la 7 zile de cultivare. La ziua a 14-a de cultură celulară, gradul de populare a probelor era uniform de abundent, atât cu condrocite, cât și cu CSM (figura 5.22).

5.3.5 Scanarea electronomicroscopică

În figura 5.23 sunt prezentate rezultatele SEM a probelor de cartilaj articular populate cu CSM și condrocite. La SEM a fost determinată prezența diferenței între țesuturile populate cu

celule și cele nepopulate. În cazul probelor populate cu celule a fost determinată prezență de celule unice, dar și a celulelor ce formează o peliculă pe suprafața secțiunii de cartilaj, pe alocuri cu îngroșări, iar pe cele nepopulate a fost vizualizată ultrastructura țesutului osteocondral și prezența lacunelor în care s-au aflat condrocitele, acestea aproape lipsind completamente în cazul probelor prelucrate cu SDS de 1% și 2%.

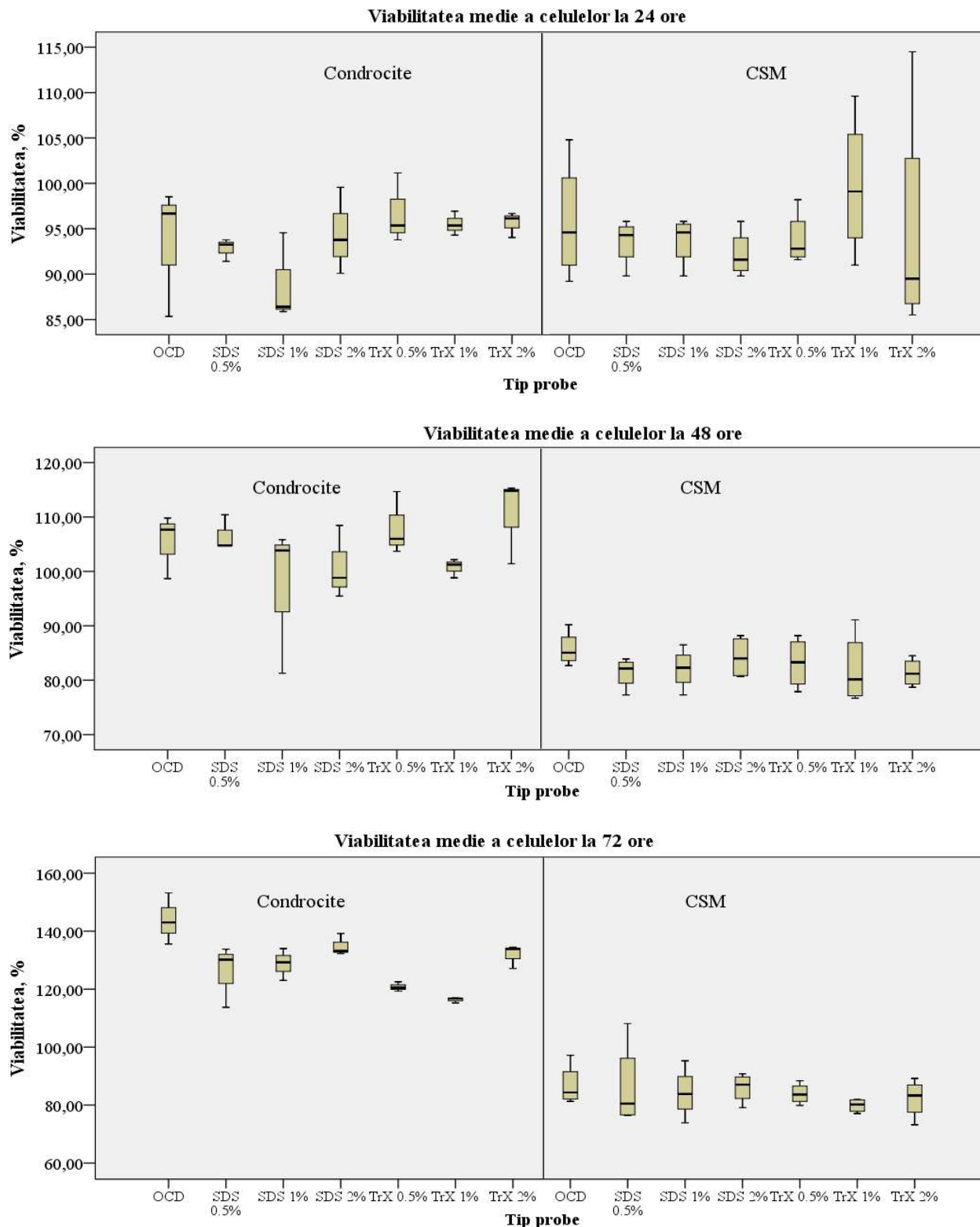


Figura 5.21. Rezultatele evaluării citotoxicității probelor prin testul MTT, la contact cu condrocite și CSM la termen de 24, 48 și 72 ore.

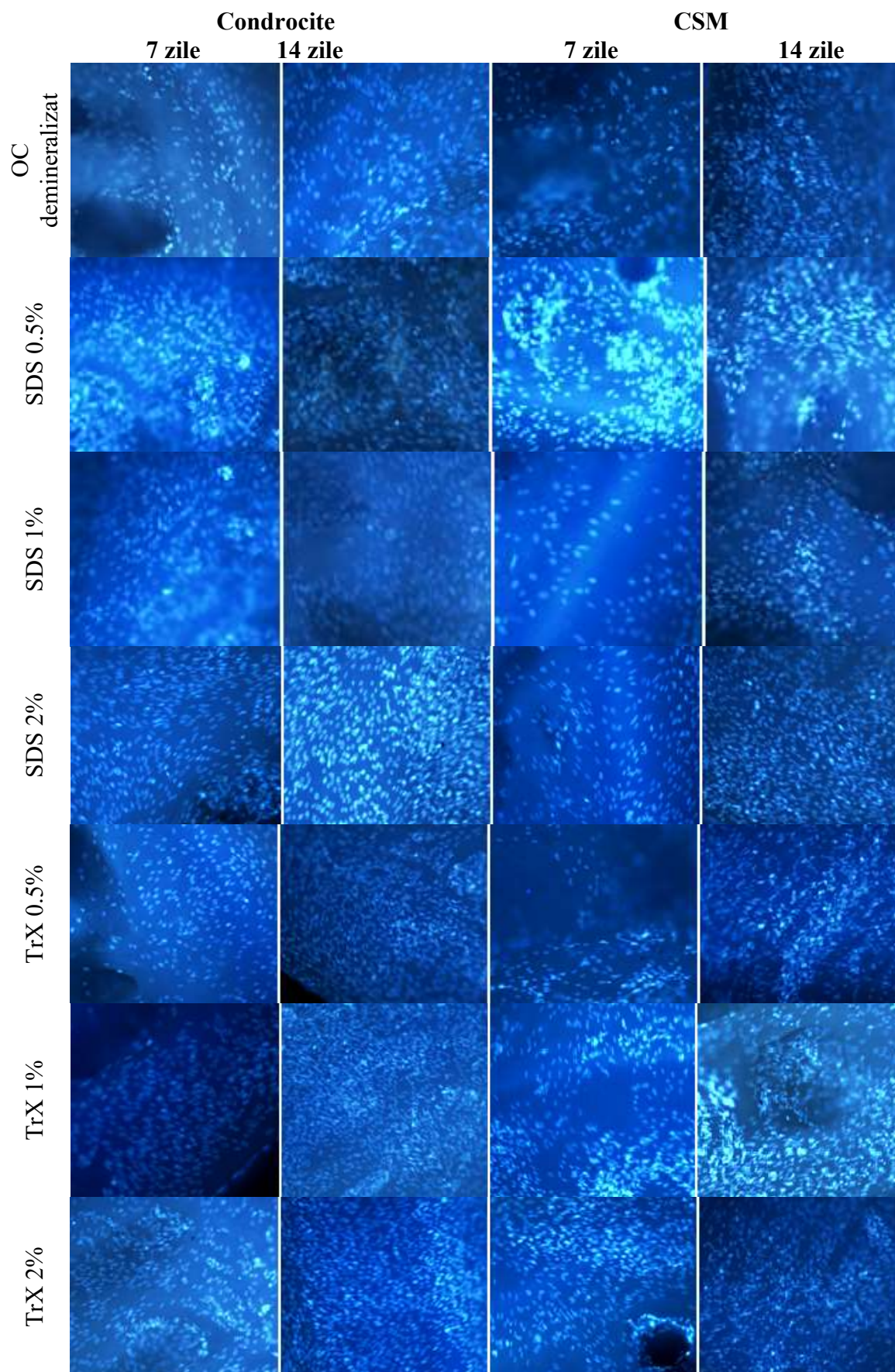


Figura 5.22. Rezultatele populării probelor de țesut osteocondral cu condrocite și CSM, colorate cu DAPI și vizualizate prin microscopie cu fluorescență (DM IL, Leica) x100.

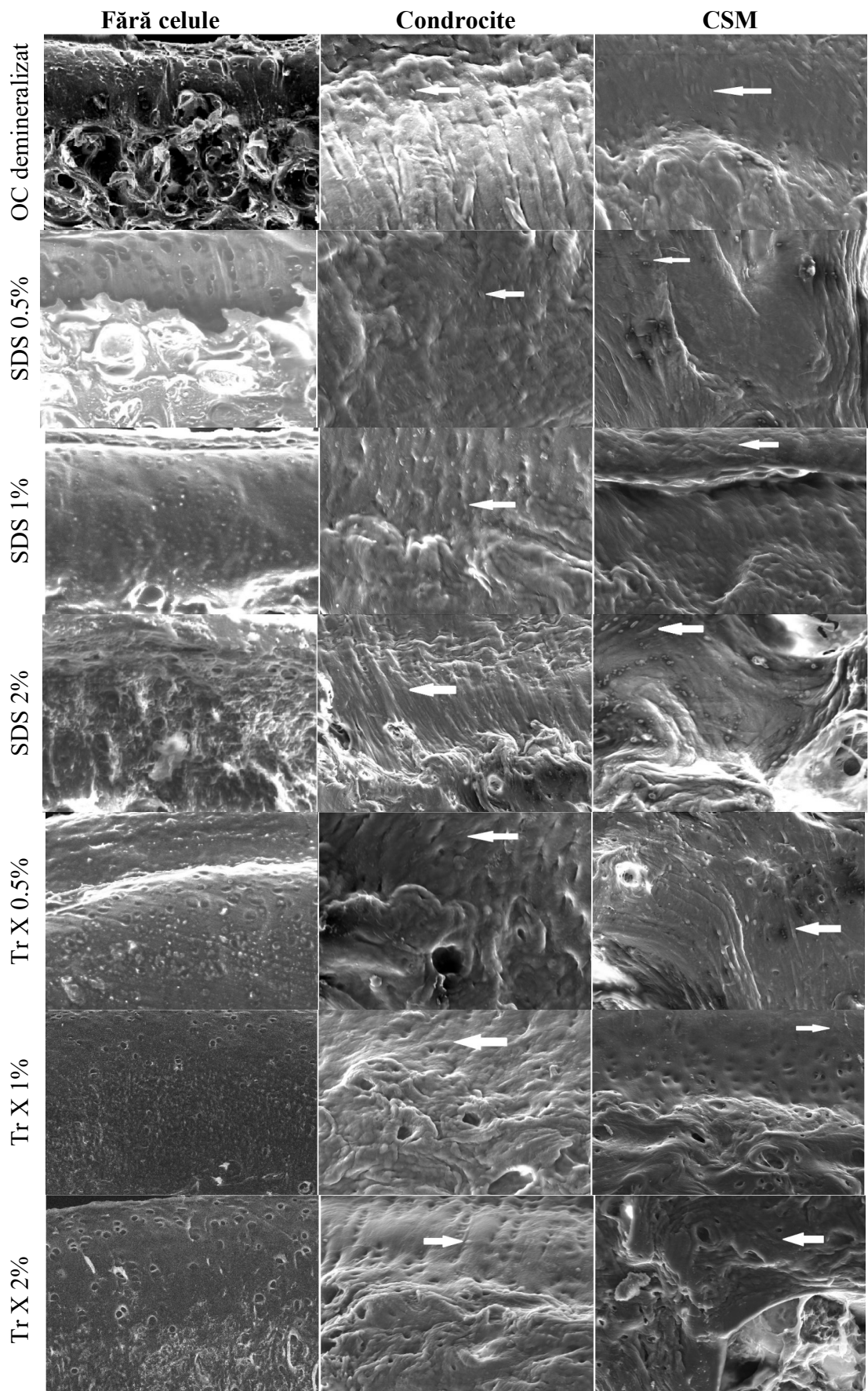


Figura 5.23. Sunt prezentate probe populate cu celule condroprogenitoare tratate și netratate cu surfactanți, magnificare de x150-x200, Vega, Tescan.

5.3.6 Degradarea enzimatică

Conform rezultatelor obținute este prezentă diferență statistic semnificativă între grupurile experimentale în perioade diferite ale degradării enzimatică. În tabelul 5.3 este prezentată semnificația statistică la compararea loturilor experimentale cu lotul martor în perioade diferite de evaluare a concentrației de aminoacizi, ca urmare, a degradării enzimatică, dar și semnificația statistică la compararea rezultatelor obținute pe toate grupele experimentale (*ANOVA*). A fost determinat că cel mai repede au degradat probele de țesut OC demineralizat (martor) și cele decelularizate cu TrX 0.5% ($p > 0.5$), atingând vârful concentrației maxime de aminoacizi depistați la ziua a 7-a.

Tabelul 5.3. Semnificația statistică a rezultatelor degradării enzimatică a probelor tratate cu surfactanți versus lotul martor (p).

	2 ore	4 ore	24 ore	48 ore	72 ore	7 zile	14 zile
SDS 0.5%	$p = 0.398$	$p = 0.132$	$p < 0.001$	$p = 0.002$	$p = 0.008$	$p = 0.001$	$p = 0.001$
SDS 1%	$p = 0.020$	$p = 0.070$	$p < 0.001$	$p = 0.001$	$p = 0.003$	$p < 0.001$	$p = 0.001$
SDS 2%	$p = 0.014$	$p = 0.063$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p = 0.002$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
TrX 0.5%	$p = 0.149$	$p = 0.733$	$p = 0.688$	$p = 0.072$	$p = 0.473$	$p = 0.354$	$p = 0.788$
TrX 1%	$p = 0.651$	$p = 0.474$	$p = 0.036$	$p = 0.118$	$p = 0.145$	$p = 0.046$	$p = 0.593$
TrX 2%	$p = 0.344$	$p = 0.706$	$p = 0.250$	$p = 0.569$	$p = 0.376$	$p = 0.117$	$p = 0.884$
ANOVA	$p = 0.009$	$p = 0.004$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$

Următoarele probe, cu o viteză înaltă de degradare enzimatică au fost cele decelularizate cu TrX de 1% și 2% ($p > 0.1$). Comparativ cu lotul martor, acestea nu și-au atins valorile maxime de aminoacizi până la ziua a 14-a a experimentului ($p > 0.1$).

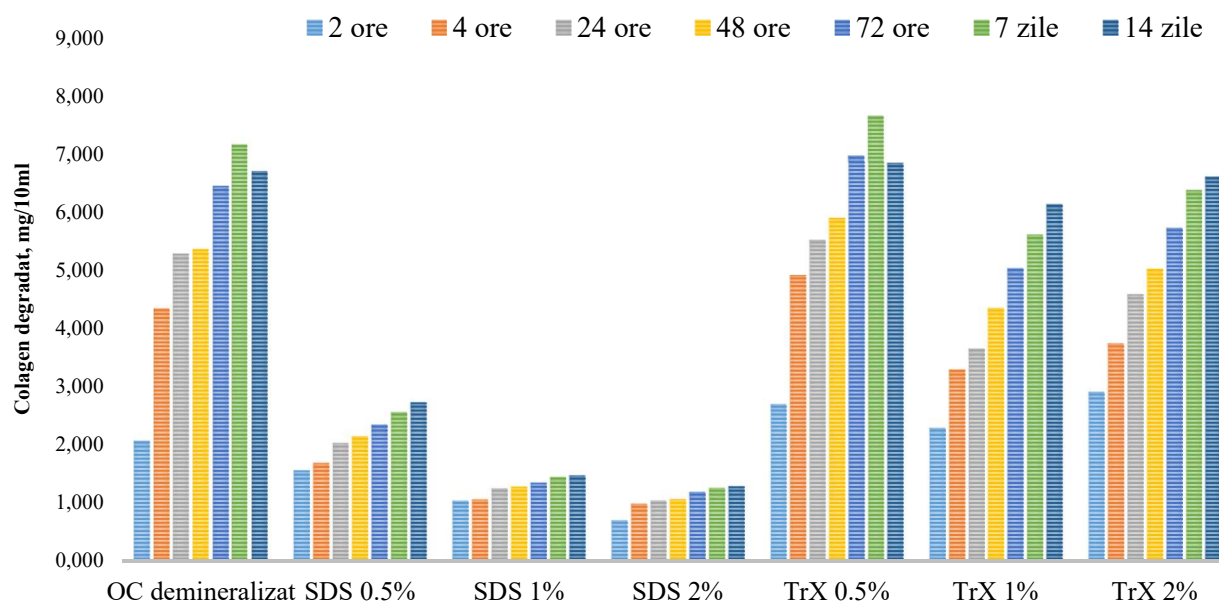


Figura 5.24. Reprezentarea grafică a rezultatelor degradării enzimatică a probelor cu colagenază [170].

A fost determinat că probele de țesut OC demineralizat ce au fost decelularizate cu SDS aveau o viteză de degradare enzimatică mult mai lentă comparativ cu lotul martor și probele decelularizate cu TrX, aceasta clar a fost observat începând cu perioada de 24 ore de la începutul testului ($p < 0.01$). De asemenea, a fost constatată o corelație negativă între concentrația de SDS utilizat și viteza de degradare enzimatică, care a fost semnificativă la termen de 24 ore și 14 zile ($p < 0.05$), cu cât concentrația de SDS utilizată pentru decelularizare a fost mai mare, cu atât viteza de degradare enzimatică a fost mai mică (figura 5.24). Cea mai mică viteză de degradare a fost în grupul țesuturilor OC demineralizate și decelularizate cu SDS de 2% ($p < 0.01$).

5.3.7 Testul de umflare

Rezultatele obținute la măsurarea capacității de umflare a probelor de țesut OC demineralizat și celor supuse decelularizării cu SDS și TrX nu prezintă diferență semnificativă ($p > 0.05$). Drept urmare a fost determinat că între probele testate gradul de hidrofilie este același. În tabelul 5.4 sunt reprezentate rezultatele și valorile de semnificație statistică a testului de umflare.

Tabelul 5.4. **Rezultatele testului de hidrofilie a probelor de țesut OC demineralizat și decelularizat, raportate la lotul martor.**

Tip decelularizare probă	Grad de umflare (%) $\bar{X} \pm DS$	p
OC demineralizat	440.66 \pm 160.36	
SDS 0.5%	560.19 \pm 365.45	$p > 0.5$
SDS 1%	302.12 \pm 116.21	$p > 0.2$
SDS 2%	722.08 \pm 280.13	$p > 0.2$
TrX 0.5%	515.38 \pm 290.79	$p > 0.7$
TrX 1%	462.48 \pm 86.43	$p > 0.8$
TrX 2%	485.12 \pm 232.89	$p > 0.7$
ANOVA	$p > 0.5$	

5.3.8 Modulul de elasticitate

După aprecierea modulului de elasticitate a fost determinată o diferență statistic semnificativă între țesutul OC normal și grupele de țesut OC demineralizate și OC demineralizate și decelularizate ($p = 0.001$). De asemenea, a fost determinată o diferență statistic semnificativă între modulul lui Young al grupului de țesut OC demineralizat și cel al probelor din grupul OCD demineralizat cu SDS de 0.5% ($p = 0.009$), pe când în celelalte cazuri între grupul control și celelalte grupuri experimentale, diferență statistic semnificativă nu a fost depistată ($p > 0.1$). Acest fapt poate fi explicat prin neomogenitatea structurii complexelor de țesut osteocondrale comparate, deoarece provin de la animale diferite, se caracterizează printr-un grad diferit de mineralizare a osului subcondral, grosime a cartilajului și grad de compactare a țesutului osos demineralizat. Rezultatele comparării datelor obținute la evaluarea modulului de elasticitate sunt prezentate în tabelul 5.5.

Tabelul 5.5. Rezultatele determinării modulului de elasticitate a probelor de țesut OC demineralizat și decelularizat, raportate la lotul martor și țesutul OC normal.

Tip decelularizare probă	E(N/m ²) X ±DS	p ₁	p ₂
OC normal	5120.58 ±1701.83		
OC demineralizat	188.04 ±47.88	p =0.001	
SDS 0.5%	292.55 ±25.86	p =0.001	p =0.009
SDS 1%	252.19 ±61.99	p =0.001	p >0.1
SDS 2%	148.79 ±42.60	p =0.001	p >0.2
TrX 0.5%	137.25 ±47.07	p =0.001	p >0.1
TrX 1%	280.83 ±72.72	p =0.001	p >0.07
TrX 2%	163.03 ±14.86	p =0.001	p >0.3
<i>ANOVA</i>	<i>p <0.001</i>		
<p>p₁ – semnificația statistică la compararea valorilor medii a probelor cu țesutul OC normal; p₂ – semnificația statistică la compararea valorilor medii a probelor cu țesutul OC demineralizat;</p>			

5.4 Discuții

Grefa osteocondrală demineralizată, decelularizată și perforată a fost gândită în așa fel ca să combine transplantul de țesut osteocondral alogen sau xenogen decelularizat îmbibat cu celule proprii recipientului la nivelul defectului de cartilaj, similar transplantului de cartilaj [170]. Utilizarea concentrațiilor diferite de surfactanți a permis să apreciem efectul acestora asupra țesutului osteocondral. În literatura sunt descrise combinații diverse de substanțe utilizate în decelularizarea diferitor țesuturi și organe. Deoarece cartilajul articular este un țesut dens [12, 206], are ca consecință o durată îndelungată de decelularizare, drept urmare acesta poate fi decelularizat complet doar după mărunțire [172, 200, 207, 243].

Utilizarea HCl de 0.6 M cu scop de a decalcifica osul subcondral a redus semnificativ și cantitatea ADN-ului din țesut, până la 78% (p<0.001). Astfel spus, conținutul de ADN din țesut a fost micșorat fără a recurge la mărunțirea prin secționare [170, 208], mărunțirea după expunerea la cicluri de criocongelare în NO₂ [172] sau utilizarea consecutivă a mai multor tipuri de surfactanți, dar și a ADN-azelor pentru a ajunge la înlăturarea ADN-ului din țesuturi >95% [172, 200]. Conform datelor din literatură, utilizarea HCl urmată de tratarea cu pepsină, a înlăturat eficient ADN-ul, însă a dus la pierderi semnificative de GAG, dar cu păstrarea structurii colagenice intacte [206]. De asemenea, țesutul poate fi considerat decelularizat atunci când cantitatea de ADN <50 ng/mg de țesut, lipsa nucleelor la colorarea cu Hematoxilină-Eozină și cu DAPI, doar că acești parametri au fost stabiliți pe țesuturi moi de tip vas sangvin, piele, valve cardiace, intestin subțire, pericard, etc și nu pe țesuturi dure precum osul și cartilajul [206, 209, 215, 245]. În literatură a fost raportat că TrX comparativ cu SDS a prezentat o pierdere mai mică de GAG la decelularizarea țesuturilor biologice [205, 210], însă în cercetarea efectuată a fost determinat că TrX a spălat GAG din cartilaj mult mai puternic ca SDS, dar totuși, obținerea unor

rezultate foarte bune la testul de viabilitate celulară prin utilizarea condrocitelor a confirmat prezența condițiilor favorabile activității acestora [172]. Totodată testul de populare celulară a demonstrat că atât grefele decelularizate cu SDS, cât și cele decelularizate cu Triton X-100 asigură un nivel înalt de multiplicare celulară la termen de 14 zile, chiar dacă la 7 zile probele erau populate mai abundent cu condrocite decât cu CSM, acestea fiind vizualizate foarte bine la microscopia fluorescentă cu DAPI, dar și la SEM [170].

O constatare neașteptată a fost și viteza diferită de degradare enzimatică a probelor și că aceasta depinde în mod direct de tipul și concentrația surfactantului utilizat. În cazul decelularizării cu Triton X-100, a fost determinat că degradarea enzimatică este cu puțin mai lentă însă apropiată de cea a probelor OCD ($p > 0.1$). Însă probele tratate cu SDS prezintă o durată cu mult mai îndelungată de degradare enzimatică comparativ cu proba martor, ceea ce s-a determinat în special de la 24 ore ($p < 0.01$). Această rezistență la colagenază poate fi explicată prin blocarea porțiunilor C-terminale a moleculelor proteice de către SDS prin legarea unei molecule de calciu [211]. Anume legarea calciului a asigurat probele cu o anumită rezistență față de colagenază.

Incomparabilitatea probelor la determinarea rezistenței mecanice și gradului de umflare al probelor era cauzată cel mai probabil de structura heterogenă a probelor. Acestea fiind constituite din partea osoasă și cartilagenoasă ce au grosime, densitate și porozitate diferite. Cu toate acestea rezistența mecanică fiind cu mult mai redusă comparativ cu țesutul OC normal ($p = 0.001$), valorile căruia sunt de $5120.58 \pm 1701.83 \text{ N/m}^2$ [170].

În urma studiului efectuat *in vitro* pe țesut osteocondral de iepure, am ajuns la concluzia că cea mai indicată greață pentru continuarea testelor *in vivo* pe iepuri, și anume cu scop de a fi combinată cu condrocite și CSM a fost greața din țesutul OC demineralizat ce a fost decelularizată SDS de 1%. Deoarece prezintă cea mai mică valoare medie de conținut al ADN-ului, circa 2.95% (95% ÎI: 0.34-5.55) din conținutul de ADN în țesutul OC normal. Surfactantul utilizat pentru decelularizare spală mai lent GAG din cartilaj și asigură o viteză de degradare enzimatică mai lentă comparativ cu TrX de aceeași concentrație, ceea ce poate asigura substituirea trepatată a grefei cu țesut propriu gazdei [170, 211].

6. TESTAREA *IN VIVO* A GREFELOR COMBinate ÎN REGENERAREA CARTILAJULUI ARTICULAR.

6.1 Introducere

Combinarea grefelor obținute pe cale sintetică sau din structuri biologice cu diverse tipuri de celule pare a fi o modalitate eficientă în regenerarea de organe și țesuturi [166, 212, 216]. În literatură au fost descrise mai multe modalități de regenerare a țesuturilor și organelor prin combinarea matricilor tridimensionale cu diverse celule. Ca exemple de grefe combinate pot servi: membrana amniotică umană ce a fost combinată cu CSM din MO în tratamentul defectelor de piele la iepure [166, 167, 212, 213]; trahei sintetice ce au fost obținute din policaprolactonă prin 3D imprimare combinate cu CSM, condrocite induse din celule stem pluripotente și celulele epiteliale bronșice umane, cu scopul de a obține un organ funcțional [167, 214]. De asemenea, a fost descris procedeul de obținere a vaselor sangvine bifazice din policaprolactonă și colagen tip I ce a fost combinat cu celule musculare netede și celule endoteliale [215], dar și combinarea diferitor structuri tridimensionale monofazice obținute din colagen tip I, tip I/III sau atelocolagen tip I cu CSM sau condrocite pentru restabilirea cartilajului articular [47, 167, 203, 216]. În literatură au fost întâlnite combinații de celule prin utilizarea de structuri hibride, bi- sau trifazice, obținute prin amestecarea colagenului cu chitosan [167, 217, 249], acid hialuronic cu sau fără condroitin sulfat [41, 42, 167, 242], cu fire de mătase [221], sau țesuturi animale procesate prin tehnici de inginerie tisulară [15, 166, 167, 168]. Pe lângă aceasta au mai fost descrise și structuri necolagenice obținute din agaroză [167, 221], alginat de sodiu, gelatină [167, 223], policaprolactonă [138], cu un spectru larg de utilizare în obținerea de grefe ce, de asemenea, pot fi combinate cu CSM sau condrocite pentru regenerarea cartilajului articular [167].

Se cunoaște că majoritatea matricilor tridimensionale ce au fost utilizate în combinație cu celule condroprogenitoare sunt de origine sintetică. Acestea tind să corespundă proprietăților specifice cartilajului pentru a putea fi utilizate în combinație cu CSM sau condrocite [41, 138, 218, 249]. Grefa osteocondrală ce a fost concepută din țesut osteocondral prin demineralizare, decelularizare și perforare longitudinală prezintă un potențial înalt de utilizare în combinație cu CSM sau condrocite în regenerarea cartilajului articular [170, 229], deoarece baza aceluia este constituită din țesutul cu structură bifazică și ierarhică, anume tipul ce necesită a fi regenerat [200]. Capacitatea de penetrare și proliferare a celulelor cu care au fost populate aceste grefe a fost asigurată de gradul înalt de perforare a acestora. De asemenea, lipsa imunogenității a redus posibilitatea unei reacții de rejet a grefelor, iar combinarea acestora cu celule autologe ca condrocitele sau CSM ar putea asigura remodelarea tisulară țintită. Din punct de vedere teoretic în cazul utilizării de CSM remodelarea tisulară ar putea decurge mai bine. Aceasta se datorează

faptului că la cultivarea *in vitro* a CSM pe țesut osos acestea diferențiază în celule osoase, iar la cultivarea pe țesut cartilaginios, CSM diferențiază în condrocite [172].

6.2 Metode

Cerectările experimentale *in vivo* au fost efectuate pe 36 iepuri de casă cu vârsta medie de 4.5 ± 0.5 luni. Animalele au fost repartizate în trei loturi, a câte 12 iepuri în lot după cum urmează:

Lotul I – iepuri tratați cu grefe ODDG combinate cu condrocite, a fost constituit din 4 masculi și 8 femele, cu masa de 3.52 ± 0.42 kg;

Lotul II – iepuri tratați cu grefe ODDG combinate cu CSM, a fost constituit din 7 masculi și 5 femele, cu masa de 3.37 ± 0.57 kg;

Lotul III – martor – iepurii tratați cu grefe osteocondrale autologe, a fost constituit din 7 masculi și 5 femele, cu masa de 3.52 ± 0.62 kg.

Din punct de vedere statistic nu a fost determinată vre-o diferență între variabilele continui ca vârsta, masa corporală și variabila dihotomică genul iepurilor din loturile experimentale create ($p > 0.3$). În cazul în care animalul era exclus din experiment în baza criteriilor prestabilite, acesta a fost înlocuit cu altul. Astfel, cazuri experimentale eșuate ce au fost excluse din experiment au fost 7, dintre care 2 iepuri au suportat fracturi intraoperator a regiunilor meta- și epifizare, iar alți 5 în perioada postoperatorie la intervale de la 3 zile până la 4 săptămâni au murit din motive necunoscute. Din cei decedați în 4 cazuri au fost transplantate grefe combinate cu CSM și într-un caz o grefă combinată cu condrocite

6.2.1 Pregătirea grefelor pentru transplantare

Pentru transplantarea grefelor combinate cu CSM și condrocite, de la iepurii eutanasiați în cadrul experimentului au fost prelevate femurele distale și păstrate la -84°C .



Figura 6.1. Dispozitivul de manufactură cu care au fost secționat circular grefele OCDD:
(a) structura dispozitivului din cuțit circular și troacar, (b) diametrul intern al dispozitivului cu o grefă secționată.

Pentru obținerea grefelor, după înlăturarea țesuturilor moi, femurele prelevate au fost demineralizate în HCl de 0.6 M. Ulterior, cu un cuțit circular de manufactură (figura 6.1) de pe

suprafața portantă a fiecărui condil au fost secționare bucăți de țesut osteocondral cu diametrul de $3.61 \pm 0.1\text{mm}$ și înălțimea de $4.33 \pm 0.11\text{mm}$, în total 31 bucăți de țesut OCD cu volumul mediu de $44.05 \pm 1.15\text{mm}^3$. Bucățile de țesut OCD au fost perforate longitudinal cu un ac de seringă calibrul 23G și degresate cu H_2O_2 de 3% (Eurofarmaco, Republica Moldova) timp de 24 ore și cu alcool de 70% (Eladum Pharma, Republica Moldova) timp de 6 ore pe un agitator cu incubare la 200 rpm. Probele de țesut OCD obținute au fost spălate cu apă distilată prin agitare de 3 ori câte o oră, după care au fost supuse decelularizării cu SDS de 1% pe parcursul a 24 ore tot prin agitare. După decelularizare, grefele OCDD perforate longitudinal au fost spălate repetat cu apă distilată pe parcursul a 3 zile, schimbând apa de 2-3 ori pe zi. Ulterior, grefele au fost introduse în hota cu flux laminar (LN 090, Nuve) unde au fost spălate cu alcool de 70% (Eladum Pharma, Republica Moldova). Sterilizarea grefelor a fost efectuată cu alcool de 70% în hota cu flux laminar timp de 2 ore. Grefele sterilizate au fost spălate cu HBSS (Lonza, Belgia) timp de 24 ore cu schimbarea soluției de 3 ori. Ziua următoare în eprubete sterile de 15 ml au fost introduse câte 2 meșe mici de tifon steril, apoi în fiecare eprubetă, pe meșe a fost plasată câte o grefă. Cu scop de desicare a grefelor, eprubetele au fost centrifugate la 4000 rpm timp de 20 minute (Universal 32R, Hettich Zentrifugen). Eprubetele cu grefe au fost congelate la -84°C (ULUF 450-2M, Arctiko) până la utilizare (figura 6.2).

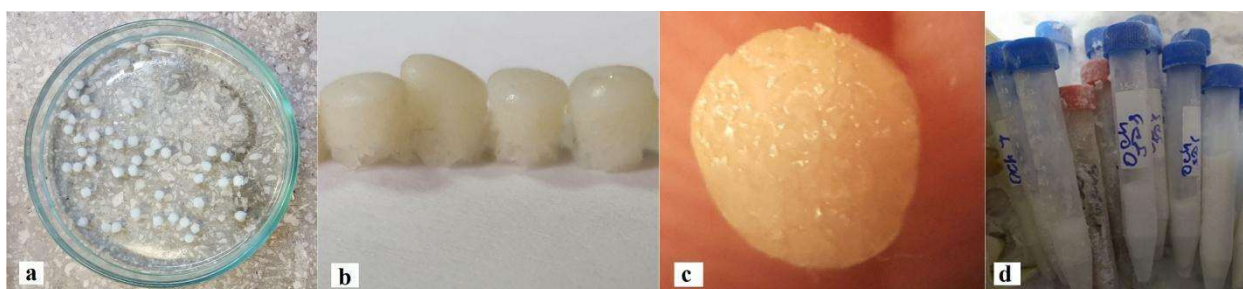


Figura 6.2. Obținerea și păstrarea grefelor OCDD: (a) procesarea grefelor, (b) țesut OCD neperforat, (c) grefă OCDD perforată longitudinal, (d) grefele OCDD conservate la -84°C [170].

6.2.2 Obținerea celulelor cu potențial condroprogenitor și combinarea acestora cu grefe OCDD

Celulele cu potențial condroprogenitor necesare pentru obținerea grefelor combinate au fost obținute conform metodelor expuse în capitolele precedente. Grefele OCDD au fost combinate cu celule autologe – CSM și condrocite [14, 229]. Cu scop de transplantare au fost utilizate doar celulele din primul pasaj. CSM au fost cultivate după modalitate descrisă în capitolul precedent, în flacon de cultură celulară de 25cm^2 utilizând mediul de cultură compus din DMEM/F-12 Ham (Sigma, Marea Britanie), 10% Ser fetal bovin (SFB) (Lonza, Belgia) și 1% soluție antibiotic cu antimicotic. În ziua când CSM și condrocitele au ajuns la o confluență

de 80-90%, grefele OCDD pregătite pentru transplantare au fost decongelate și încălzite până la 37°C în agitator cu incubare (ES-20, Biosan), iar celulele au fost detașate de suprafața de cultură a flaconului utilizând soluție 0.25% tripsină-EDTA. După inactivarea tripsinei cu mediu de cultură celulară specific pentru fiecare tip de celulă în parte, conținutul flacoanelor a fost introdus în eprubete de 15 ml, de unde de fiecare dată s-au prelevat cantități foarte mici de zeci de microlitri de suspensie celulară pentru a determina numărul celulelor și viabilitatea acestora prin excludere cu soluție de 0.4% albastru de tripan în hemocitometru, iar eprubetele între timp au fost puse la centrifugare la 1000 rpm timp de 10 minute la temperatura camerei (Universal 32R, Hettich Zentrifugen).

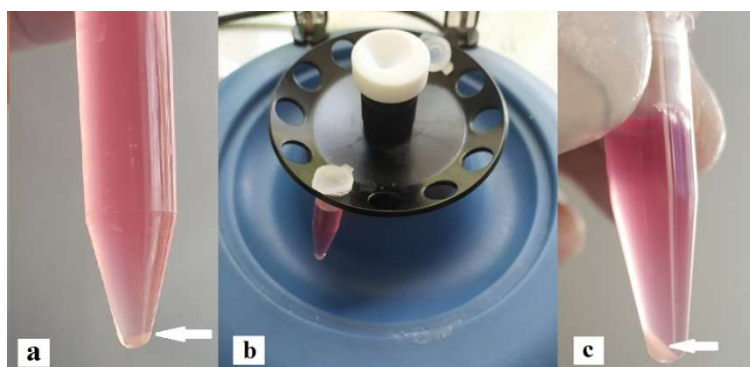


Figura 6.3. Pregătirea celulelor pentru popularea grefelor OCDD: (a) peleții de celule în eprubetă de 15 ml după prima centrifugare, (b) centrifugarea în microcentrifugă a tubului Eppendorf și (c) sedimentarea celulelor la fundul tubului Eppendorf, celulele sunt indicate cu săgeată albă [167].

După centrifugare, mediul de nutriție cu tripsina inactivată a fost decantat, iar în eprubete s-a turnat câte 1 ml mediu de nutriție specific tipului de celule. Suspensia celulară după pipetare a fost transferată în tuburi Eppendorf de 1.5 ml, ce au fost centrifugate la 3500 rpm timp de 3 minute (Combi-Spin FVL-2400N, Boeco) (figura 6.3). Ulterior, mediul din tuburi a fost extras parțial, lăsând un volum de 50-60 μ l pe fund. Eprubete de 15 ml cu grefele OCDD și dispozitivul pentru fixarea și celularizarea grefelor de dimensiuni mici (DFCGDM) sterile [14, 166, 167, 229, 248] au fost introduse în hota cu flux laminar de aer (LN 090, Nuve). Dispozitivul pentru fixarea grefelor a fost elaborat cu scop de a celulariza grefele mici prin metoda gravitațională, iar utilizarea acestuia a fost descrisă în lucrările anterioare [14, 167, 229]. Dispozitivul a fost introdus într-un stativ, iar capacul înlăturat. Grefa cu o pincetă a fost extrasă din eprubetă și introdusă în containerul dispozitivului de fixare [14, 244, 248]. Cu o micropipetă (LightDrop 10-100 μ l, ThermoFisher) au fost pipetate celulele din tubul Eppendorf în cele 50-60 μ l restante, după care suspensia celulară a fost transferată pe grefa OCDD amplasată în containerul

DFCGDM [229]. Apoi, după aplicarea capacului pe dispozitiv, acesta a fost introdus într-o eprubetă de 15 ml (figura 6.4).

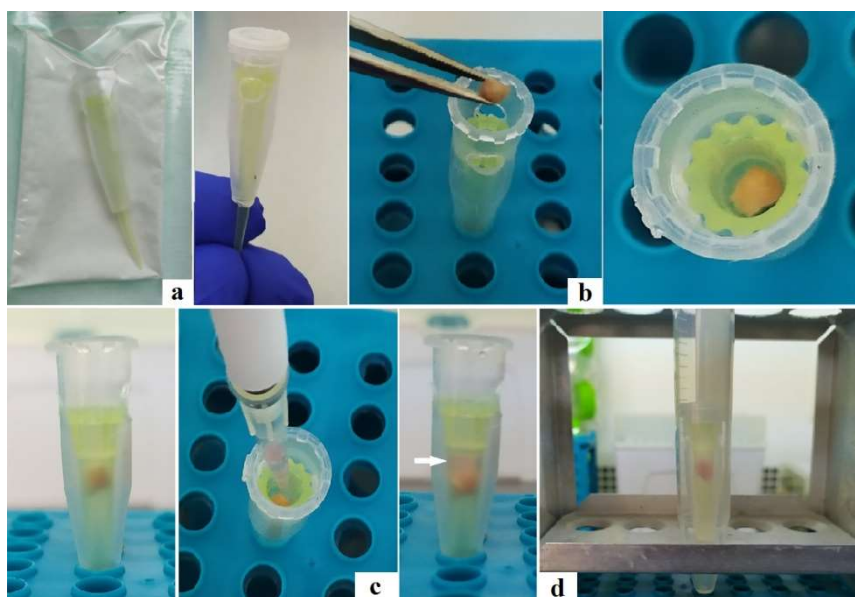


Figura 6.4. Procesul de populare a grefelor OCDD cu celule: (a) DFCGDM steril, (b) introducerea grefei OCDD în suportul dispozitivului, (c) transferul celulelor pe grefă, cu săgeată albă este indicat nivelul suspensiei celulare situate deasupra grefei, (d) introducerea DFCGDM într-o eprubetă de 15 ml [14].

Eprubeta cu capacul întredeschis a fost introdusă într-un stativ ce a fost plasat în incubator la 37°C, 5% CO₂ (SmartCell, HealForce). După transplantarea grefelor combinate, cu scop de a determina câte celule au fost în realitate transplantate, eprubetele de 15 ml, tuburile Eppendorf și containerile DFCGDM au fost spălate cu mediu de nutriție specific tipului de celule. Apoi, celulele au fost numărate în hemocitometru prin excluderea celor moarte cu soluția de 0.4% albastru de tripan [14, 167]. Calculele au fost efectuate conform formulelor prezentate în continuare (14, 15, 16, 17, 18):

$$N_{ics} = M_{cn_p} \times F_d \times 10^4 \times V \quad (14);$$

$$C_{sv} = M_{cvn_p} \times F_d \times 10^4 \times V \quad (15);$$

$$T_{ct} = N_{tcc} - N_{ics} \quad (16);$$

$$Q_{ct}\% = (T_{ct} \times 100\%) / N_{cc} \quad (17);$$

$$V_{ct}\% = C_{sv} / N_{ics} \times 100\% \quad (18);$$

N_{ics} – Număr total de celule spălate; C_{sv} – Celule spălate vii; T_{ct} – Total celule transplantate; $Q_{ct}\%$ – Rata de celule transplantate; $V_{ct}\%$ – Rata de viabilitate a celulelor transplantate; M_{cn_p} – Media celulelor în n patrate; M_{cvn_p} – Media celulelor vii în n patrate; N_{tcc} – Numărul total de celule cultivate; F_d – Frația de diluție; V – Volum.

6.2.3 Transplantarea grefelor combinate în defectele critice experimentale

După finisarea etapei de pregătire a grefelor combinate cu celule cu potențial condroprogenitor a fost realizată pregătirea animalelor experimentale pentru efectuarea transplantării acestora. Astfel, în ziua intervenției chirurgicale toți iepurii au fost pe nemâncate cântăriți și aneșteziați. A fost pregătit câmpul operator la nivelul articulației unui genunchi, apoi prin abord parapatelar medial a fost efectuată o incizie de aproximativ 4-5 cm, după care a fost deschisă articulația genunchiului. După hemostază patela a fost luxată lateral, iar genunchiul maximal flectat. Apoi, pe suprafața portantă a condilului femural medial, consecutiv, cu burghie de diametrul 1.5, 2, 3, 3.5 și 3.7 mm au fost efectuate cu precauție, la turații mici, fără a deschide canalul medular, câte un defect critic de 3.7 mm în diametru și 4-4.5 mm adâncime [7, 16].

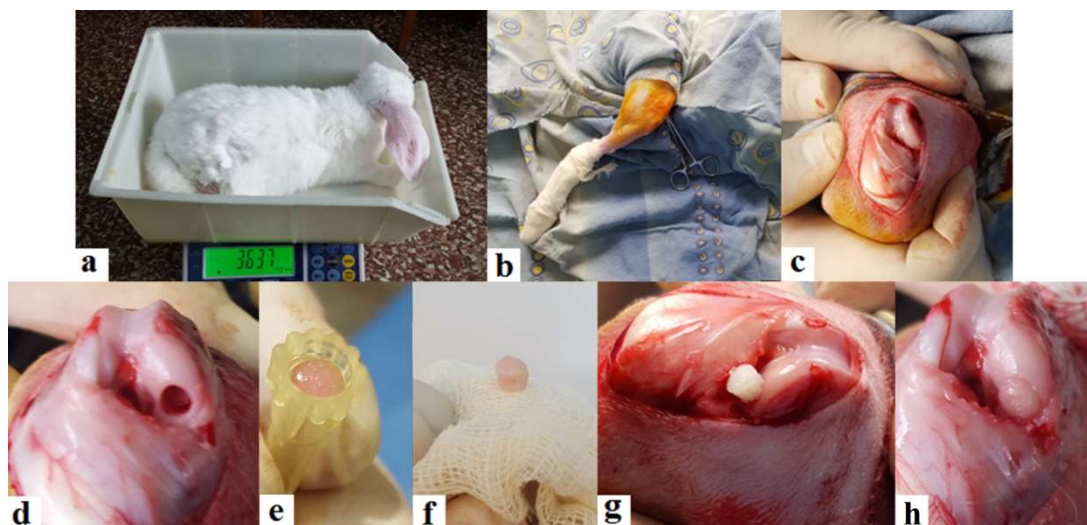


Figura 6.5. Transplantarea grefelor OCDD combinate cu CSM sau condrocite autologe, (a) cântărirea animalelor și anestezia generală, (b) pregătirea câmpului operator, (c) artrotomie parapatelară medială cu luxarea laterală a patelei, (d) crearea defectului experimental, (e, f) grefa combinată cu celule autologe și (g, h) implantarea grefei în defectul experimental [167].

Grefele combinate au fost scoase din incubator și aduse în sala de operație, unde containerile cu grefele combinate cu CSM sau condrocite au fost puse pe masa de operație respectând toate normele de antisepsie. Suporturile cu grefe combinate au fost, apoi, secționare la bază cu o foarfecă, iar grefele cu precauție au fost împinse în defecte cu o broșă, fără a le deteriora sau stoarce de celulele. Toate grefele au fost transplantate cu partea sa cartilaginoasă orientată în sus (figura 6.5). După implantarea grefelor, genunchiul a fost poziționat în extensie și redusă luxația de patelă. Apoi, menținând genunchiul în extensie a fost suturată plaga și aplicat pansament cu soluție de 10% povidon-iod (EGIS, Ungaria). De asemenea, cu genunchiul în extensie, de partea laterală a membrului inferior operat, a fost aplicată o scândurică subțire, mai

lată ca membrul inferior și lungimea corespunzătoare cu distanța de la șold până la gleznă, care a fost fixată de membrul operat cu bandaj gipsat, lăsând o fereastră la nivelul plăgii postoperatorii pentru pansamente [166]. Gipsul a fost aplicat cu precauție pentru a nu compresa țesuturile moi ale membrului operat, doar cu scopul ca să mențină genunchiul în extensie (figura 6.7).

6.2.4 Transferul de țesut osteocondral autolog.

Metoda de tratare a defectelor critice experimentale prin transfer de țesut autolog a fost selectată ca metodă de tratare a defectelor cartilajinoase în lotul martor, deoarece este o tehnică de regenerare a țesutului cartilajinos care utilizează țesuturile proprii în procesul de tratament [32, 38, 39, 113, 115, 131, 254]. Grupul de iepuri (n=12) la care a avut loc transplantarea de țesut osteocondral autolog la cercetările *in vivo* au fost pregătiți pentru intervenția chirurgicală la fel ca și cei din loturile experimentale. După artrotomie, luxarea laterală a patelui și flectarea genunchiului, cu un bisturiu a fost înlăturat cartilajul pe o suprafață cu diametrul de 3.5-3.7 mm de la nivelul suprafeții portante a condilului femural medial [166, 167, 254], la același nivel unde au fost implantate grefele combinate.

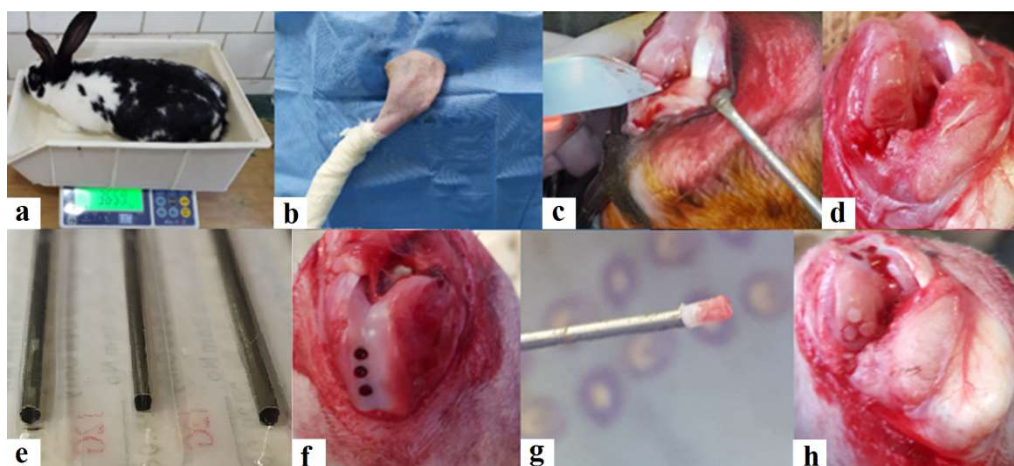


Figura 6.6. Transplantarea de țesut osteocondral autolog, (a, b) anestezia animalului și pregătirea câmpului operator, (c, d) crearea defectului de cartilaj, (e, f, g) prelevarea de grefe osteocondrale autologe de pe suprafața neportantă a suprafeței articulare femurale și transplantarea lor [167].

În defectul experimental de cartilaj, cu burghie de diametru mic, au fost efectuate câte 3 găuri de 1.7 mm în diametru, amplasate sub formă de triunghi, cu o adâncime de 4-4.5 mm [167]. Cu o un ac pentru piercing de calibru 12 G, cu diametrul intern de 1.7 mm, atașat la un aparat de găurit, cu rotații lente pentru a evita supraîncălzirea țesutului, din șanțul trohlear au fost prelevate bucăți de țesut osteocondral autolog [167, 254], care au fost implantate în defectele proaspăt create la aceeași înălțime sau cu până la 1 mm mai sus față de cartilajul articular adiacent normal (figura 6.6). După reducerea luxației de patelă, ținând genunchiul în extensie a

fost suturată plaga, aplicat pansament aseptice, iar mai apoi și imobilizare gipsată fără a compresa țesuturile moi (figura 6.7).



Figura 6.7. Imobilizarea postoperatorie a genunchiului operat la iepuri.

6.2.5 Îngrijiri postoperatorii

Imobilizarea gipsată a genunchiului operat a fost înlăturată la 10 zile, postoperator, iar iepurilor a fost injectată intramuscular sol. cefazolină 25 mg/kg pe o perioadă de 2-3 zile, după caz. Cu scop de analgezie, a doua zi după transplantare iepurilor au fost injectate în priză unică soluțiile xylla 3mg/kg și ketamină 10 mg/kg, în caz de necesitate dozele au fost repetate încă 2 - 3 zile. Pansamentele au fost efectuate o dată la 1-2 zile, cu monitorizarea stării generale a animalelor. Toate animalele au fost întreținute în curățenie, au fost hrănite și adăpate zilnic. Starea animalelor operate și decurgerea perioadelor postoperatorii au fost înregistrate în fișele de monitorizare a fiecărui animal. Suturele au fost înlăturate la 12-13 zile postoperator.

6.2.6 Evaluarea rezultatelor testelor in vivo pe iepuri

Iepurii operați au fost scoși din experiment prin eutanasiere în camera cu CO₂ la termen de 6 săptămâni câte 3 animale din fiecare lot și la 12 săptămâni cei 9 rămași în fiecare lot. Imediat după scoaterea din experiment au fost colectate femurele distale, de pe care au fost înlăturate toate țesuturile moi și introduse în formaldehidă buferizată de 10%, pH= 7.4. După fotografierea macropreparatelor, acestea au fost secționare pentru examenul microscopic, apoi supuse decalcifierii, încorporate în parafină, secționare cu microtomul la grosimea de 5 μm și aplicate pe lamele. Preparatele histologice au fost colorate cu Hematoxilină-Eozină, Safranin O și Albastru de Toluidină cu Fast Green și examinate de către medicul morfopatolog. Evaluarea obiectivă a rezultatelor a fost efectuată conform Scorului histologic unificat al cartilajului regenerat (SHUCR), care a fost alcătuit prin combinarea a 3 scoruri larg utilizate în evaluarea cartilajului regenerat la animale de laborator. Autorii ai acestor scoruri erau Sellers și coaut. (1997) [33, 167], Wakitani și coaut. (1994) [7, 34, 166] și O'Driscoll și coaut. (1986) [69, 78, 180]. Fiecare din scorurile propuse conține majoritatea criteriilor de evaluare histologică similare.

Acestea evaluează morfologia generală a țesutului examinat și fac diferență între cartilaj hialin, fibrocartilaj și țesut fibros [166], gradul de umplere sau grosimea cartilajului regenerat, prezența leziunilor în acesta, gradul de metacromazie a matricii țesutului regenerat și gradul de integrare a țesutului regenerat cu cel sănătos [167]. De asemenea, fiecare scor mai conține și criterii individuale, specifice, ca nivelul de celularizare în scorul O'Driscoll [33] sau paternul celular din țesutul regenerat în scorul Wakitani [7, 34], dar și formarea de clustere condrocitare în scorurile Sellers și O'Driscoll [69]. Este de menționat că, scorul Sellers mai include așa criterii ca evaluarea stării osului subcondral și formarea liniei de demarcare între cartilajul normal și cel calcificat din unitatea osteocondrală reparată, ceea ce este de o mare importanță, deoarece în procesul de testare *in vivo* a grefelor combinate pentru regenerarea cartilajului articular a fost implicat și osul subcondral [166, 167].

SHUCR este reprezentat în Anexa 1, acesta constă din evaluarea a 13 criterii [166, 167, 254]. Fiecărui criteriu îi este atribuită o scară personală, iar fiecare valoare numerică din acest scor are caracteristica sa specifică. Valoarea sumară maximală a tuturor criteriilor este de 43 puncte, iar cea minimală – 0 puncte. Rezultatul evaluării calității țesutului regenerat depinde de punctajul acumulat, cu cât calitatea țesutului regenerat este mai înaltă cu atât punctajul va fi mai mic și invers, cu cât punctajul obținut va fi mai mare cu atât calitatea țesutului regenerat va fi mai joasă [166, 254].

6.3 Rezultate

Cu scop de a combina grefele OCDD cu celule cu potențial condroprogenitor au fost izolate din cartilaj articular hialin $1.8 \times 10^5 \pm 5.4 \times 10^4$ condrocite cu o viabilitate de 96.79% (95% ÎI:93.02-100.54), din care în primul pasaj după 10 ± 3 zile de cultivare au fost obținute $2.94 \times 10^6 \pm 3.77 \times 10^5$ condrocite cu o viabilitate de 99.89% (95% ÎI:99.64-100.13). De asemenea, din 4 ± 1.2 ml de măduvă osoasă după 11 ± 3 zile de cultivare au fost obținute $1.55 \times 10^6 \pm 3.76 \times 10^5$ CSM cu o viabilitate de 98.03% (95% ÎI:95.35-100.71). Nu a fost determinată nici o diferență statistic semnificativă între grupe în ce privește durata de cultivare celulară ($p > 0.3$) și viabilitatea celulelor ($p > 0.1$).

Tabelul 6.1. **Diferența dintre numărul de celule obținute în cultura primară și a celor transplantate cu grefe din cadrul loturilor experimentale.**

	Număr total de celule obținut $X \pm DS$	Număr real de celule transplantat $X \pm DS$	p
Condrocite	$2.94 \times 10^6 \pm 3.77 \times 10^5$	$2.54 \times 10^6 \pm 2.73 \times 10^5$	$p < 0.001$
CSM	$1.55 \times 10^6 \pm 3.76 \times 10^5$	$1.37 \times 10^6 \pm 3.57 \times 10^5$	$p < 0.001$

După transplantarea grefelor combinate, ca urmare a spălării tuburilor Eppendorf, eprubetelor de 15 ml în care au fost centrifugate celulele, dar și a suportului DFCGDM, a fost

determinat numărul real de celule transplantate. Astfel, numărul real de condrocite transplantate a fost de $2.54 \times 10^6 \pm 2.73 \times 10^5$ celule cu o viabilitate de 87.59% (95% ÎÎ:84.51-90.67), ceea ce reprezintă 86.97% (95% ÎÎ:84.09-89.84) din totalul condrocitelor obținute prin cultivare. De asemenea, numărul real de CSM transplantate a fost de $1.37 \times 10^6 \pm 3.57 \times 10^5$ celule, cu o viabilitate de 90.91% (95% ÎÎ:88.95-92.85), ce reprezintă 88.32% (95% ÎÎ:86.45-90.17) din totalul de CSM obținute. Aceasta fiind în ambele cazuri o diferență statistic semnificativă comparativ cu numărul inițial de celule obținute din primul pasaj ($p < 0.001$).

Tabelul 6.2. Diferența între viabilitatea celulelor obținute în cultura primară și a celor transplantate cu grefe din cadrul loturilor experimentale.

	Viabilitatea celulelor la detașare	95% ÎÎ:	Viabilitatea celulelor la transplantare	95% ÎÎ:	p
Condrocite	99.89%	99.64-100.13	87.59%	84.51-90.67	$p < 0.001$
CSM	98.03%	95.35-100.71	90.91%	88.95-92.85	$p = 0.001$

Așadar, a fost determinat că viabilitatea totală a celulelor la momentul transplantării a fost în mediu de 89.25% (95% ÎÎ:87.42-91.07), ceea ce reprezintă o diferență semnificativă dacă comparăm cu viabilitatea celulară imediat după detașarea celulelor în cultura primară ($p < 0.05$), însă fără diferență semnificativă între ratele de celule viabile transplantate pe grupe ($p > 0.5$). De asemenea, nu există diferență statistic semnificativă între durată perioadelor de la detașarea celulelor și până la transplantarea acestora în cadrul grupelor experimentale ($p > 0.5$). Astfel, în cazul grefelor combinate cu condrocite această perioadă a fost de 73 ± 12 minute, iar în cazul grefelor combinate cu CSM aceasta a fost de 69 ± 14 minute. Diferența între cantitatea de celule obținute și cele transplantate, dar și viabilitatea lor este prezentată în tabelele 6.1 și 6.2.

Ca urmare a utilizării dispozitivului de fixare și celularizare a grefelor de dimensiuni mici rata totală de celule transplantate a fost de 87.64% (95% ÎÎ:86.04-89.24), ce reprezintă un rezultat foarte bun.

Tabelul 6.3. Repartizarea complicațiilor survenite în perioada postoperatorie pe grupe.

	Edem plantă	Redoare articulară	Infectare țesuturi moi	Hematom postoperator	Reaplicare imobilizare
Grefe combinate cu condrocite (n=12)	8	10	-	-	2
Grefe combinate cu CSM (n=12)	10	5	1	1	2
Martor (n=12)	7	5	1	-	2
<i>ANOVA</i>	$p = 0.422$	$p = 0.061$	$p = 0.611$	$p = 0.379$	$p = 1$

În perioada postoperatorie la animalele din grupele experimentale au fost depistate așa complicații ca apariția edemului plantar în 25 cazuri, redori articulare de diferit grad fără

periclitarea severă a funcției articulare în 20 cazuri, infectarea țesuturilor moi în 2 cazuri și hematoame postoperatorii - 1 caz. De asemenea, a fost nevoie de reaplicat imobilizarea gipsată în 6 cazuri. Ca urmare a analizei complicațiilor pe loturi experimentale, nu a fost determinată vre-o asociere între variabile în dependență de lotul experimental ($p > 0.05$). În tabelul 6.3 este prezentată repartizarea complicațiilor apărute pe grupe. De asemenea, nu există nici asociere între edemul apărut la nivelul plantei cu redoarea articulară și necesitatea de reaplicare a imobilizării gipsate ($p > 0.9$).

Animalele scoase din experiment la 6 săptămâni, conform SHUCR în toate cazurile aveau un scor histologic aproape similar. În cazul primei evaluări lotul martor a obținut un scor de 26.33 ± 1.53 puncte, lotul tratat cu grefe OCDD combinate cu condrocite a primit 28.33 ± 1.53 puncte ($p > 0.1$) și lotul tratat cu grefe combinate cu CSM a primit 27.67 ± 2.08 puncte ($p > 0.2$). În cazul celei de-a doua evaluări lotul martor a obținut 28 ± 1 puncte, lotul tratat cu grefe OCDD combinate cu condrocite a obținut 30 ± 3.61 puncte ($p > 0.4$) și lotul tratat cu grefe combinate cu CSM a obținut 28 ± 2.65 puncte ($p = 1$). Ca urmare, nu a fost determinată vre-o diferență statistic semnificativă între lotul martor și loturile experimentale (figura 6.8).

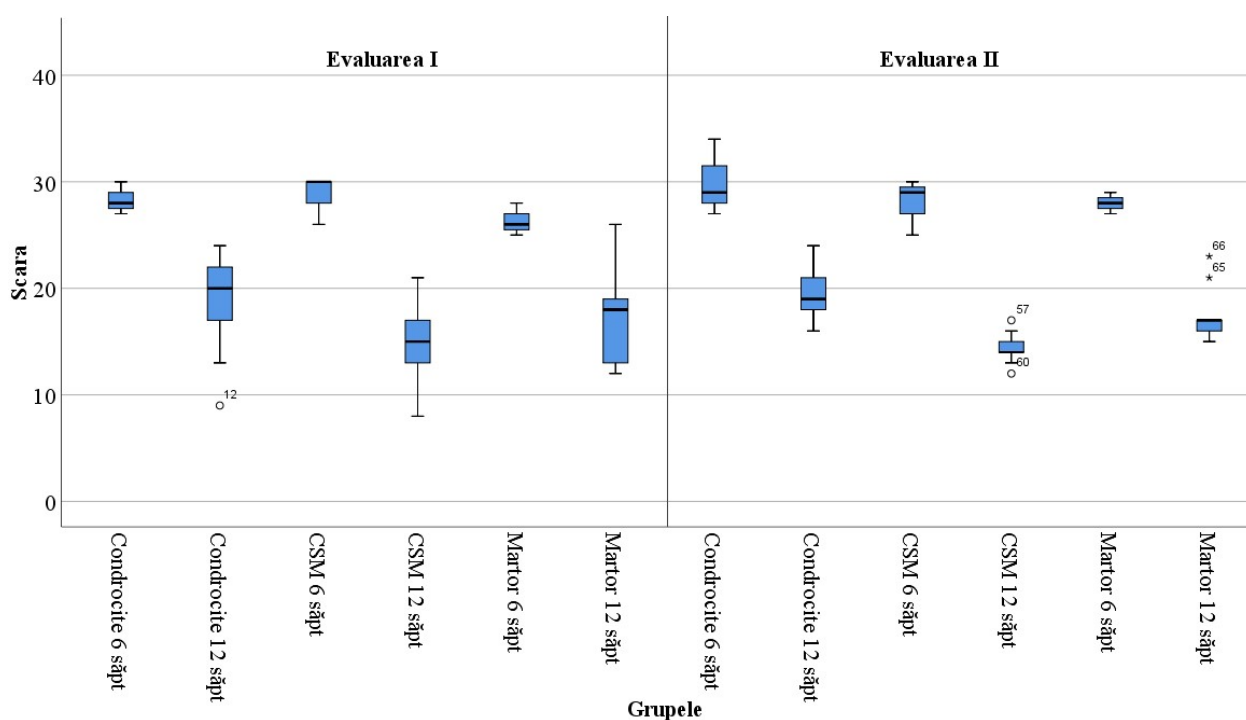


Figura 6.8. **Reprezentarea grafică a ambelor evaluări, a loturilor experimentale și martor, la 6 și 12 săptămâni postoperator.**

La analiza rezultatelor utilizând SHUCR la animalele scoase din experiment la termen de 12 săptămâni, la prima evaluare a lotului martor a fost obținut un scor de 17.22 ± 4.84 puncte, pentru lotul tratat cu grefe OCDD combinate cu condrocite 18.68 ± 5 puncte ($p > 0.5$) și pentru cel

tratată cu CSM au fost obținute 14.89 ± 3.76 puncte ($p > 0.2$). În cazul celei de-a doua evaluări lotul martor a obținut un scor de 17.67 ± 2.60 puncte, cel tratat cu grefe combinate cu condrocite a obținut 19.22 ± 2.44 puncte ($p > 0.2$) și lotul tratat cu grefe combinate cu CSM a obținut un scor de 14.33 ± 1.5 puncte ($p = 0.004$). Drept urmare, în cazul primei evaluări nu a fost determinată vre-o diferență statistic semnificativă între lotul martor și cele experimentale, pe când la a doua evaluare a fost obținută o diferență semnificativă între lotul martor și lotul tratat cu grefe OCDD combinate cu CSM (figura 6.8), necâtând la faptul că între rezultatele ambelor evaluări ale defectelor tratate cu grefe OCDD și CSM diferență semnificativă nu este ($p = 0.745$).

Tabelul 6.4. Compararea statistică a scorurilor parametrilor de evaluare din cadrul SHUCR efectuate independent de 2 experți (p).

	Condrocite 6 săpt.	Condrocite 12 săpt.	CSM 6 săpt.	CSM 12 săpt.	Martor 6 săpt.	Martor 12 săpt.
Paternalul celular în cartilajul regenerat	p = 0.047	p = 0.035	p = 0.643	p = 0.02	p = 1	p = 0.001
Morfologia celulară	p = 1	p = 0.866	p = 0.374	p = 0.646	p = 0.435	p = 0.779
Formarea de clustere condrocitare	p = 0.23	p = 0.012	p = 0.116	p = 0.006	p = 0.007	p = 0.036
Nivelul de celularizare	p = 0.643	p = 0.434	p = 1*	p = 0.265	p = 0.725	p = 1
Metacromazia matriciei	p = 1	p = 0.17	p = 0.116	p = 0.409	p = 0.643	p = 0.138
Suprafața articulară	p = 0.374	p = 0.284	p = 0.643	p = 0.724	p = 0.016	p = 0.035
Integrarea grefei cu cartilajul articular din jur	p = 0.643	p = 0.791	p = 0.678	p = 0.509	p = 0.013	p = 0.089
Arhitectura întregului defect fără includerea marginelor	p = 0.374	p = 0.297	p = 0.251	p = 0.006	p = 0.422	p = 0.345
Grosimea cartilajului nou format	p = 0.519	p = 0.284	p = 1*	p = 0.372	p = 0.519	p = 1
Prezența modificărilor degenerative ale cartilajului adiacent	p = 0.678	p = 0.332	p = 0.678	p = 0.587	p = 0.158	p = 0.764
Umplerea defectului în raport cu suprafața cartilajului adiacent normal	p = 1	p = 0.128	p = 0.519	p = 1	p = 0.519	p = 1
Formarea liniei de demarcare	p = 0.251	p = 0.016	p = 0.519	p < 0.001	p = 0.016	p < 0.001
Procentul noului os subcondral restabilit	p = 0.422	p = 0.176	p = 0.519	p = 0.806	p = 0.116	p = 0.15
Sumar	p = 0.502	p = 0.768	p = 0.759	p = 0.745	p = 0.189	p = 0.811

*testul nonparametric Kolmogorov–Smirnov par

Evaluarea independentă a rezultatelor histologice de către 2 experți conform parametrilor scorului alcătuit, a pus în evidență momente de divergență între sumarul scorurilor atribuite unor parametri în care diferența între variabilele obținute era semnificativă ($p < 0.05$) (figura 6.8). Divergențe în evaluarea scorurilor sunt prezente atât în grupele experimentale, cât și în lotul martor. Astfel de divergențe sunt legate de atribuirea paternalului celular al cartilajului regenerat, determinarea prezenței de clustere condrocitare și formarea liniei de demarcație. De asemenea, divergențe au fost la determinarea leziunilor prezente la nivelul cartilajului articular regenerat (p

=0.016 și $p = 0.035$), evaluarea integrării grefei cu cartilajul din jur ($p = 0.013$) și în cazul evaluării restabilirii arhitecturii întregului defect fără includerea marginelor ($p = 0.006$). Necătând la divergențele apărute între experții ce au evaluat rezultatele histologice conform SHUCR, nu a fost determinat nici o diferență semnificativă între totalurile rezultatelor obținute în toate loturile atât la termen de 6 săptămâni, cât și 12 săptămâni ($p > 0.18$). Evaluarea rezultatelor obținute de ambii experți în dependență de parametrii utilizați este prezentată în tabelul 6.4. La compararea rezultatelor obținute în cadrul aceluiași lot la animalele ce au fost scoase din experiment la termen de 6 și 12 săptămâni, a fost determinată o diferență semnificativă între rezultatele obținute ($p < 0.05$). Rezultate mult mai bune fiind prezente în cazul animalelor scoase din experiment mai târziu, tabelul 6.5.

Tabelul 6.5. **Compararea scorurilor obținute pe grupe în dependență de termenul de evaluare a defectului regenerat.**

Grupuri experimentale	Evaluare I $X \pm DS$		P	Evaluare II $X \pm DS$		P
	6 săptămâni (n=3)	12 săptămâni (n=9)		6 săptămâni (n=3)	12 săptămâni (n=9)	
Grefe OCDD combinate cu condrocite	28.33 \pm 1.53	18.67 \pm 5	$p = 0.009$	30 \pm 3.61	19.22 \pm 2.44	$p < 0.001$
Grefe OCDD combinate cu CSM	28.67 \pm 2.03	14.78 \pm 3.73	$p < 0.001$	28 \pm 2.65	14.33 \pm 1.5	$p < 0.001$
Transplantarea de țesut OC autolog	26.33 \pm 1.53	17.22 \pm 4.84	$p = 0.011$	28 \pm 1	17.67 \pm 2.60	$p < 0.001$

De asemenea, a fost evaluat gradul de asociere între numărul de celule real transplantate și calitatea regenerării cartilajului articular. A fost determinat că numărul de condrocite sau CSM utilizate în combinație cu grefa OCDD nu a influențat calitatea de regenerare a țesutului cartilajinos ($p > 0.1$).

6.3.1 Examenul histologic

Descrierea morfologică a secțiunilor executate din condilii femurale mediali de iepure în care au fost transplantate grefe OCDD combinate cu condrocite și respectiv CSM, ca loturi experimentale și țesut osteocondral autolog în lotul martor, este prezentată în continuare. Cu scop de a evidenția anumite structuri și evenimente, acestea au fost marcate după cum urmează.

Legendă:

- ★ - indică prezența celulelor fibroblast-like;
- ★ - indică prezența de clustere condrocitare;
- ★ - indică prezența condrocitelor tinere sau mature, solitare sau grupate în grupuri izogene;

✱ - indică prezența zonelor de necroză a cartilajului;

▼ - indică linia de demarcație;

▽ - indică prezența defectelor integrității cartilajului articular de tipul fisurilor, microfisurilor, rupturilor și chisturilor;

∇ - indică prezența zonelor cu fibre de colagen de țesut fibros sau fibrocartilagos;

▽ - indică prezența semnelor de remodelare a țesutului osos;

▲ - indică prezența de osteo- și/sau condroliză.

6.3.2 Examenul morfologic al defectelor tratate cu grefe OCDD combinate cu condrocite

La studierea piesei histologice la termen de 6 săptămâni de la transplantarea grefei OCDD combinate cu condrocite (figura 6.9) a fost determinată umplerea completă a zonei defectului, însă fără umplerea acestuia în raport cu suprafața cartilajului adiacent normal, iar înălțimea cartilajului regenerat a fost aparent redusă comparativ cu cel normal. La evaluarea histologică a calității și tipului cartilajului articular nou-format o fost observat că defectul a fost predominant umplut cu fibrocartilaj. Cartilajul nou-format a fost caracterizat printr-o celularitate moderată și distribuție neuniformă a celulelor. Au fost evidențiate 2 tipuri de populații celulare. Primul tip sunt condrocitele ce erau situate în zonele profunde ale neocartilajului, în număr mic dispuse în grupuri izogene, alocuri aceste celule prezentau semne de hipertrofie cu păstrarea integrității celulare. Al doilea tip de celule, în număr mult mai mare, amplasate în straturile superficiale a fost reprezentat de celulele fibroblast-like, ce erau caracterizate prin nucleu aplatizat, citoplasmă redusă, înconjurată de o matrice predominant fibroasă. Clusterelor condrocitare au fost determinate preponderent la hotarul dintre cartilajul normal și neocartilaj. Componenta matriceală a neocartilajului a fost reprezentată atât de fibre, cât și de componenta proteoglicanică. Distribuția celor două componente matriceale în cadrul cartilajului a fost neomogenă. Cantitatea matriceală de proteoglicani era marcant redusă, concentrația cea mai ridicată fiind în zonele profunde în apropierea condrocitelor și clusterelor. Componenta colagenică a fost evidențiată în cantitate mare în jumătatea superficială a cartilajului. Fibrele de colagen erau mult subțiate și intens fragmentate. De asemenea, în cavitatea articulară uneori s-a observat prezența unor mase fibrotice cu celule fibroblast-like de dimensiuni mari, intens fisurate (Figura 6.10). De asemenea, suprafața cartilajului regenerat era sever fisurată, cu rupturi și fibrilații, iar în ariile de contact cu cartilajul normal al gazdei a fost observată deseori lipsa de continuitate a cartilajului cu prezența de lacune, fisuri adânci ce implică și osul subcondral. Linia de demarcare lipsește sau iese slab în evidență.

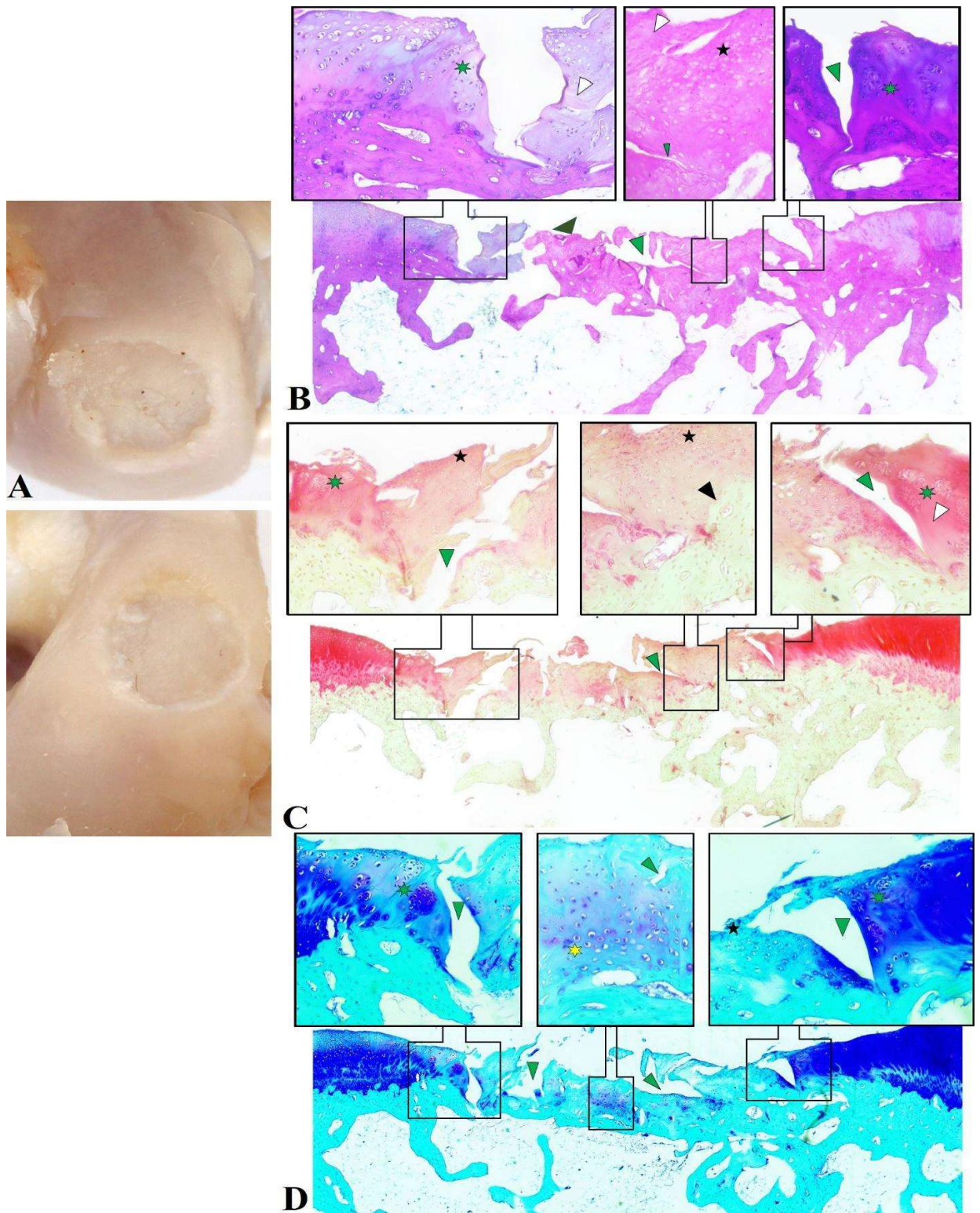


Figura 6.9. Rezultatele studierii piesei histologice, grefă OCDD combinată cu condrocite la termen de 6 săptămâni. Imagini realizate cu microscop Optika, IM-3F la amplificarea x40, x100 și x200. Aspectul macroscopic al defectului regenerat la nivelul condililor mediali (A) și aspectul microscopic la colorarea cu Hematoxilină-Eozină (B), Safranin O (C) și Albastru de Toluidină cu Fast Green (D).

La studierea piesei histologice la termen de 12 săptămâni de la transplantarea grefei OCDD combinate cu condrocite (figura 6.11) a fost determinată umplerea completă a zonei defectului. De asemenea, umplerea defectului în raport cu înălțimea suprafeței cartilajului adiacent normal era uniformă, iar înălțimea cartilajului regenerat fiind puțin mai redusă comparativ cu cea a cartilajului adiacent normal al gazdei. Evaluând histologic calitatea și tipul cartilajului articular nou-format, s-a observat că defectul a fost predominant umplut cu cartilaj de tip hialin. Țesutul nou-format a fost caracterizat prin prezența de zone cu hipercelularitate, un grad de celularitate normal sau zone cu o hipocelularitate ușoară, celulele având distribuție neuniformă. Preponderent au fost depistate celule de tip condrocite cu structură normală, dar și condrocite hipertrofiate. Condrocitele erau solitare sau organizate în grupuri izogene a câte 2-3 condrocite per grup.

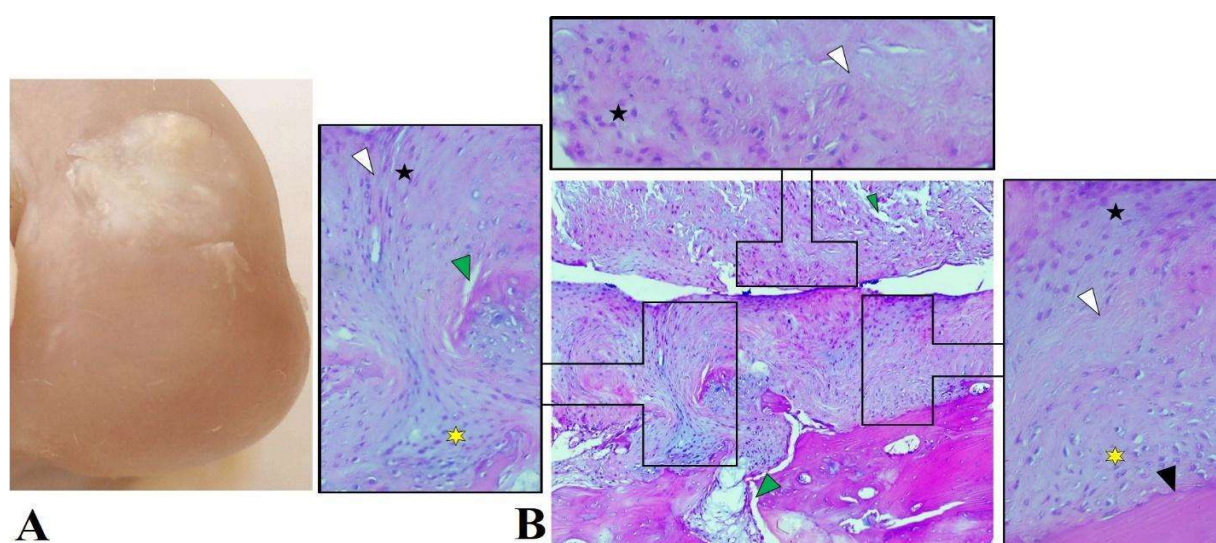


Figura 6.10. Rezultatul studierii piesei histologice, grefă OCDD combinată cu condrocite la termen de 6 săptămâni. Aspectul macroscopic al defectului regenerat la nivelul condililor mediali (A) și aspectul microscopic la colorarea cu Hematoxină-Eozină (B), amplificarea x40, x100 și x200.

Clustere condrocitare au fost determinate în majoritatea cazurilor la hotarul dintre cartilajul normal și neocartilaj, dar și în straturile profunde ale neocartilajului, ce erau delimitate de mase de matrice fibroasă. Distribuția PG și fibrelor de collagen în cadrul cartilajului regenerat a fost aproape omogenă. Cantitatea matriceală de proteoglicani era ușor sau moderat redusă. Fibrele de collagen au avut un caracter crescut de destrămare, iar în zonele cu hipercelularitate matricea era intens fibroasă cu o cantitate redusă de PG. Suprafața cartilajului regenerat era neomogenă, aparent netedă, cu fisuri fine, unice. A fost observată cel mai des o integritate și continuitate normală cu cartilajul gazdei cu divers grad de hipocelularitate, clustere celulare și hipocromazie. Linia de demarcare a fost slab evidențiată sau absentă. În osul subcondral au fost observate

insule metacromatice de dimensiuni mici cu condrocite hipertrofe, și zone de resorbție și osificare. Osul subcondral era în proces de remodelare.

6.3.3 Examenul morfologic al defectelor tratate cu grefe OCDD combinate cu CSM

La studierea piesei histologice la termen de 6 săptămâni de la transplantarea grefei OCDD combinate cu CSM (figura 6.12) a fost determinată umplerea completă sau parțială a zonei defectului, însă fără restabilirea înălțimii față de suprafața articulară a gazdei. Înălțimea cartilajului regenerat era semnificativ redusă sau alocuri absentă comparativ cu cel normal. Evaluând histologic calitatea și tipul cartilajului articular nou-format, a fost observat că defectele au fost predominant umplute cu țesut fibros sau fibrocartilagos. Cartilajul nou-format a fost caracterizat prin alternarea de zone cu hipocelularitate ușoară și hipercelularitate ușor crescută, reprezentate prin celulele de tip fibroblast-like și condroblaste, înconjurate de o matrice predominant fibroasă. Dimensiunile celulelor au variat în funcție de zona cartilajului reparativ, în straturile superficiale și mijlocii acestea aveau dimensiuni mici și nu formau grupuri izogene, iar în straturile profunde dimensiunile condrocitelor erau ușor crescute, fiind organizate, alocuri, în grupuri izogene radiale sau axiale, a câte 2-4 condrocite per grup. Clustere condrocitare au fost determinate rar. Componenta matriceală a neocartilajului a fost reprezentată, atât de fibre colagenice, cât și de componenta proteoglicanică. Distribuția celor două componente matriceale în cadrul cartilajului a fost neomogenă. Cantitatea matriceală de proteoglicani era marcant redusă, concentrația cea mai ridicată fiind în zonele profunde, în apropierea condrocitelor. Componenta colagenică a fost evidențiată în cantitate mare în jumătatea superficială a cartilajului. Fibrele de collagen erau mult subțiate și intens fragmentate (figura 6.13). Suprafața cartilajului regenerat era cu rupturi și fibrilații, iar în ariile de contact cu cartilajul normal al gazdei a fost observată deseori lipsa de continuitate a cartilajului, cu prezența de lacune, fisuri adânci ce implică și osul subcondral. Linia de demarcare lipsește sau iese slab în evidență. În exemplul din figura 6.12 este prezentată răsturnarea grefei transplantate într-un defect cavitatar format ca urmare a lipsei osteointegrării locale, astfel la suprafața articulară fiind expusă preponderent partea osoasă a grefei, iar cea cartilaginoasă fiind preponderent în interiorul defectului experimental ca urmare a procesării și secționării grefei. Linia de demarcare a fost slab evidențiată sau absentă. În osul subcondral au fost observate insule metacromatice de condrocite hipertrofiate, zone de resorbție osoasă și neoosteogeneză, ceea ce indică remodelarea și regenerarea osoasă. A fost determinat procesul de liză și regenerare a osului subcondral.

La studierea pieselor histologice la termen de 12 săptămâni de la transplantarea grefei OCDD combinate cu CSM (figura 6.14) a fost determinată umplerea completă a zonei defectului experimental, dar și față de suprafața cartilajului articular adiacent normal, grosimea cartilajului regenerat fiind neuniformă și pe alocuri semnificativ mai mică comparativ cu cartilajul normal al

gazdei. La evaluarea histologică a calității și tipului cartilajului articular nou-format a fost observat că defectul a fost substituit cu cartilaj de tip hialin și fibrocartilaj.

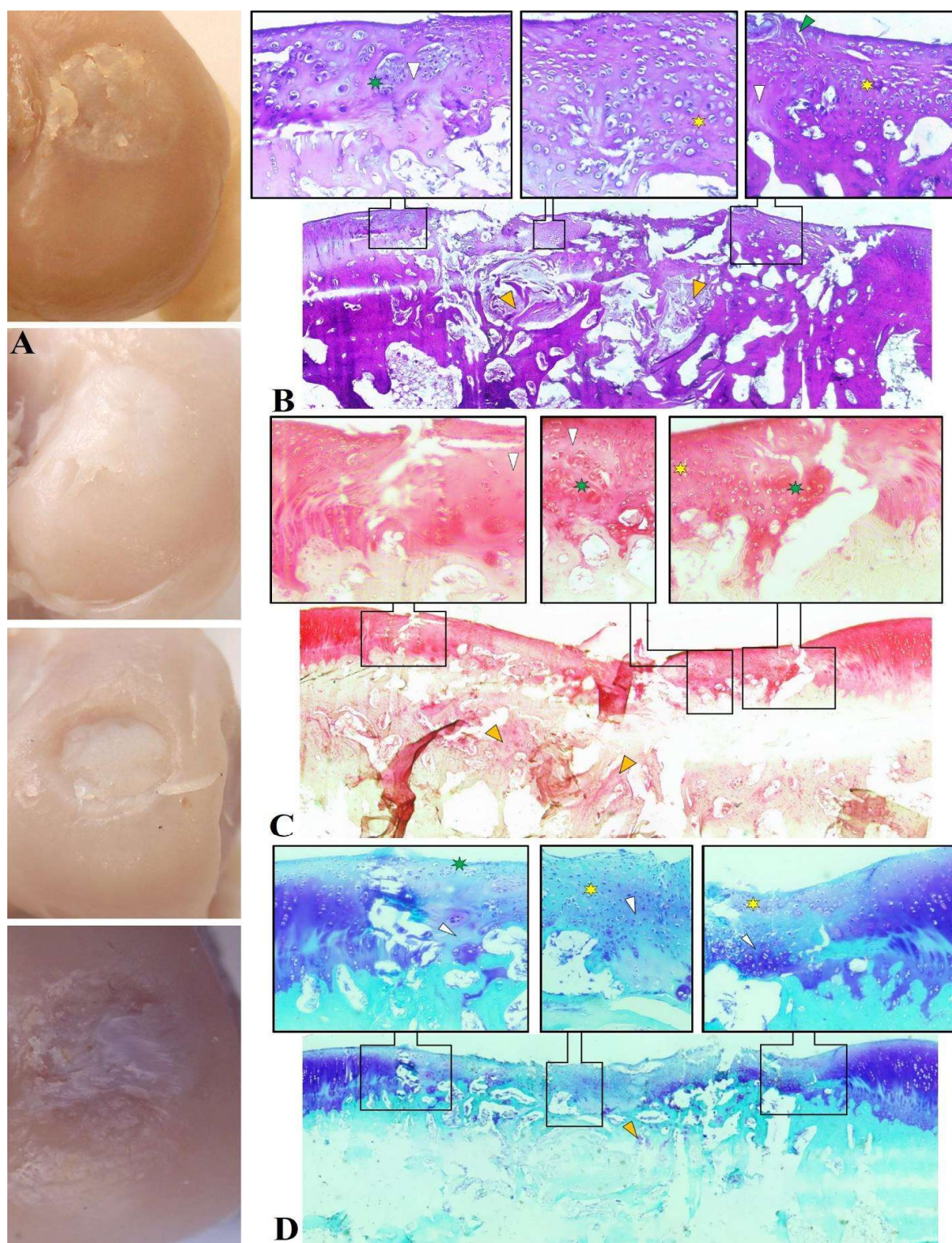


Figura 6.11. Rezultatele studierii piesei histologice, greafă OCDD combinată cu condrocite la termen de 12 săptămâni. Imagini realizate cu microscop Optika, IM-3F la amplificarea x4, x10 și x20. Aspectul macroscopic al defectului regenerat la nivelul condililor mediali (A) și aspectul microscopic la colorarea cu Hematoxină-Eozină (B), Safranin O (C) și Albastru de Toluidină cu Fast Green (D).

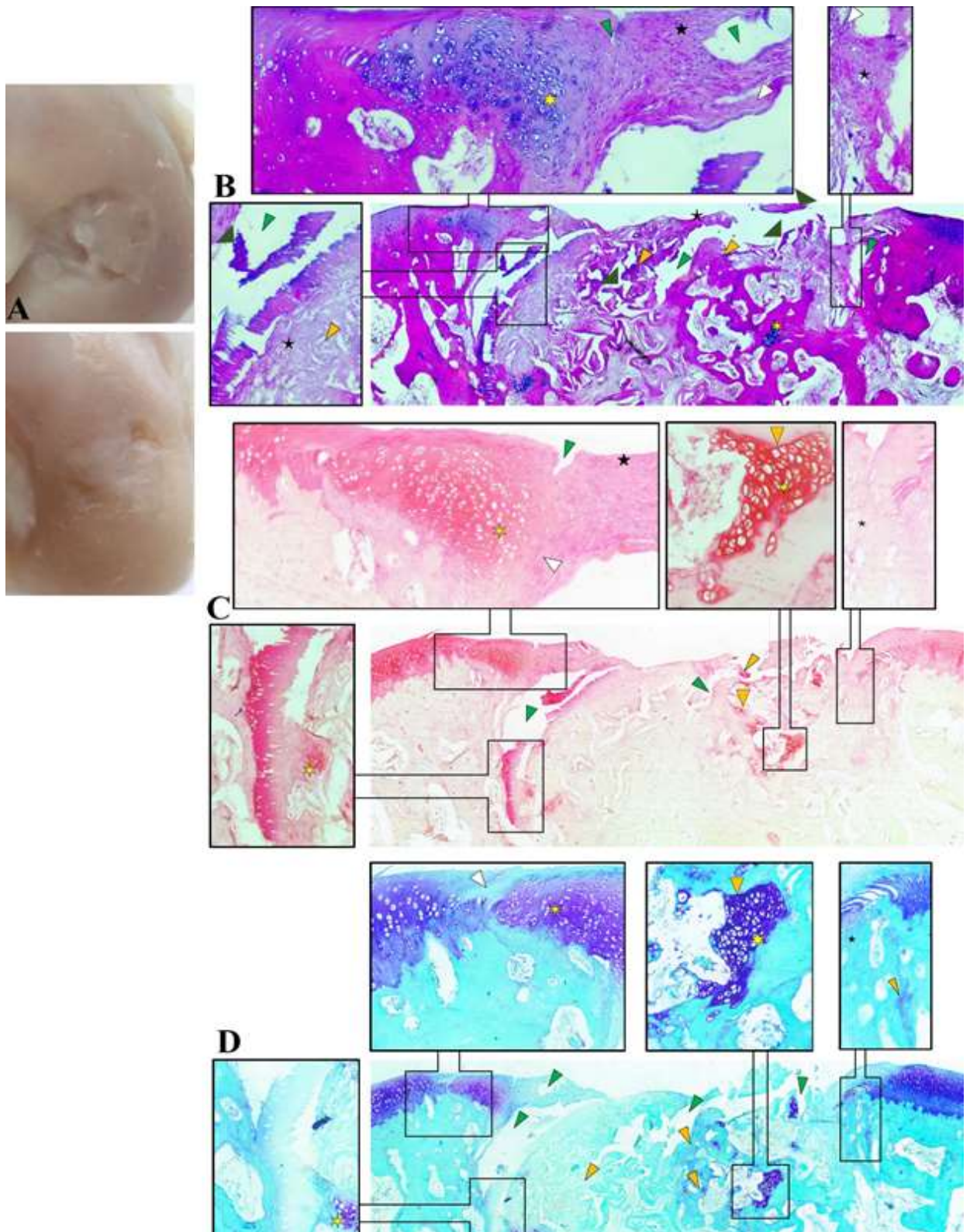


Figura 6.12. Rezultatele studierii piesei histologice, grefă OCDD combinată cu CSM la termen de 6 săptămâni. Imagini realizate cu microscop Optika, IM-3F la amplificarea x40, x100 și x200. Aspectul macroscopic al defectului regenerat la nivelul condililor mediali (A) și aspectul microscopic la colorarea cu Hematoxilină-Eozină (B), Safranin O (C) și Albastru de Toluidină cu Fast Green (D).

Cartilajul nou-format a fost caracterizat prin prezența de zone cu celularizare neomogenă, s-au întâlnit zone hipercelularizate ce alternau cu zone slab celularizate, repartizarea fiind nespecifică cartilajului articular hialin. Preponderent au fost depistate condrocite cu structură normală, dar și condrocite hipertofiate. Cele mai mari condrocite ca dimensiune erau caracteristice pentru zonele superficiale și mijlocii a neocartilajului. Toate condrocitele din aceste straturi fiind organizate în grupuri izogene axiale. Clustere condrocitare în număr foarte mic au fost determinate preponderent la hotarul dintre cartilajul normal al gazdei și neocartilaj delimitate de mase de matrice fibroasă.

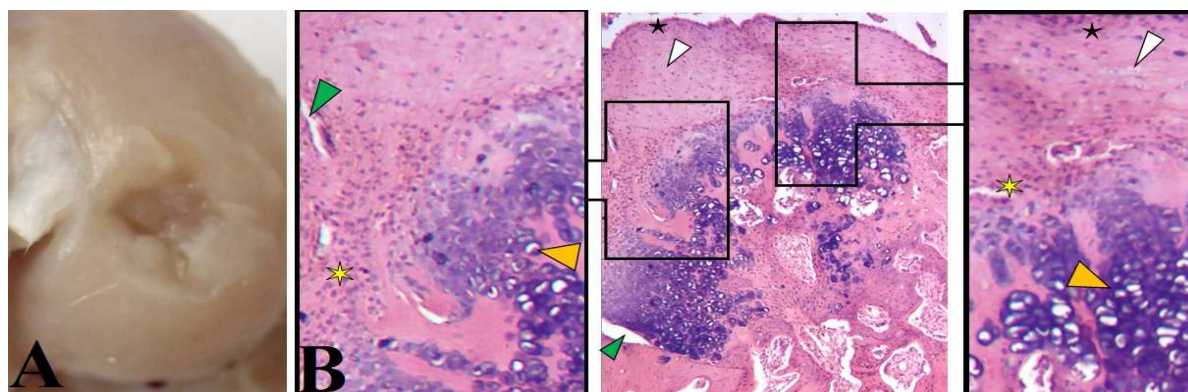


Figura 6.13. Rezultatele studierii piesei histologice, greafă OCDD combinată cu CSM la termen de 6 săptămâni. Imagini realizate cu microscop Olympus, IMT-2 la amplificarea x40 și x100. Aspectul macroscopic al defectului regenerat la nivelul condililor mediali (A) și aspectul microscopic la colorarea cu Hematoxină-Eozină (B).

De asemenea, au fost depistate condrocite organizate în grupuri izogene a câte 2-3 condrocite per grup, fără orientare liniară. Distribuția proteoglicanilor și fibrelor de colagen în cadrul cartilajului regenerat a fost aproape omogenă. Cantitatea matriceală de proteoglicani era ușor sau moderat redusă. Fibrele de colagen au avut un caracter crescut de destrămare, iar în zonele cu hipercelularitate matricea era intens fibroasă cu o cantitate redusă de proteoglicani. Suprafața cartilajului regenerat era neomogenă, aparent netedă, în unele cazuri cu defecte de condrogeneză de tipul fisurilor și chisturilor. A fost observată cel mai des o integritate și continuitate normală cu cartilajul gazdei, granița dintre acestea caracterizându-se prin divers grad de hipocelularitate și hipocromazie. Linia de demarcare a fost slab evidențiată sau absentă. În osul subcondral au fost observate insule metacromatice de condrocite hipertofie de dimensiuni mici, și zone de resorbție și osificare. Osul subcondral al grefei era în proces de substituție cu osul organismului gazdă.

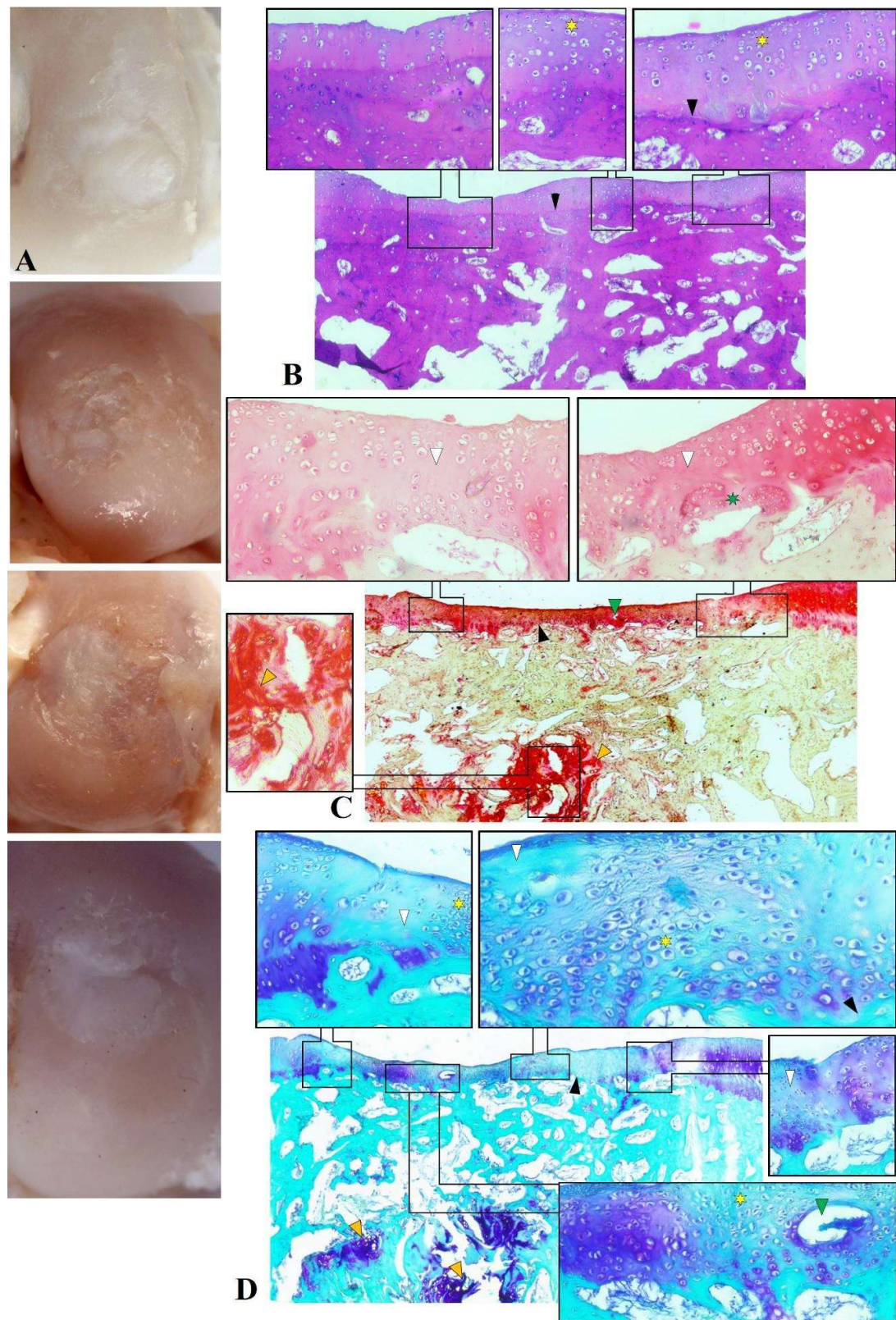


Figura 6.14. Rezultatele studierii piesei histologice, greafă OCDD combinată cu CSM la termen de 12 săptămâni. Imagini realizate cu microscop Optika, IM-3F la amplificarea x40, x100 și x200. Aspectul macroscopic al defectului regenerat la nivelul condililor mediali (A) și aspectul microscopic la colorarea cu Hematoxilină-Eozină (B), Safranin O (C) și Albastru de Toluidină cu Fast Green (D).

6.3.4 Examenul morfologic al defectelor tratate prin transfer de țesut osteocondral autolog

La studierea piesei histologice la 6 săptămâni de la transferul grefelor osteocondrale autologe (figura 6.15), a fost determinată umplerea incompletă a zonei defectului, fără umplerea acesteia în raport cu suprafața cartilajului adiacent normal, dar cu păstrarea înălțimii grefelor în raport cu cartilajul adiacent normal. Evaluând histologic calitatea și tipul cartilajului articular nou-format a fost observat că defectul de cartilaj a fost predominant umplut cu fibrocartilaj, inclusiv cartilajul normal din grefele transferate a suferit modificări degenerescente devenind de tip fibrocartilagos. Cartilajul nou format a fost caracterizat printr-o hipocelularitate severă cu distribuție neuniformă a celulelor, de asemenea, o reducere semnificativă a gradului de celularizare a fost prezentă și în cartilajul transferat, condrocitele restante formând grupuri celulare izolate cu dislocare liniară, alocuri aceste celule prezentau semne de hipertrofie cu păstrarea integrității celulare. A fost determinată prezența focarelor de necroză a cartilajului transplantat, dar și autoliza țesutului cartilagos și osos autolog transferat. Clustere condrocitare au fost determinate preponderent la marginea defectului în cartilajul adiacent, alocuri însoțit de o hipocromazie și hipocelularitate severă. În locurile de contact a grefelor osteocondrale autologe cu cartilajul adiacent, dar și între ele a fost determinată formarea unor defecte cavitare. Componenta matriceală a cartilajului nou format a fost reprezentată, atât de fibre de colagen, cât și de componenta proteoglicanică. Distribuția celor două componente matriceale în cadrul cartilajului a fost neomogenă și redusă. Fibrele de colagen erau mult subțiate și intens fragmentate, în cavitatea articulară, în apropierea defectului. De asemenea, în cavitatea articulară uneori, a fost observată prezența unor mase fibrocartilaginoase detașate, alocuri fisurate în proces de liză. Suprafața cartilajului regenerat era sever fisurată, cu rupturi și fibrilații. Linia de demarcare prezentă, alocuri greu de identificat.

La studierea piesei histologice la termen de 12 săptămâni de la transferul grefelor osteocondrale autologe (figura 6.16) a fost determinată umplerea completă a zonei defectului, însă fără restabilirea înălțimii la nivelul suprafeței cartilajului articular adiacent normal. Înălțimea grefelor transplante, cât și a neocartilajului în raport cu cartilajul adiacent normal este mult mai mică. Evaluând histologic calitatea și tipul cartilajului articular nou format a fost observat că defectul de cartilaj a fost umplut predominant cu fibrocartilaj și cartilaj hialin. Cartilajul nou-format a fost caracterizat printr-o hipercelularitate ușoară cu distribuție neuniformă a celulelor, acestea fiind preponderent condrocite. A fost determinată o reducere ușoară a gradului de celularizare a cartilajului transferat, celulele fiind repartizate a câte 3-5 celule în grupuri izogene cu aranjare axială. În piesa prezentată în figura 6.16 a fost depistată prezența autolizei țesutului cartilagos autolog transferat, unei zone de lacunare la baza căreia

era osul subcondral cu reminiscente din zona profundă a cartilajului și a liniei de demarcație traiecul cărora coincide cu cele a cartilajului adiacent normal, dar și a altor grefe.

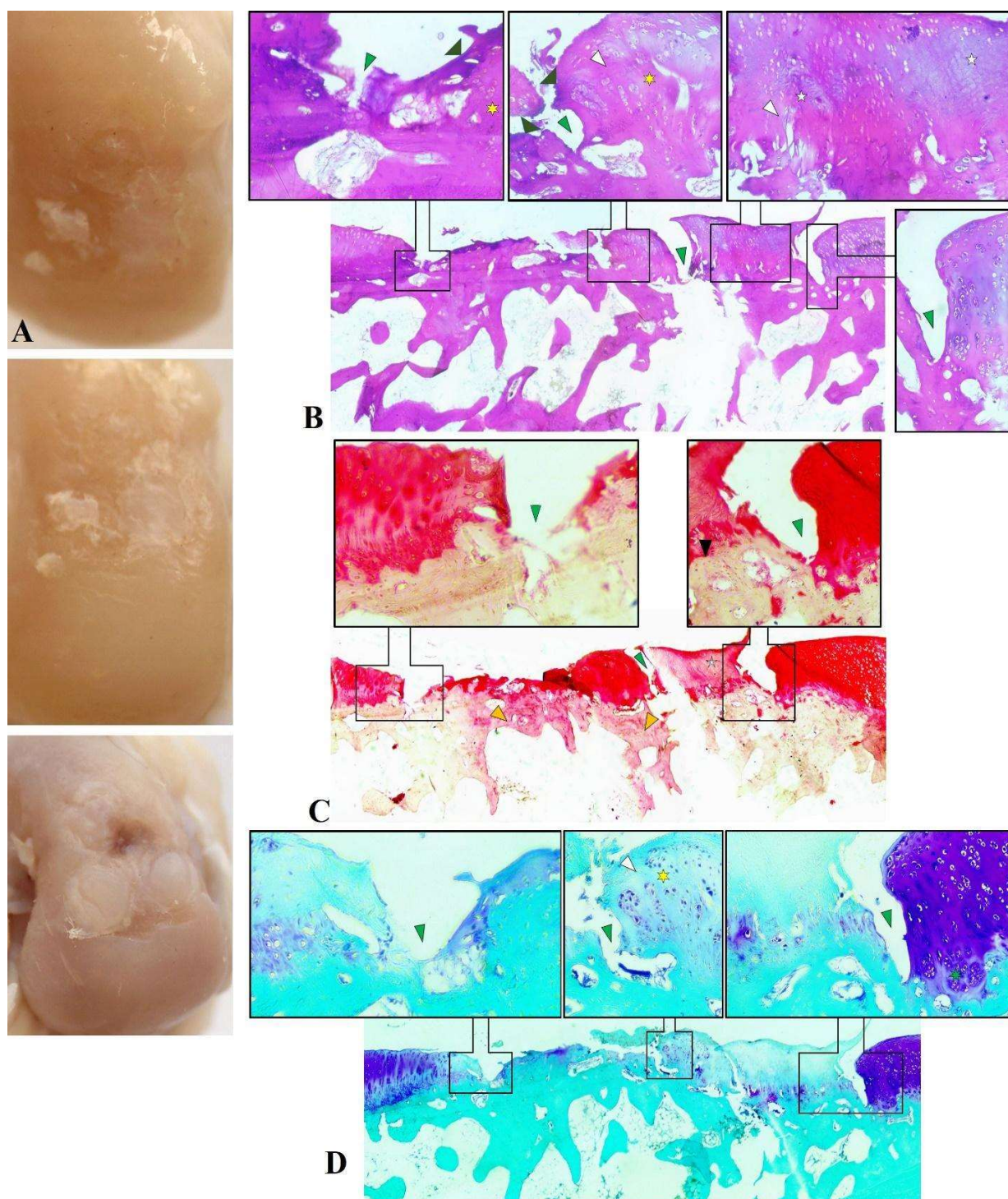


Figura 6.15. Rezultatele studierii piesei histologice, transfer de țesut osteocondral autolog la termen de 6 săptămâni. Imagini realizate cu microscop Optika, IM-3F la amplificarea x40, x100 și x200. Aspectul macroscopic al defectului regenerat la nivelul condililor mediali (A) și aspectul microscopic la colorarea cu Hematoxilină-Eozină (B), Safranin O (C) și Albastru de Toluidină cu Fast Green (D).

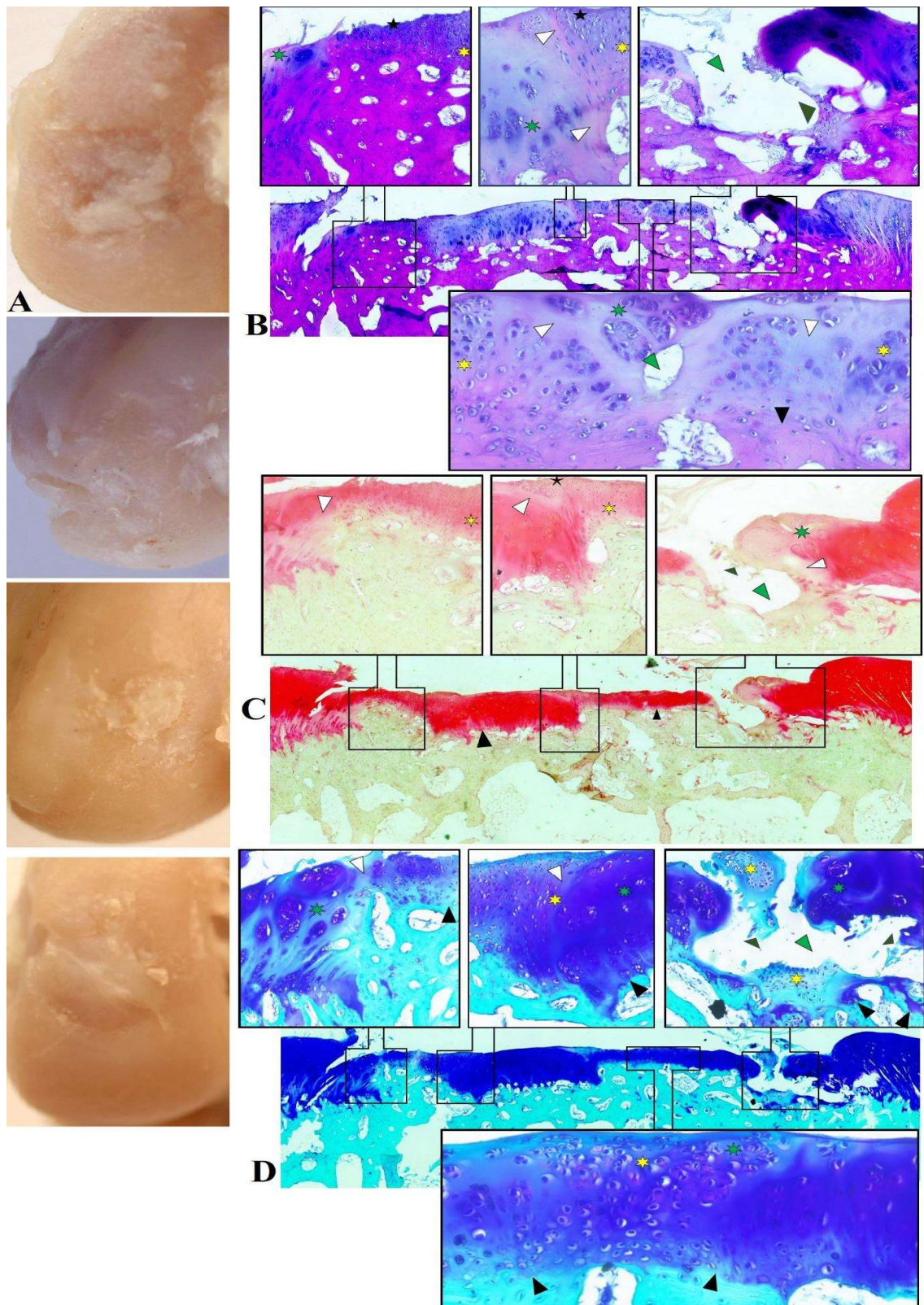


Figura 6.16. Rezultatele studierii piesei histologice, transfer de țesut osteocondral autolog la termen de 12 săptămâni. Imagini realizate cu microscop Optika, IM-3F la amplificarea x40, x100 și x200. Aspectul macroscopic al defectului regenerat la nivelul condililor mediali (A) și aspectul microscopic la colorarea cu Hematoxilină-Eozină (B), Safranin O (C) și Albastru de Toluidină cu Fast Green (D).

De asemenea, la nivelul acestei zone a fost depistată hiperplazia și proliferarea condrogenă intensă din partea cartilajului adiacent normal cu tendința de substituire a defectului. Clustere condrocitare au fost determinate la marginea defectului în cartilajul adiacent, în cartilajul transplantat și în cel regenerat, înconjurate de țesut fibros și un grad ușor de hipocromazie. Componenta matriceală a cartilajului nou format a fost reprezentată, atât de fibre de colagen, cât și de componenta proteoglicanică. Distribuția celor două componente matriceale în cadrul cartilajului a fost neomogenă. Fibrele de colagen erau fragmentate, dar îngroșate. De asemenea, în cavitatea articulară uneori, a fost observată prezența unor mase fibrocartilaginoase detașate alocuri fisurate în proces de liză, cel mai probabil acestea fiind reminiscențe de cartilaj articular transferat ce au fost detașate de osul subiacent. Suprafața cartilajului cel mai des era denivelată, cu fisuri și fibrilații. A fost atestată prezența de chist cartilaginos, linia de demarcare a fost prezentă, iar osul subcondral normal.

6.4 Discuții

Etapa obținerii celulelor pentru regenerarea cartilajului articular cu grefe combinate este una esențială. Este necesar de menționat că este o diferență evidentă între numărul de CSM și condrocite transplantate în cadrul experimentului ($p < 0.001$). Aceasta diferență semnificativă între grupe s-a datorat faptului că CSM au dimensiuni mai mari ca condrocitele, din acest motiv cantitatea de CSM transplante este aproape de 2 ori mai mică ca cea de condrocite. Cu toate acestea în cadrul fiecărei transplantări a fost utilizat câte un flacon de celule cu confluența de 80-90%. Prin urmare, dacă raportăm cantitatea celulelor utilizate în cadrul experimentului la 1 cm^3 , reiese că cantitatea de condrocite transplantate ar fi de $5.77 \times 10^7 \pm 6 \times 10^6$ celule/ cm^3 , iar de CSM - $3.12 \times 10^7 \pm 8 \times 10^6$ celule/ cm^3 .

Utilizarea dispozitivului elaborat pentru fixarea și celularizarea grefelor de dimensiuni mici a permis transplantarea unui număr semnificativ de celule, ce reprezintă 87.64% (95% ÎI:86.04-89.24) din totalul celulelor detașate de pe suprafața de cultură celulară. Într-un studiu efectuat în cadrul Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare, a fost determinat că celularizarea matricilor tridimensionale, spre exemplu, în godeele unei plăci de 96 godee, prezintă un randament mult mai redus de celularizare comparativ cu utilizarea dispozitivului elaborat, circa 50.99% \pm 8.06% ($p < 0.001$) [14, 167, 248].

În cadrul cercetării efectuate, din punct de vedere teoretic defectele experimentale ar fi trebuit să fie doar de cartilaj fără a implica și osul subcondral, deoarece obiectivul de bază a cercetării este regenerarea cartilajului articular nu și a osului subcondral. Dar s-a mers pe calea creării defectului experimental osteocondral din motiv că, este practic imposibil de pregătit și de fixat o greafă cartilaginoasă decelularizată și perforată, de grosimea cartilajului articular de iepure, ce să fie combinată cu celule și care după transplantare să fie supusă constant stresului

mecanic la care aceasta să reziste. Un alt motiv de creare a defectelor experimentale osteocondrale este potențialul de regenerare foarte slab a cartilajul articular, acesta chiar fiind îmbibat cu celule condroprogenitoare are șanse slabe de aderare la osul și cartilajul adiacent [167, 255]. De o mare importanță este și faptul că defectele de cartilaj sunt însoțite în mare parte și de degenerarea osului subcondral, acest os de regulă în timpul intervențiilor chirurgicale de stimulare a regenerării cartilajului articular prin măduva osoasă se înlătură [99, 100, 101] sau se perforază pentru a asigura pătrunderea MO în defectul de cartilaj [4, 11, 102-104, 106-111, 231]. Totuși, tehnicile de resurfatare sunt cele mai explicate și argumentate – osul subcondral este înlăturat, deoarece fixarea grefei în os este mai sigură, iar regenerarea os-os decurge mult mai rapid comparativ cu cartilaj-cartilaj [39, 202, 112-127, 219, 255]. Totodată osul subcondral din regiunea cu cartilaj degenerat este important pentru nutriția straturilor profunde ale cartilajului [89] și transferul stimulilor mecanici de la cartilaj spre restul osului [181], ca urmare osul din cadrul grefei bifazice fiind demineralizat asigură o regenerare rapidă a osului subcondral datorită proprietăților sale osteoinductive și osteoconductive [199, 200, 245], dar și o fixare mai stabilă a grefei necătând la un modul de elasticitate mult mai redus comparativ cu cel al osului normal [170, 247]. Deoarece grefa demineralizată și decelularizată și perforată longitudinal are rezistența mecanică mult mai redusă decât țesutul osteocondral normal [166, 167, 170, 246] pentru a asigura liniștea articulară cu scop de asigurare a procesului de osteogeneză și condrogeneză a fost aplicată imobilizarea gipsată cu limitarea sprijinului pe membrul operat timp de 10 zile.

Transplantarea de grefe bifazice osteocondrale, alogene, demineralizate, decelularizate, perforate longitudinal și combinate cu celule autologe, ce prezintă potențial condroprogenitor, cu scop de a regenera cartilajul articular, pot fi calificate drept tehnici de regenerare a cartilajului articular prin inginerie tisulară. Tehnica de inginerie tisulară ce utilizează matrici tridimensionale combinate cu condrocite autologe se numește Matrix-assisted Autologous Chondrocyte Implantation (MACI) [2, 12, 41, 128, 132, 203, 255], iar tehnica ce utilizează matrici tridimensionale populate cu CSM se numește Matrix Autologous Stem-cells Implantation (MASI) [43, 44, 135, 136], acestea din urmă fiind descrise anterior. Astfel, în cadrul cercetării au fost comparate 2 tehnici de regenerare a cartilajului articular prin inginerie tisulară cu o tehnică de resurfatare a cartilajului articular [10] prin transferul de țesut osteocondral autolog, utilizând tehnica de mozaicplastie [2, 38-40, 112-117]. Scorurile histologice obținute la termen de 12 săptămâni după prima și a doua evaluare a loturilor experimentale, a fost mai bun în cazul grefelor combinate cu CSM, acesta fiind de 14.89 ± 3.76 și 14.33 ± 1.5 puncte, iar în cazul grefelor combinate cu condrocite au fost obținut un scor de 18.68 ± 5 și 19.22 ± 2.44 puncte, ce din punct de vedere statistic la prima evaluare nu prezintă mare diferență între aceste 2 loturi (p

=0.08), pe când la a doua evaluare diferența între rezultate este evidentă ($p < 0.001$), chiar dacă între rezultatele ambelor evaluări diferență nu există ($p = 0.745$). Conform datelor din literatură a fost determinat că utilizarea de matrici tridimensionale combinate cu CSM autologe izolate din sinovia articulară prezintă rezultate mai bune comparativ cu utilizarea de condrocite autologe [135]. Cu toate acestea, atât aspectul macroscopic, cât și examenul histologic al probelor cu stabilirea scorurilor evaluării histologice per lot nu prezintă rezultate satisfăcătoare în tratamentul defectelor critice de țesut osteocondral la iepure [7, 16].

Efectuarea defectului experimental, osteocondral la nivelul suprafeței portante cu scop de testare a biomaterialelor este o practică mai puțin răspândită comparativ cu efectuarea acelorași defecte la nivelul șanțului trohlear [2, 7, 16, 132, 137-139, 166]. La momentul actual nu au fost depistate studii în literatură care să compare capacitatea de regenerare a defectelor critice efectuate în șanțul trohlear și a celor efectuate pe suprafața portantă. Reușita regenerării defectului experimental depinde în mare măsură de regiunea unde acesta a fost făcut, deoarece în timpul mișcării în articulații, expunerea suprafeței articulare la forțe de forfecare, compresiune și tracțiune variază în dependență de regiune, la nivelul suprafeței articulare portante ca condilul femural medial acestea fiind cele mai înalte. Într-un studiu efectuat în Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare în care au fost testate spongiile din colagen ce a fost extras din tendon Ahile de bovină combinate cu CSM în tratarea defectelor critice executate câte două în șanțul trohlear și câte unul la nivelul suprafeței portante a condilului femural medial, a fost determinată o diferență semnificativă între rezultatele obținute la 12 săptămâni după transplantare, prin utilizarea SHUCR [166, 167, 254]. Chiar dacă în șanțul trohlear au fost două defecte osteocondrale critice, defectul de pe suprafața portantă a obținut un scor mult mai ridicat, aproximativ 40 puncte ($p < 0.001$). Totodată, nu a fost determinată nici o diferență între rezultatele obținute la compararea lotului martor negativ, în care au fost create două defecte osteocondrale în șanțul trohlear fără tratament, cu lotul experimental, în care două defectele critice din șanțul trohlear au fost tratate cu spongiile colagenice combinate cu CSM ($p > 0.7$) [166]. Astfel, ținând cont de cele expuse, rezultatele obținute la tratamentul defectelor critice de pe suprafața portantă cu grefe OCDD combinate cu CSM și condrocite par să fie încurajatoare, iar grefele ierarhic bifazice net superioare spongiilor de colagen tip I.

În una din cele mai recente publicații în care au fost testate *in vitro* și *in vivo* alogrefe ierarhic bifazice obținute din țesut osteocondral de porc prin decelularizare cu scop de a regenera defecte osteocondrale experimentale critice de la nivelul șanțului trohlear, autorii menționează că grefa obținută de ei a prezentat un grad scăzut de imunogenitate, o bioactivitate și biocompatibilitate ridicată, a stimulat repararea țesutului osteocondral prin suprimarea angiogenezei, a indus migrarea celulară și a asigurat ierarhia bifazică a țesutului [200, 255], doar

că autorii nu au testat grefa *in vivo* prin implantarea într-un defect de pe o suprafața portantă, ci în șanțul trohlear, acolo unde defectele critice și fără tratament regenerează aproape la fel de bine ca și prin utilizarea unor tehnici de inginerie tisulară [166].

În concluzie, utilizarea celulelor autologe cu potențial condroprogenitor combinate cu o grea ierarhic bifazică în tratamentul defectelor critice osteocondrale experimentale create pe suprafața portantă de condil femural medial, nu a dus la rezultatele așteptate.

DISCUȚII DE GENERALIZARE

Studiile efectuate la teza de doctorat au permis selectarea și evaluarea biocompatibilității grefelor ierarhic bifazice demineralizate, decelularizate și perforate longitudinal *in vitro*, iar apoi și *in vivo* prin transplantarea grefei selectate, combinate cu condrocite și CSM într-un defect osteocondral critic de pe suprafața portantă a condilului femural medial la iepure. În primul studiu efectuat la teză, procesul de izolare și cultivare a CSM a fost utilizat cu mediul de cultură HiMeso XL (HiMedia, India), iar CSM au fost identificate prin diferențiere pe linie condrocitară cu HiChondro XL (HiMedia, India) [151]. Tot aceste celule după decongelare au fost apoi utilizate în testele *in vitro* cu mediu de cultură celulară DMEM/F-12 Ham (Sigma, Marea Britanie) cu 10% SFB (Lonza, Belgia) [14, 167, 169-171, 190]. Același mediu cu DMEM/F-12 Ham a fost utilizat apoi pentru izolarea și cultura CSM pentru testele *in vivo* însă fără a fi identificate prin diferențiere celulară, deoarece cultura primară de fiecare dată a fost utilizată în tratamentul defectelor experimentale [14, 166, 167]. De asemenea, CSM izolate prin utilizarea mediului cu DMEM/F-12 Ham au fost utilizate și în alte teste *in vitro* ca martor, cu scop de a identifica prin metode histochemice în cultură celulară celule de origine mezenchimală ca celule osoase, condrocite și fibroblaste [164, 178, 189]. Având în vedere că anume fibroblastele și celulele osoase sunt acele celule ce pot contamina cultura de CSM la izolarea acestora din MO, utilizarea CSM în calitate de martor la identificarea acestora ne demonstrează că culturile de CSM izolate din MO prin utilizarea mediului de cultură celulară cu DMEM/F-12 Ham au o puritate înaltă [178, 189]. În studiile efectuate în cadrul tezei a fost observată o diferență semnificativă ($p = 0.001$) între numărul de zile de cultivare a CSM cu HiMesoXL (HiMedia, India) ce era de 7 ± 1 zile și DMEM/F-12 Ham (Sigma, Marea Britanie) cu SFB (Lonza, Belgia) ce era de 11 ± 3 zile. De asemenea, diferență semnificativă era și între în numărul de celule izolate în primul pasaj din ambele studii ($p < 0.001$), ținând cont de faptul că nu a fost determinată nici o diferență între volumul de MO colectată de la animale ($p > 0.2$). Aceste diferențe pot fi explicate prin faptul că în primul studiu a fost utilizat mediu de cultură HiMesoXL (HiMedia, India) special orientat spre expansiunea rapidă a culturilor de CSM la izolarea acestora din MO, iar durata de cultivare era până la confluența de 70-80%, pe când în al patrulea studiu, CSM au fost izolate și cultivate cu mediu ce poate fi utilizat la o gamă largă de celule [151, 154, 159, 178], cu o durată de cultivare până confluență ce a fost de 80-90%. Un lucru important a fost dovedit a fi tactica de cultivare celulară, în special a CSM. A fost observat că schimbarea completă a mediului de cultură, însoțită de clătirea suprafeței de cultură celulară, când s-a ajuns la o confluență celulară de 40-50%, a permis obținerea unei culturi celulare mai pure, dar și un număr de celule mai mare la momentul transplantării ($p < 0.001$) [14, 151, 154, 166, 167, 178].

Ca urmare a cercetărilor de biocompatibilitate efectuate *in vitro* cu evaluarea concentrației de ADN restant și a proprietăților fizico-chimice, cu scop de testare a regenerării cartilajului articular a fost selectată grefa OC demineralizată ce a fost decelularizată cu soluție de 1% SDS. Ținând cont de faptul că grefele testate la al treilea studiu, în care a fost selectată grefa ce ulterior a fost testată *in vivo*, aveau o structură neomogenă, concentrația și tipul de surfactant utilizat în decelularizare nu a influențat semnificativ proprietățile fizice ale acestora, prezentând o diferență semnificativă a modulului de elasticitate la compararea grupelor testate ($p = 0.007$) și un grad de hidrofilie similar în toate grupele ($p > 0.4$), respectiv acestea nu au prezentat factor de decizie în selectarea grefei. Pe când proprietățile chimice ale probelor testate au prezentat rezultate concludive și anume prin înrăutățirea semnificativă a vitezei de degradare enzimatică a probelor decelularizate prin utilizarea de SDS [170]. Ca urmare a selectării unui tip de grefe cu o concentrație restantă a ADN-ului de 1.2 ± 1.01 ng/ μ l, ce reprezenta 2.95% (95% ÎI: 0.34-5.55) din concentrația ADN-ului față de țesutul OC normal ($p < 0.001$), în urma transplantării acestora, combinate cu celule cu potențial condroprogenitor, în straturile profunde ale cartilajului regenerat a fost determinată prezența de chisturi similare cu vase sangvine. Semnul respectiv indică asupra faptului că chiar dacă concentrația de ADN în grefa selectată a fost sub 5%, aceasta poate fi decelularizată insuficient într-o anumită regiune, ce se poate observa în special la nivelul straturilor profunde ale cartilajului. Ca urmare celulele restante, moarte, după transplantare duc la alterarea MEC, prin inducerea unui efect crescut de angiogeneză și reducerea potențialului de migrare a celulelor [200, 254].

O altă variantă de grefă ierarhic bifazică ar fi țesutul osteocondral decelularizat [172, 200], doar că apare aceeași problemă legată de decelularizarea incompletă a cartilajului, în special, a zonelor profunde ce se poate solda cu alterarea MEC [200]. Cu toate acestea a fost constatat că grefele OC decelularizate au o capacitate foarte slabă de integrare în țesutul adiacent normal, iar structura compactă a cartilajului prezintă o problemă majoră a potențialului de remodelare a grefei [172]. Ca urmare, au fost propuse mai multe tipuri de grefe bifazice obținute din materiale sintetice și naturale, printre care interes prezenta grefa bifazică obținută din 2 componente, fiecare pregătite separat - cartilaj măcinat și decelularizat cu SDS de 2% și matrice osoasă demineralizată [172]. Componentele grefei au fost fuzionate la temperatura de -80°C , iar apoi combinate cu CSM din MO. Necătând la rezultatele bune prezentate de către autori, problema studiului respectiv constă în faptul că grefa bifazică OC combinată cu CSM a fost transplantată în defecte critice de la nivelul șanțului trohlear, respectiv nu se cunoaște care ar fi fost efectul acțiunii forțelor mecanice asupra acestei grefe dacă aceasta ar fi fost transplantată la nivelul suprafeței portante.

CONCLUZII

1. Metoda de colectare a măduvei osoase din osul iliac elaborată, fără sacrificarea animalului, a permis micșorarea numărului de animale utilizate în cercetare, dar și utilizarea de CSM autologe la efectuarea testelor *in vivo*.
2. Metoda de monitorizarea continuă a procesului de digestie enzimatică a cartilajului articular a crescut semnificativ numărul de condrocite izolate și a redus durata procesului de izolare, iar elaborarea metodei de izolare a celulelor prin explant utilizând cicluri de reglare volumetrică a permis izolarea mai rapidă a unui număr mare nu doar de condrocite, dar și a altor celule de origine mezenchimală.
3. În procesul de pregătire a grefelor OCDD pentru combinarea cu celule condroprogenitoare, utilizarea HCl a redus semnificativ conținutul de ADN în țesutul osteocondral, ce a permis la o expunere scurtă de 24 ore, o reducere semnificativă a ADN-ului restant prin utilizarea soluției de 1% SDS. De asemenea, utilizarea SDS în procesul pregătirii grefelor a diminuat semnificativ viteza de degradare enzimatică a acestora față de lotul martor.
4. DFCGDM utilizat în transplantarea grefelor combinate, a crescut semnificativ rata de populare a grefelor cu celulele, doar că nu a fost găsită nici o asociere între numărul de celule transplantat și calitatea țesutului regenerat.
5. SHUCR a permis evaluarea obiectivă a țesutului regenerat după transplantarea grefelor combinate. Rezultatele evaluării la termen de 6 și 12 săptămâni diferă, atât în loturile experimentale, cât și în cel martor, iar la compararea rezultatelor loturilor experimentale cu cele a lotului martor la termen de 6 săptămâni nu a fost determinată nici o diferență statistic semnificativă între acestea. La termen de 12 săptămâni a fost determinat că lotul în care defectele OC au fost tratate cu grefe combinate cu CSM prezintă rezultate puțin mai bune. Cu toate acestea, la termen de 12 săptămâni a fost obținută o umplere completă sau aproape completă a defectelor cu țesut de tip fibrocartilagos sau fibros, cu aspect și structură microscopică dezorganizată, nespecifică cartilajului articular hialin.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Etapa testării *in vivo*, pe animale de laborator, a materialelor biologice create cu scop de regenerare a cartilajului articular este necesar de realizat prin implantare în defecte critice, atât la nivelul suprafețelor articulare portante, cât și a celor neportante.
2. Defectele critice executate pe o suprafață articulară portantă la iepure, cu scop de a testa potențialul de regenerare a cartilajului articular, este necesar să nu depășească diametrul critic minimal de 3 mm, deoarece defectele de dimensiuni mai mari prezintă risc de fractură intraoperatorie a condilului femural, reduc semnificativ suprafața portantă a condilului femural, dar și potențialul de regenerare prin tehnici de inginerie tisulară
3. Evaluarea eficacității decelularizării unui țesut este necesar de efectuat prin determinarea: concentrației de ADN raportat la ng/mg; a prezenței celulelor la examinarea histologică prin colorarea cu Hematoxilină-Eozină; a rămășițelor de ADN prin examinarea fluorescentă cu DAPI; și după caz, determinarea concentrației de GAG și a hidroxiprolinei.

BIBLIOGRAFIE

1. VILLALVILLA, A., GÓMEZ, R., LARGO, R., HERRERO-BEAUMONT, G. Lipid transport and metabolism in healthy and osteoarthritic cartilage. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(10), pp. 20793-808. ISSN 1422-0067. Disponibil: DOI: 10.3390/ijms141020793
2. SOPHIA FOX, AJ., BEDI, A., RODEO, SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health.* 2009; 1(6), pp. 461-8. ISSN 1941-7381. Disponibil: DOI: 10.1177/1941738109350438
3. FOSANG, AJ., BEIER, F. Emerging Frontiers in cartilage and chondrocyte biology. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2011; 25(6), pp. 751-66. ISSN 1521-6942. Disponibil: DOI: 10.1016/j.berh.2011.11.010
4. KARUPPAL, R. Current concepts in the articular cartilage repair and regeneration. *J Orthop.* 2017; 14(2), pp. A1-A3. ISSN 0972-978X. Disponibil: DOI: 10.1016/j.jor.2017.05.001
5. HUEY, DJ., HU, JC., ATHANASIOU, KA. Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science.* 2012; 338(6109), pp. 917-21. ISSN 0036-8075. Disponibil: DOI: 10.1126/science.1222454
6. KNUTSEN, G., DROGSET, JO., ENGBRETSSEN, L., GRØNTVEDT, T., LUDVIGSEN, TC., LØKEN, S., SOLHEIM, E., et al. A randomized multicenter trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture: Long-term follow-up at 14 to 15 years. *J Bone Joint Surg Am.* 2016; 98(16), pp. 1332-9. ISSN 0375-9229. Disponibil: DOI: 10.2106/JBJS.15.01208
7. NGUYEN-THANH, T., NGUYEN-TRAN, BS., CRUCIANI, S., DANG-CONG, T., MAIOLI, M. A rabbit femoral trochlear defect model for chondral and osteochondral regeneration. *Acta Vet Brno.* 2022; 91(3), pp. 293-301. ISSN 1801-7576. Disponibil: <https://doi.org/10.2754/avb202291030293>
8. JEUKEN, RM., VAN HUGTEN, PPW., ROTH, AK., TIMUR, UT., BOYMANS, TAEJ., VAN RHIJN, LW., BUGBEE, WD., EMANS, PJ. A systematic review of focal cartilage defect treatments in middle-aged versus younger patients. *Orthop J Sports Med.* 2021; 9(10):23259671211031244. ISSN 2325-9671. Disponibil: DOI: 10.1177/23259671211031244
9. ARØEN, A., LØKEN, S., HEIR, S., ALVIK, E., EKELAND, A., GRANLUND, OG., ENGBRETSSEN, L. Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am J Sports Med.* 2004; 32(1), pp. 211-5. ISSN 0363-5465. Disponibil: DOI: 10.1177/0363546503259345
10. KWON. H., BROWN, WE., LEE, CA., WANG, D., PASCHOS, N., HU, JC., ATHANASIOU, KA. Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair. *Nat Rev Rheumatol.* 2019; 15(9), pp. 550-570. ISSN 1759-4790. Disponibil: DOI: 10.1038/s41584-019-0255-1
11. OLIVOS-MEZA, A., MADRAZO-IBARRA, A., LEÓN, CIP. Arthroscopic technique to treat articular cartilage lesions in the patellofemoral joint. In: Amarasekera, HW. (ed.) *Recent Advances in Arthroscopic Surgery.* London, IntechOpen; 2018. pp. 67-76. ISBN 978-1-78984-226-5. Disponibil: <https://www.intechopen.com/chapters/61733>
12. ŻYLIŃSKA, B., SILMANOWICZ, P., SOBCZYŃSKA-RAK, A., JAROSZ, Ł., SZPONDER, T. Treatment of articular cartilage defects: focus on tissue engineering. *In Vivo.* 2018; 32(6), pp. 1289-1300. ISSN 1791-7549. Disponibil: DOI: 10.21873/invivo.11379

13. TETTEH, ES., BAJAJ, S., GHODADRA, NS. Basic science and surgical treatment options for articular cartilage injuries of the knee. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2012; 42(3), pp. 243-53. ISSN 1938-1344. Disponibil: DOI: 10.2519/jospt.2012.3673
14. **COBZAC, V.**, JIAN, M., NACU, V. Cellularization of small sized grafts from biological material using the gravitational modality principle. In: *International Conference on Innovative Research - ICIR EUROINVENT 2021*, 20–21 Mai 2021, Iasi, Romania. J. Phys.: Conf. Ser. 2021; 1960:012004. ISSN 1742-6596. Disponibil: DOI: 10.1088/1742-6596/1960/1/012004
15. EYRE, DR., WEIS, MA., WU, JJ. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *Eur Cell Mater.* 2006; 12:57-63. ISSN 1473-2262. Disponibil: DOI: 10.22203/ecm.v012a07
16. MENG, X., ZIADLOU, R., GRAD, S., ALINI, M., WEN, C., LAI, Y., et al. Animal models of osteochondral defect for testing biomaterials. *Biochem Res Int.* 2020; 2020:9659412. ISSN 2090-2255. Disponibil: DOI: 10.1155/2020/9659412
17. BROWN, TD., JOHNSTON, RC., SALTZMAN, CL., MARSH, JL., BUCKWALTER, JA. Posttraumatic osteoarthritis: a first estimate of incidence, prevalence, and burden of disease. *J Orthop Trauma.* 2006; 20(10), pp. 739-44. ISSN 0890-5339. Disponibil: DOI: 10.1097/01.bot.0000246468.80635.ef
18. FELSON, DT. Osteoarthritis as a disease of mechanics. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013; 21(1), pp. 10-5. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1016/j.joca.2012.09.012
19. CHALMERS, PN., MALL, NA., MORIC, M., SHERMAN, SL., PALETTA, GP., COLE, BJ., BACH, BR., JR. Does ACL reconstruction alter natural history?: A systematic literature review of long-term outcomes. *J Bone Joint Surg Am.* 2014; 96(4), pp. 292-300. ISSN 0375-9229. Disponibil: DOI: 10.2106/JBJS.L.01713
20. LIEBERTHAL, J., SAMBAMURTHY, N., SCANZELLO, CR. Inflammation in joint injury and post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015; 23(11), pp. 1825-34. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1016/j.joca.2015.08.015
21. CHUBINSKAYA, S., HAUDENSCHILD, D., GASSER, S., STANNARD, J., KRETTEK, C., BORRELLI, J., JR. Articular cartilage injury and potential remedies. *J Orthop Trauma.* 2015; 29(12), pp. S47-52. ISSN 0890-5339. Disponibil: DOI: 10.1097/BOT.0000000000000462
22. LOHMANDER, LS., ENGLUND, PM., DAHL, LL., ROOS, EM. The long-term consequence of anterior cruciate ligament and meniscus injuries: osteoarthritis. *Am J Sports Med.* 2007; 35(10), pp. 1756-69. ISSN 0363-5465. Disponibil: DOI: 10.1177/0363546507307396
23. BAJAJ, S., SHOEMAKER, T., HAKIMIYAN, AA., RAPPOPORT, L., PASCUAL-GARRIDO, C., OEGEMA, TR., et al. Protective effect of P188 in the model of acute trauma to human ankle cartilage: the mechanism of action. *J Orthop Trauma.* 2010; 24(9), pp. 571-6. ISSN 0890-5339. Disponibil: DOI: 10.1097/BOT.0b013e3181ec4712
24. GOODWIN, W., STRAND, J., HEMBREE, WC., WARD, BD., GUILAK, F., OLSON, SA. Rotenone prevents impact-induced chondrocyte death. *J Orthop Res.* 2010; 28(8), pp. 1057-63. ISSN 0736-0266. Disponibil: DOI: 10.1002/jor.21091
25. ELSAID, KA., MACHAN, JT., WALLER, K., FLEMING, BC., JAY, GD. The impact of anterior cruciate ligament injury on lubricin metabolism and the effect of inhibiting tumor necrosis factor α on chondroprotection in an animal model. *Arthritis & Rheumatism.* 2009;60(10), pp. 2997-3006. ISSN 2326-5191. Disponibil: <https://doi.org/10.1002/art.24800>
26. REESINK, HL., WATTS, AE., MOHAMMED, HO., JAY, GD., NIXON, AJ. Lubricin/proteoglycan 4 increases in both experimental and naturally occurring equine

- osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017; 25(1), pp. 128-137. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1016/j.joca.2016.07.021
27. MORE, AS., KUMARI, RR., GUPTA, G., LINGARAJU, MC., BALAGANUR, V., PATHAK, NN., et al. Effect of iNOS inhibitor S-methylisothiourea in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic pain: implication for osteoarthritis therapy. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013; 103(4), pp. 764-72. ISSN 0091-3057. Disponibil: DOI: 10.1016/j.pbb.2012.12.013
28. FORTIER, LA., BARKER, JU., STRAUSS, EJ., MCCARREL, TM., COLE, BJ. The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*. 2011; 469(10), pp. 2706-15. ISSN 0009-921X. Disponibil: DOI: 10.1007/s11999-011-1857-3
29. BADLANI, N., INOUE, A., HEALEY, R., COUTTS, R., AMIEL, D. The protective effect of OP-1 on articular cartilage in the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008; 16(5), pp. 600-6. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1016/j.joca.2007.09.009
30. WHITTY, C., PERNSTICH, C., MARRIS, C., MCCASKIE, A., JONES, M. Sustained delivery of the bone morphogenetic proteins BMP-2 and BMP-7 for cartilage repair and regeneration in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2022; 4(1), pp. 100240. ISSN 1063-4584. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.ocarto.2022.100240>
31. CHUBINSKAYA, S., HURTIG, M., RUEGER, DC. OP-1/BMP-7 in cartilage repair. *Int Orthop*. 2007; 31(6), pp. 773-81. ISSN 1432-5195. Disponibil: DOI: 10.1007/s00264-007-0423-9
32. OZTÜRK, A., OZDEMIR, MR., OZKAN, Y. Osteochondral autografting (mosaicplasty) in grade IV cartilage defects in the knee joint: 2- to 7-year results. *Int Orthop*. 2006; 30(3), pp. 200-4. ISSN 1432-5195. Disponibil: DOI: 10.1007/s00264-005-0068-5
33. SELLERS, RS., PELUSO, D., MORRIS, EA. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1997; 79(10), pp. 1452-63. ISSN 0375-9229. Disponibil: DOI: 10.2106/00004623-199710000-00002
34. WAKITANI, S., GOTO, T., PINEDA, SJ., YOUNG, RG., MANSOUR, JM., CAPLAN, AI., GOLDBERG, VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1994; 76(4), pp. 579-92. ISSN 0375-9229. Disponibil: DOI: 10.2106/00004623-199404000-00013
35. ERGGELET, C., VAVKEN, P. Microfracture for the treatment of cartilage defects in the knee joint - A golden standard? *J Clin Orthop Trauma*. 2016; 7(3), pp. 145-52. ISSN 2213-3445. Disponibil: DOI: 10.1016/j.jcot.2016.06.015
36. GODIN, JA., SANCHEZ, G., CINQUE, ME., CHAHLA, J., KENNEDY, NI., PROVENCHER, MT. Osteochondral allograft transplantation for treatment of medial femoral condyle defect. *Arthrosc Tech*. 2017; 6(4), pp. e1239-e1244. ISSN 2212-6287. Disponibil: DOI: 10.1016/j.eats.2017.04.010
37. GRACITELLI, GC., MERIC, G., PULIDO, PA., MCCAULEY, JC., BUGBEE, WD. Osteochondral allograft transplantation for knee lesions after failure of cartilage repair surgery. *Cartilage*. 2015; 6(2), pp. 98-105. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1177/1947603514566298
38. EROL, MF., KARAKOYUN, O. A new point of view for mosaicplasty in the treatment of focal cartilage defects of knee joint: honeycomb pattern. *Springerplus*. 2016; 5(1), pp. 1-6. ISSN 2193-1801. Disponibil: <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2796-y>
39. HANGODY, L., FÜLES, P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience.

- J Bone Joint Surg Am.* 2003; 85-A(2), pp. 25-32. ISSN 0375-9229. Disponibil: DOI: 10.2106/00004623-200300002-00004
40. HANGODY, L., VÁSÁRHELYI, G., HANGODY, LR., SÜKÖSD, Z., TIBAY, G., BARTHA, L., BODÓ, G. Autologous osteochondral grafting--technique and long-term results. *Injury.* 2008; 39(1), pp. S32-9. ISSN 0020-1383. Disponibil: DOI: 10.1016/j.injury.2008.01.041
41. NIEMEYER, P., ALBRECHT, D., ANDEREYA, S., ANGELE, P., ATESCHRANG, A., AURICH, M., et al. Autologous chondrocyte implantation (ACI) for cartilage defects of the knee: A guideline by the working group "Clinical Tissue Regeneration" of the German Society of Orthopaedics and Trauma (DGOU). *Knee.* 2016; 23(3), pp. 426-35. ISSN 0968-0160. Disponibil: DOI: 10.1016/j.knee.2016.02.001
42. SCHUETTE, HB., KRAEUTLER, MJ., MCCARTY, EC. Matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation in the knee: A systematic review of mid- to long-term clinical outcomes. *Orthop J Sports Med.* 2017; 5(6):2325967117709250. ISSN 2325-9671. Disponibil: DOI: 10.1177/2325967117709250
43. YAMAGATA, K., NAKAYAMADA, S., TANAKA, Y. Use of mesenchymal stem cells seeded on the scaffold in articular cartilage repair. *Inflamm Regen.* 2018; 38:4. ISSN 1880-8190. Disponibil: DOI: 10.1186/s41232-018-0061-1
44. LO MONACO, M., MERCKX, G., RATAJCZAK, J., GERVOIS, P., HILKENS, P., CLEGG, P., et al. Stem cells for cartilage repair: preclinical studies and insights in translational animal models and outcome measures. *Stem Cells Int.* 2018; 2018:9079538. ISSN 1687-9678. Disponibil: DOI: 10.1155/2018/9079538
45. MADEIRA, C., SANTHAGUNAM, A., SALGUEIRO, JB., CABRAL, JM. Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration. *Trends Biotechnol.* 2015; 33(1), pp. 35-42. ISSN 1879-3096. Disponibil: DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.11.003
46. KRAEUTLER, MJ., KAENKUMCHORN, T., PASCUAL-GARRIDO, C., WIMMER, MA., CHUBINSKAYA, S. Peculiarities in ankle cartilage. *Cartilage.* 2017; 8(1), pp. 12-18. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1177/1947603516642572
47. IRAWAN, V., SUNG, TC., HIGUCHI, A., IKOMA, T. Collagen scaffolds in cartilage tissue engineering and relevant approaches for future development. *Tissue Eng Regen Med.* 2018; 15(6), pp. 673-697. ISSN 1738-2696. Disponibil: DOI: 10.1007/s13770-018-0135-9
48. BHOSALE, AM., RICHARDSON, JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull.* 2008; 87:77-95. ISSN 0007-1420. Disponibil: DOI: 10.1093/bmb/ldn025
49. AKKIRAJU, H., NOHE, A. Role of chondrocytes in cartilage formation, progression of osteoarthritis and cartilage regeneration. *J Dev Biol.* 2015; 3(4), pp. 177-192. ISSN 2221-3759. Disponibil: DOI: 10.3390/jdb3040177
50. LIN, YC., HALL, AC., SMITH, ID., SALTER, DM., SIMPSON, AH. Mapping chondrocyte viability, matrix glycosaminoglycan, and water content on the surface of a bovine metatarsophalangeal joint. *Cartilage.* 2016; 7(2), pp. 193-203. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1177/1947603515613848
51. PUN, SY., TENG, MS., KIM, HT. Periodic rewetting enhances the viability of in human articular cartilage exposed to air. *J Bone Joint Surg Br.* 2006; 88(11), pp. 1528-32. ISSN 0301-620X. Disponibil: DOI: 10.1302/0301-620X.88B11.18091
52. LI, G., YIN, J, GAO, J., CHENG, TS., PAVLOS, NJ., ZHANG, C., ZHENG, MH. Subchondral bone in osteoarthritis: Insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis Res Ther.* 2013; 15(6):223. ISSN 1478-6354. Disponibil: DOI: 10.1186/ar4405

53. TANSKA, P., VENÄLÄINEN, MS., ERDEMIR, A., KORHONEN, RK. A multiscale framework for evaluating three-dimensional cell mechanics in fibril-reinforced poroelastic tissues with anatomical cell distribution—analysis of chondrocyte deformation behavior in mechanically loaded articular cartilage. *Journal of Biomechanics*. 2020; 101:109648. ISSN 0021-9290. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2020.109648>
54. KIM, E., GUILAK, F., HAIDER, MA. The dynamic mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions under cyclic compressive loading. *J Biomech Eng*. 2008; 130(6):061009. ISSN 1528-8951. Disponibil: DOI: 10.1115/1.2978991
55. NACHER, JC., KEITH, B., SCHWARTZ, JM. Network medicine analysis of chondrocyte proteins towards new treatments of osteoarthritis. *Proc Biol Sci*. 2014; 281(1778):20132907. ISSN 0962-8452. Disponibil: DOI: 10.1098/rspb.2013.2907
56. MOW, VC., GUO, XE. Mechano-electrochemical properties of articular cartilage: their inhomogeneities and anisotropies. *Annu Rev Biomed Eng*. 2002; 4:175-209. ISSN1523-9829. Disponibil: DOI: 10.1146/annurev.bioeng.4.110701.120309
57. MUSUMECI, G. The effect of mechanical loading on articular cartilage. *J. Funct. Morphol. Kinesiol*. 2016; 1:154–161. ISSN 2411-5142. Disponibil: DOI: 10.3390/jfmk1020154
58. LUO, Y., SINKEVICIUTE, D., HE, Y., KARSDAL, M., HENROTIN, Y., MOBASHERI, A., et al. The minor collagens in articular cartilage. *Protein Cell*. 2017; 8(8), pp. 560-572. ISSN 1674-800X. Disponibil: DOI: 10.1007/s13238-017-0377-7
59. HAN, B., WANG, C., PATEL, P., ADAMS, SM., DOYRAN, B., NIA, HT., et al. Decorin regulates the aggrecan network integrity and biomechanical functions of cartilage extracellular matrix. *ACS Nano*. 2019; 13(10), pp. 11320-11333. ISSN 1936-0851. Disponibil: DOI: 10.1021/acsnano.9b04477
60. O'HARA, BP., URBAN, JP., MAROUDAS, A. Influence of cyclic loading on the nutrition of articular cartilage. *Ann Rheum Dis*. 1990; 49(7), pp. 536-9. ISSN 0003-4967. Disponibil: DOI: 10.1136/ard.49.7.536
61. BOBICK, BE., CHEN, FH., LE, AM., TUAN, RS. Regulation of the chondrogenic phenotype in culture. *Birth. Defects Res. C. Embryo. Today*. 2009; 87(4), pp. 351-71. ISSN 1542-9768. Disponibil: DOI: 10.1002/bdrc.20167
62. CAMARERO-ESPINOSA, S., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., FOSTERAC, EJ., WEDER, C. Articular cartilage: from formation to tissue engineering. *Biomater. Sci*. 2016; 4(5), pp. 734-767. ISSN 2047-4830. Disponibil: DOI: 10.1039/c6bm00068a
63. LEE, MS., STEBBINS, MJ., JIAO, H., HUANG, HC., LEIFERMAN, EM., WALCZAK, BE., et al. Comparative evaluation of isogenic mesodermal and ectomesodermal chondrocytes from human iPSCs for cartilage regeneration. *Sci Adv*. 2021; 7(21):eabf0907. ISSN 2375-2548. Disponibil: DOI: 10.1126/sciadv.abf0907
64. ZHANG, Y., ANNUSVER, K., SUNADOME, K., KAMENEVA, P., EDWARDS, S., LEI, G., et al. Epiphyseal cartilage formation involves differential dynamics of various cellular populations during embryogenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8:122. ISSN 2296-634X. Disponibil: DOI: 10.3389/fcell.2020.00122
65. MOSKALEWSKI, S., HYC, A., JANKOWSKA-STEIFER, E., OSIECKA-IWAN, A. Formation of synovial joints and articular cartilage. *Folia Morphol*. 2013; 72(3), pp. 181-7. ISSN 0015-5659. Disponibil: DOI: 10.5603/fm.2013.0031
66. TIKU, ML., SABAAWY, HE. Cartilage regeneration for treatment of osteoarthritis: a paradigm for nonsurgical intervention. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2015; 7(3), pp. 76-87. ISSN 1759-720X. Disponibil: DOI: 10.1177/1759720X15576866

67. NEJADNIK, H., HUI, JH., FENG CHOONG, EP., TAI, BC., LEE, EH. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med.* 2010; 38(6), pp. 1110-6. ISSN 0363-5465. Disponibil: DOI: 10.1177/0363546509359067
68. MAENOHARA, Y., CHIJIMATSU, R., TACHIBANA, N., UEHARA, K., XUAN, F., MORI, D., et al. Lubricin contributes to homeostasis of articular cartilage by modulating differentiation of superficial zone cells. *J Bone Miner Res.* 2021; 36(4), pp. 792-802. ISSN 0884-0431. Disponibil: DOI: 10.1002/jbmr.4226
69. RAJAGOPAL, K., RAMESH, S., WALTER, NM., ARORA, A., KATTI, DS., MADHURI, V. *In vivo* cartilage regeneration in a multi-layered articular cartilage architecture mimicking scaffold. *Bone Joint Res.* 2020; 9(9), pp. 601-612. ISSN 2046-3758. Disponibil: DOI: 10.1302/2046-3758.99.BJR-2019-0210.R2
70. IQBAL, SM., LEONARD, C., REGMI, SC., DE RANTERE, D., TAILOR, P., REN, G., et al. Lubricin/proteoglycan 4 binds to and regulates the activity of toll-like receptors *in vitro*. *Sci Rep.* 2016; 6:18910. ISSN 2045-2322. Disponibil: DOI: 10.1038/srep18910
71. MUSUMECI, G., TROVATO, FM., PICHLER, K., WEINBERG, AM., LORETO, C., CASTROGIOVANNI, P. Extra-virgin olive oil diet and mild physical activity prevent cartilage degeneration in an osteoarthritis model: an *in vivo* and *in vitro* study on lubricin expression. *J. Nutr. Biochem.* 2013; 24(12), pp. 2064-2075. ISSN 0955-2863. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.07.007>
72. WEIZEL, A., DISTLER, T., SCHNEIDEREIT, D., FRIEDRICH, O., BRÄUER, L., PAULSEN, F., et al. Complex mechanical behavior of human articular cartilage and hydrogels for cartilage repair. *Acta Biomater.* 2020; 118:113-128. ISSN 1742-7061. Disponibil: DOI: 10.1016/j.actbio.2020.10.025
73. FARNHAM, MS., LARSON, RE., BURRIS, DL., PRICE, C. Effects of mechanical injury on the tribological rehydration and lubrication of articular cartilage. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2020; 101:103422. ISSN 1751-6161. Disponibil: DOI: 10.1016/j.jmbbm.2019.103422
74. FILBAY, SR., ROOS, EM., FROBELL, RB., ROEMER, F., RANSTAM, J., LOHMANDER, LS. Delaying ACL reconstruction and treating with exercise therapy alone may alter prognostic factors for 5-year outcome: an exploratory analysis of the KANON trial. *Br J Sports Med.* 2017; 51(22), pp. 1622-1629. ISSN 0306-3674. Disponibil: DOI: 10.1136/bjsports-2016-097124
75. KENNEDY, MI., STRAUSS, M., LAPRADE, RF. Injury of the meniscus root. *Clin Sports Med.* 2020; 39(1), pp. 57-68. ISSN 1050-642X. Disponibil: DOI: 10.1016/j.csm.2019.08.009
76. KIM, KK., KIM, TH., KIM, DY., CHOI, JK. Bilateral congenital absence of the anterior cruciate ligament associated with bilateral knee and hip osteoarthritis: Case report. *Int J Surg Case Rep.* 2020; 72:313-317. ISSN 2210-2612. Disponibil: DOI: 10.1016/j.ijscr.2020.05.099
77. JEONG, C., INAN, M., RIDDLE, EC., GABOS, PG., BOWEN, JR. Knee arthritis in congenital short femur after Wagner lengthening. *Clin Orthop Relat Res.* 2006; 451:177-81. ISSN 0009-921X. Disponibil: DOI: 10.1097/01.blo.0000229295.44592.30
78. O'DRISCOLL, SW., KEELEY, FW., SALTER, RB. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am.* 1986; 68(7), pp. 1017-35. ISSN 0375-9229.
79. KELWICK, R., DESANLIS, I., WHEELER, GN., EDWARDS, DR. The ADAMTS (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) family. *Genome Biol.* 2015; 16(1), pp. 113. ISSN 1474-760X. Disponibil: DOI: 10.1186/s13059-015-0676-3

80. GOMIS-RÜTH, FX. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J Biol Chem.* 2009; 284(23), pp. 15353-7. ISSN 0021-9258. Disponibil: DOI: 10.1074/jbc.R800069200
81. APTE, SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem.* 2009; 284(46), pp. 31493-7. ISSN 0021-9258. Disponibil: DOI: 10.1074/jbc.R109.052340
82. STANTON, H., MELROSE, J., LITTLE, CB., FOSANG, AJ. Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1812(12), pp. 1616-29. ISSN 0006-3002. Disponibil: DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.08.009
83. COLIGE, A., VANDENBERGHE, I., THIRY, M., LAMBERT, CA., VAN BEEUMEN, J., LI, SW., et al. Cloning and characterization of ADAMTS-14, a novel ADAMTS displaying high homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3. *J Biol Chem.* 2002; 277(8), pp. 5756-66. ISSN 0021-9258. Disponibil: DOI: 10.1074/jbc.M105601200
84. LIU, CJ., KONG, W., ILALOV, K., YU, S., XU, K., PRAZAK, L., et al. ADAMTS-7: a metalloproteinase that directly binds to and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *FASEB J.* 2006; 20(7), pp. 988-90. ISSN 0892-6638. Disponibil: DOI: 10.1096/fj.05-3877fje
85. MATSUMOTO T, COOPER, GM., GHARAIBEH, B., MESZAROS, LB., LI, G., USAS, A., et al. Blocking VEGF as a potential approach to improve cartilage healing after osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008; 8(4), pp. 316-7. ISSN 1108-7161
86. SAETAN, N., HONSAWEK, S., TANAVALEE, A., YUKTANANDANA, P., MEKNAVIN, S., NGARMUKOS, S., et al. Relationship of plasma and synovial fluid vascular endothelial growth factor with radiographic severity in primary knee osteoarthritis. *Int Orthop.* 2014; 38(5), pp. 1099-104. ISSN 1432-5195. Disponibil: DOI: 10.1007/s00264-013-2192-y
87. LAKIN, BA., SNYDER, BD., GRINSTAFF, MW. Assessing cartilage biomechanical properties: Techniques for evaluating the functional performance of cartilage in health and disease. *Annu Rev Biomed Eng.* 2017; 19:27-55. ISSN1523-9829. Disponibil: DOI: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044525
88. WANG, Y., WEI, L., ZENG, L., HE, D., WEI, X. Nutrition and degeneration of articular cartilage. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2013; 21(8), pp. 1751-62. ISSN 0942-2056. Disponibil: DOI: 10.1007/s00167-012-1977-7
89. ARKILL, KP., WINLOVE, CP. Solute transport in the deep and calcified zones of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008; 16(6), pp. 708-14. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1016/j.joca.2007.10.001
90. POURAN, B., ARBABI, V., BLEYS, RL., RENÉ VAN WEEREN, P., ZADPOOR, AA., WEINANS, H. Solute transport at the interface of cartilage and subchondral bone plate: Effect of micro-architecture. *J Biomech.* 2017; 52:148-154. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1016/j.jbiomech.2016.12.025
91. FAN, X., CRAWFORD, R., XIAO, Y., PRASADAM, I. Macro, micro, and molecular changes of the osteochondral interface in osteoarthritis development. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9:659654. ISSN 2296-634X. Disponibil: DOI: 10.3389/fcell.2021.659654
92. GAO, L., ORTH, P., GOEBEL, LKH., CUCCHIARINI, M., MADRY, H. A novel algorithm for a precise analysis of subchondral bone alterations. *Sci Rep.* 2016; 6:32982. ISSN 2045-2322. Disponibil: DOI: 10.1038/srep32982
93. SLATTERY, C., KWEON, CY. Classifications in brief: Outerbridge classification of chondral lesions. *Clin Orthop Relat Res.* 2018; 476(10), pp. 2101-2104. ISSN 0009-921X. Disponibil: DOI: 10.1007/s11999-0000000000000255

94. WASYŁECZKO, M., SIKORSKA, W., CHWOJNOWSKI, A. Review of synthetic and hybrid scaffolds in cartilage tissue engineering. *Membranes (Basel)*. 2020; 10(11), pp. 348. ISSN 2077-0375. Disponibil: DOI: 10.3390/membranes10110348
95. FALAH, M., NIERENBERG, G., SOUDRY, M., HAYDEN, M., VOLPIN, G. Treatment of articular cartilage lesions of the knee. *Int Orthop*. 2010; 34(5), pp. 621-30. ISSN 1432-5195. Disponibil: DOI: 10.1007/s00264-010-0959-y
96. CAMP, CL., STUART, MJ., KRYCH, AJ. Current concepts of articular cartilage restoration techniques in the knee. *Sports Health*. 2014; 6(3), pp. 265-73. ISSN 1941-7381. Disponibil: DOI: 10.1177/1941738113508917
97. SHAH, MR., KAPLAN, KM., MEISLIN, RJ., BOSCO, JA., 3rd. Articular cartilage restoration of the knee. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2007; 65(1), pp. 51-60. ISSN 1936-9719.
98. TUAN, RS., CHEN, AF., KLATT, BA. Cartilage regeneration. *J Am Acad Orthop Surg*. 2013; 21(5), pp. 303-11. ISSN 1940-5480. Disponibil: DOI: 10.5435/JAAOS-21-05-303
99. BECKMANN, R., LIPPROSS, S., HARTZ, C., TOHIDNEZHAD, M., FERREIRA, MS., NEUSS-STEIN, S., et al. Abrasion arthroplasty increases mesenchymal stem cell content of postoperative joint effusions. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015; 16:250. ISSN 1471-2474. Disponibil: DOI: 10.1186/s12891-015-0705-0
100. BERT, JM., MASCHKA, K. The arthroscopic treatment of unicompartmental gonarthrosis: a five-year follow-up study of abrasion arthroplasty plus arthroscopic debridement and arthroscopic debridement alone. *Arthroscopy*. 1989; 5(1), pp. 25-32. ISSN 0749-8063. Disponibil: DOI: 10.1016/0749-8063(89)90086-8
101. MIRZA, MZ., SWENSON, RD., LYNCH, SA. Knee cartilage defect: marrow stimulating techniques. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2015; 8(4), pp. 451-6. ISSN 1935-9748. Disponibil: DOI: 10.1007/s12178-015-9303-x
102. KRAEUTLER, MJ., ALIBERTI, GM., SCILLIA, AJ., MCCARTY, EC., MULCAHEY, MK. Microfracture versus drilling of articular cartilage defects: A systematic review of the basic science evidence. *Orthop J Sports Med*. 2020; 8(8), pp. 2325967120945313. ISSN 2325-9671. Disponibil: DOI: 10.1177/2325967120945313
103. GAO, L., GOEBEL, LKH., ORTH, P., CUCCHIARINI, M., MADRY, H. Subchondral drilling for articular cartilage repair: a systematic review of translational research. *Dis Model Mech*. 2018; 11(6):dmm034280. ISSN 1754-8403. Disponibil: DOI: 10.1242/dmm.034280
104. TRADATI D, DE LUCA, P., MAIONE, A., UBOLDI, FM., VOLPI, P., DE GIROLAMO, L., BERRUTO, M. AMIC-Autologous matrix-induced chondrogenesis technique in patellar cartilage defects treatment: A retrospective study with a mid-term follow-up. *J Clin Med*. 2020; 9(4):1184. ISSN 2077-0383. Disponibil: DOI: 10.3390/jcm9041184
105. BAŁKOWSKI, P., GRZYWACZ, K., PRUSIŃSKA, A., CIEMNIEWSKA-GORZELA, K., GILLE, J., PIONTEK, T. Autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC) for focal chondral lesions of the knee: A 2-Year follow-up of clinical, proprioceptive, and isokinetic evaluation. *J Funct Biomater*. 2022; 13(4):277. ISSN 2079-4983. Disponibil: <https://doi.org/10.3390/jfb13040277>
106. GIGANTE, A., CECCONI, S., CALCAGNO, S., BUSILACCHI, A., ENEA, D. Arthroscopic knee cartilage repair with covered microfracture and bone marrow concentrate. *Arthrosc Tech*. 2012; 1(2), pp. e175-80. ISSN 2212-6287. Disponibil: DOI: 10.1016/j.eats.2012.07.001
107. STEADMAN, JR., RODKEY, WG., BRIGGS, KK. Microfracture: Its history and experience of the developing surgeon. *Cartilage*. 2010; 1(2), pp. 78-86. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1177/1947603510365533

108. HANTES, ME., FYLLOS, AH. Management of knee cartilage defects with the autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC) technique. In: Zorzi, AR, de Miranda, J. (eds). *Cartilage Repair and Regeneration*. London: IntechOpen; 2017. pp. 163-176. ISBN 978-953-51-3789-4. Disponibil: <https://www.intechopen.com/chapters/57662>
109. GILLE, J., REISS, E., FREITAG, M., SCHAGEMANN, J., STEINWACHS, M., PIONTEK, T., REISS, E. Autologous matrix-induced chondrogenesis for treatment of focal cartilage defects in the knee: A follow-up study. *Orthop J Sports Med*. 2021; 9(2), pp. 2325967120981872. ISSN 2325-9671. Disponibil: DOI: 10.1177/2325967120981872
110. LEE, YH., SUZER, F., THERMANN, H. Autologous matrix-induced chondrogenesis in the knee: A review. *Cartilage*. 2014; 5(3), pp. 145-53. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1177/1947603514529445
111. CHEN CHOU, AC., TJOEN LIE, DT. Clinical outcomes of an all-arthroscopic technique for single-stage autologous matrix-induced chondrogenesis in the treatment of articular cartilage lesions of the knee. *Arthrosc Sports Med Rehabil*. 2020; 2(4), pp. e353-e359. ISSN 2666-061X. Disponibil: DOI: 10.1016/j.asmr.2020.05.006
112. OUTERBRIDGE, HK., OUTERBRIDGE, AR., OUTERBRIDGE, RE. The use of a lateral patellar autologous graft for the repair of a large osteochondral defect in the knee. *J Bone Joint Surg Am*. 1995; 77(1), pp. 65-72. ISSN 0375-9229. Disponibil: DOI: 10.2106/00004623-199501000-00009
113. HANGODY, L., RÁTHONYI, GK., DUSKA, Z., VÁSÁRHELYI, G., FÜLES, P., MÓDIS, L. Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am*. 2004; 86(1), pp. 65-72. ISSN 0375-9229.
114. ROWLAND, R., COLELLO, M., WYLAND, DJ. Osteochondral autograft transfer procedure: arthroscopic technique and technical pearls. *Arthrosc Tech*. 2019; 8(7), pp. e713-e719. ISSN 2212-6287. Disponibil: DOI: 10.1016/j.eats.2019.03.006
115. INDERHAUG, E., SOLHEIM, E. Osteochondral autograft transplant for knee articular cartilage defects. *JBJS Essent Surg Tech*. 2019; 9(4), pp. e34.1-2. ISSN 2160-2204. Disponibil: DOI: 10.2106/JBJS.ST.18.00113
116. GUDAS, R., KALESINSKAS, RJ., KIMTYS, V., STANKEVICIUS, E., TOLIUSIS, V., BERNOTAVICIUS, G., SMAILY, A. A prospective randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint in young athletes. *Arthroscopy*. 2005; 21(9), pp. 1066-75. ISSN 0749-8063. Disponibil: DOI: 10.1016/j.arthro.2005.06.018
117. RICHTER, DL., SCHENCK, RC. JR, WASCHER, DC., TREME, G. Knee articular cartilage repair and restoration techniques: A review of the literature. *Sports Health*. 2016; 8(2), pp. 153-60. ISSN 1941-7381. Disponibil: DOI: 10.1177/1941738115611350
118. ARZI, B., DURAIN, GD., LEE, CA., HUEY, DJ., BORJESSON, DL., MURPHY, BG., et al. Cartilage immunoprivilege depends on donor source and lesion location. *Acta Biomater*. 2015; 23:72-81. ISSN 1742-7061. Disponibil: DOI: 10.1016/j.actbio.2015.05.025
119. GRACITELLI, GC., TIRICO, LE., MCCAULEY, JC., PULIDO, PA., BUGBEE, WD. Fresh osteochondral allograft transplantation for fractures of the knee. *Cartilage*. 2017; 8(2), pp. 155-161. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1177/1947603516657640
120. HEVESI, M., DENBEIGH, JM., PAGGI, CA., GALEANO-GARCES, C., BAGHERI, L., LARSON, AN., et al. Fresh osteochondral allograft transplantation in the knee: A viability and histologic analysis for optimizing graft viability and expanding existing standard processed graft resources using a living donor cartilage program. *Cartilage*. 2021; 13(1), pp. 948S-956S. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1177/1947603519880330

121. COOK, JL., STANNARD, JP., STOKER, AM., BOZYNSKI, CC., KUROKI, K., COOK, CR., PFEIFFER, FM. Importance of donor chondrocyte viability for osteochondral allografts. *Am J Sports Med.* 2016; 44(5), pp. 1260-8. ISSN 0363-5465. Disponibil: DOI: 10.1177/0363546516629434
122. GHAZAVI, MT., PRITZKER, KP., DAVIS, AM., GROSS, AE. Fresh osteochondral allografts for post-traumatic osteochondral defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br.* 1997; 79(6), pp. 1008-13. ISSN 0301-620X. Disponibil: DOI: 10.1302/0301-620x.79b6.7534
123. KOH, JL., KOWALSKI, A., LAUTENSCHLAGER, E. The effect of angled osteochondral grafting on contact pressure: a biomechanical study. *Am J Sports Med.* 2006; 34(1), pp. 116-9. ISSN 0363-5465. Disponibil: DOI: 10.1177/0363546505281236
124. KOH, JL., WIRSING, K., LAUTENSCHLAGER, E., ZHANG, LO. The effect of graft height mismatch on contact pressure following osteochondral grafting: a biomechanical study. *Am J Sports Med.* 2004; 32(2), pp. 317-20. ISSN 0363-5465. Disponibil: DOI: 10.1177/0363546503261730
125. WILLIAMS, RJ. 3rd, RANAWAT, AS., POTTER, HG., CARTER, T., WARREN, RF. Fresh stored allografts for the treatment of osteochondral defects of the knee. *J Bone Joint Surg Am.* 2007; 89(4), pp. 718-26. ISSN 0375-9229. Disponibil: DOI: 10.2106/JBJS.F.00625
126. LEVY, YD., GÖRTZ, S., PULIDO, PA., MCCAULEY, JC., BUGBEE, WD. Do fresh osteochondral allografts successfully treat femoral condyle lesions? *Clin Orthop Relat Res.* 2013; 471(1), pp. 231-7. ISSN 0009-921X. Disponibil: DOI: 10.1007/s11999-012-2556-4
127. BALAZS, GC., WANG, D., BURGE, AJ., SINATRO, AL., WONG, AC., WILLIAMS, RJ. 3rd. Return to play among elite basketball players after osteochondral allograft transplantation of full-thickness cartilage lesions. *Orthop J Sports Med.* 2018; 6(7), pp. 2325967118786941. ISSN 2325-9671. Disponibil: DOI: 10.1177/2325967118786941
128. KON, E., FILARDO, G., DI MARTINO, A., MARCACCI, M. ACI and MACI. *J Knee Surg.* 2012; 25(1), pp. 17-22. ISSN 1938-2480. Disponibil: DOI: 10.1055/s-0031-1299651
129. PANAGOPOULOS, A., VAN NIEKERK, L., TRIANTAFILLOPOULOS, I. Autologous chondrocyte implantation for knee cartilage injuries: moderate functional outcome and performance in patients with high-impact activities. *Orthopedics.* 2012; 35(1):e6-14. ISSN 0147-7447. Disponibil: DOI: 10.3928/01477447-20111122-07
130. GIGLIO, PN., LIZIER, NF., LEVY, D., SOBRADO, MF., GOBBI, RG., PÉCORÁ, JR., et al. Autologous chondrocyte implantation in brazil. *Acta Ortop Bras.* 2020; 28(3), pp. 131-136. ISSN 1413-7852. Disponibil: DOI: 10.1590/1413-785220202803226503
131. BENTLEY, G., BIANI, LC., CARRINGTON, RW., AKMAL, M., GOLDBERG, A., WILLIAMS, AM., et al. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg Br.* 2003; 85(2), pp. 223-30. ISSN 0301-620X. Disponibil: DOI: 10.1302/0301-620x.85b2.13543
132. BERNINGER, MT., WEXEL, G., RUMMENY, EJ., IMHOFF, AB., ANTON, M., HENNING, TD., VOGT, S. Matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation for remodeling and repair of chondral defects in a rabbit model. *J Vis Exp.* 2013; (75), pp. e4422. ISSN 1940-087X. Disponibil: DOI: 10.3791/4422
133. MEDVEDEVA, EV., GREBENIK, EA., GORNOSTAEVA, SN., TELPUHOV, VI., LYCHAGIN, AV., TIMASHEV, PS., CHAGIN, AS. Repair of damaged articular cartilage: current approaches and future directions. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(8):2366. ISSN 1422-0067. Disponibil: DOI: 10.3390/ijms19082366
134. OSSENDORF, C., STEINWACHS, MR., KREUZ, PC., OSTERHOFF, G., LAHM, A., DUCOMMUN, PP., ERGGELET, C. Autologous chondrocyte implantation (ACI) for the

- treatment of large and complex cartilage lesions of the knee. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol.* 2011; 3:11. ISSN 1758-2555. Disponibil: DOI: 10.1186/1758-2555-3-11
135. AKGUN, I., UNLU, MC., ERDAL, OA., OGUT, T., ERTURK, M., OVALI, E., et al. Matrix-induced autologous mesenchymal stem cell implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation in the treatment of chondral defects of the knee: a 2-year randomized study. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2015; 135(2), pp. 251-263. ISSN 14343916. Disponibil: DOI: 10.1007/s00402-014-2136-z
136. RICHTER, M., ZECH, S., MEISSNER, S., NAEF, I. Comparison matrix-associated stem cell transplantation (MAST) with autologous matrix induced chondrogenesis plus peripheral blood concentrate (AMIC+PBC) in chondral lesions at the ankle-A clinical matched-patient analysis. *Foot Ankle Surg.* 2020; 26(6), pp. 669-675. ISSN 1268-7731. Disponibil: DOI: 10.1016/j.fas.2019.08.009
137. TAKAHASHI, T., SATO, M., TOYODA, E., MAEHARA, M., TAKIZAWA, D., MARUKI, H., et al. Rabbit xenogeneic transplantation model for evaluating human chondrocyte sheets used in articular cartilage repair. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018; 12(10), pp. 2067-2076. ISSN 1932-7005. Disponibil: DOI: 10.1002/term.2741
138. MALINAUSKAS, M., JANKAUSKAITE, L., AUKSTIKALNE, L., DABASINSKAITE, L., RIMKUNAS, A., MICKEVICIUS, T., et al. Cartilage regeneration using improved surface electrospun bilayer polycaprolactone scaffolds loaded with transforming growth factor-beta 3 and rabbit muscle-derived stem cells. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022; 10:971294. ISSN 2296-4185. Disponibil: DOI: 10.3389/fbioe.2022.971294
139. BOOPALAN, PR., SATHISHKUMAR, S., KUMAR, S., CHITTARANJAN, S. Rabbit articular cartilage defects treated by allogenic chondrocyte transplantation. *Int Orthop.* 2006; 30(5), pp. 357-61. ISSN 1432-5195. Disponibil: DOI: 10.1007/s00264-006-0120-0
140. Tehnici actuale de anestezie generală la animale. Disponibil: <https://ro.scribd.com/doc/195325286/Tehnici-actuale-de-anestezie-general%C4%83-la-animale>
141. NINU, AR., SWAPAN, KM., SHIVA KUMAR, MU., SANDEEP, K., SANGEETHA, P., DEEPIKA, K., SAURABH, G. Isolation, proliferation, characterization and *in vivo* osteogenic potential of bone-marrow derived mesenchymal stem cells (rBMSC) in rabbit model. *Indian J Exp Biol.* 2017; 55(2), pp. 79-87. ISSN: 0019-5189. Disponibil: <https://www.researchgate.net/publication/315714905>
142. GUGJOO, MB., AMARPAL, KINJAVDEKAR P., AITHAL KP., ANSARI, MM., PAWDE, AM., SHARMA GT. Isolation, culture and characterization of new zealand white rabbit mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *AJAVA.* 2015; 10(10), pp. 537-548. ISSN 1938-3886. Disponibil: DOI: 10.3923/ajava.2015.537.548
143. BUTUCEL, P., NACU, V., LISNIC, V. Bone marrow-derived mononuclear cells therapy for ischemic stroke. *Mold Med J.* 2019; 62(4)61-69. ISSN 2537-6373. Disponibil: DOI: 10.5281/zenodo.3556512
144. PANADERO, JA., LANCEROS-MENDEZ, S., RIBELLES, JL. Differentiation of mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering: Individual and synergetic effects of three-dimensional environment and mechanical loading. *Acta Biomater.* 2016; nr. 33, pp. 1-12. ISSN 1742-7061. Disponibil: DOI: 10.1016/j.actbio.2016.01.037
145. GALE, AL., LINARDI, RL., MCCLUNG, G., MAMMONE, RM., ORTVED, KF. comparison of the chondrogenic differentiation potential of equine synovial membrane-derived and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Front Vet Sci.* 2019; 6:178. ISSN 2297-1769. Disponibil: DOI: 10.3389/fvets.2019.00178

146. KALAMEGAM, G., MEMIC, A., BUDD, E., ABBAS, M., MOBASHERI, A. A comprehensive review of stem cells for cartilage regeneration in osteoarthritis. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1089:23-36. ISSN 0065-2598. Disponibil: DOI: 10.1007/5584_2018_205
147. ZHAO, L., KAYE, AD., ABD-ELSAYED, A. Stem cells for the treatment of knee osteoarthritis: a comprehensive review. *Pain Physician.* 2018; 21(3), pp. 229-242. ISSN 2150-1149.
148. IAQUINTA, MR., MAZZONI, E., BONONI, I., ROTONDO, JC., MAZZIOTTA, C., MONTESI, M., et al. Adult stem cells for bone regeneration and repair. *Front Cell Dev Biol.* 2019; 7:268. ISSN 2296-634X. Disponibil: DOI: 10.3389/fcell.2019.00268
149. KANGARI, P., TALAEI-KHOZANI, T., RAZEGHIAN-JAHROMI, I., RAZMKHAH, M. Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects. *Stem Cell Res Ther.* 2020; 11(1):492. ISSN 1757-6512. Disponibil: DOI: 10.1186/s13287-020-02001-1
150. JIANG, Y., ZHANG, P., ZHANG, X., LV, L., ZHOU, Y. Advances in mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of osteoporosis. *Cell Prolif.* 2021; 54(1):e12956. ISSN 0960-7722. Disponibil: DOI: 10.1111/cpr.12956
151. **COBZAC, V.**, MOSTOVEI, A., JIAN, M., NACU, V. An efficient procedure of isolation, cultivation and identification of bone marrow mesenchymal stem cells. *Mold Med J.* 2019; 62(1), pp. 35-41. ISSN 2537-6373. Disponibil: DOI: 10.5281/zenodo.2590011
152. MCLAUCHLAN, D., ROBERTSON, NP. Stem cells in the treatment of central nervous system disease. *J Neurol.* 2018; 265(4), pp. 984-986. ISSN:0028-3878. Disponibil: DOI: 10.1007/s00415-018-8818-7
153. ZHANG L, MA, XJ., FEI, YY., HAN, HT., XU, J., CHENG, L., LI, X. Stem cell therapy in liver regeneration: Focus on mesenchymal stem cells and induced pluripotent stem cells. *Pharmacol Ther.* 2022; 232:108004. ISSN 0163-7258. Disponibil: DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.108004
154. JIAN. M, **COBZAC. V.**, VARTIC, V., NACU, V. Hepatocytes isolation from adult rats for liver recellularization. *Mold Med J.* 2019; 62(1), pp. 13-16. ISSN 2537-6373. Disponibil: DOI: 10.5281/zenodo.2589998
155. MOHAMMED, RH., JASIM, AM., ALMANSEKANAA, LH. Isolation and characterization of bone marrow mesenchymal stem cells from rat and rabbit: A modified method. *Karbala Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2012; 3(3), pp. 44-51. ISSN 7027-2221. Disponibil: <https://www.researchgate.net/publication/324136386>
156. LIU, H., WEI, LK., JIAN, XF., HUANG, J., ZOU, H., ZHANG, SZ., YUAN, GH. Isolation, culture and induced differentiation of rabbit mesenchymal stem cells into osteoblasts. *Exp Ther Med.* 2018; 15(4), pp. 3715-3724. ISSN 1792-1015. Disponibil: DOI: 10.3892/etm.2018.5894
157. DRELA. K., STANASZEK, L., SNIÖCH, K., KUCZYNSKA, Z., WROBEL, M., SARZYNSKA, S., et al. Bone marrow-derived from the human femoral shaft as a new source of mesenchymal stem/stromal cells: an alternative cell material for banking and clinical transplantation. *Stem Cell Res Ther.* 2020; 11(1):262. ISSN 1757-6512. Disponibil: DOI: 10.1186/s13287-020-01697-5
158. EÇA, LP., RAMALHO, RB., OLIVEIRA, IS., GOMES, PO., PONTES, P., FERREIRA, AT., MAZZETTI, MP. Comparative study of technique to obtain stem cells from bone marrow collection between the iliac crest and the femoral epiphysis in rabbits. *Acta Cir Bras.* 2009; 24(5), pp. 400-4. ISSN 0102-8650. Disponibil: DOI: 10.1590/s0102-86502009000500011
159. DANILOV, L., ABABII, I., GHINDA, S., NACU, V., MANIUC, M., ABABII, P., DIDENCU, A. Complex conservative treatment of chronic tonsillitis in children using local

immunostimulation (autologous mononuclear cells). *IEEE: E-Health and Bioengineering Conference (EHB), 22-24 June 2017, Sinaia, Romania*. 2017; p. 361-364. ISBN:978-1-5386-0358-1. Disponibil: DOI: 10.1109/EHB.2017.7995436

160. NADERI, MM., SARVARI, A., MILANIFAR, A., BOROUJENI, SB., AKHONDI, MM. Regulations and ethical considerations in animal experiments: international laws and islamic perspectives. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2012; 4(3), pp. 114-20. ISSN 2008-2835. Disponibil: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3558218/>

161. PATTERSON, TE., BOEHM, C., NAKAMOTO, C., ROZIC, R., WALKER, E., PIUZZI, NS., MUSCHLER, GF. The efficiency of bone marrow aspiration for the harvest of connective tissue progenitors from the human iliac crest. *J Bone Joint Surg Am*. 2017; 99(19), pp. 1673-1682. ISSN 0375-9229. Disponibil: DOI: 10.2106/JBJS.17.00094

162. COPAY, AG., EYBERG, B., CHUNG, AS., ZURCHER, KS., CHUTKAN, N., SPANGEHL, MJ. Minimum clinically important difference: current trends in the orthopaedic literature, Part II: Lower extremity: A systematic review. *JBJS Rev*. 2018; 6(9), pp. e2. ISSN 2329-9185. Disponibil: DOI: 10.2106/JBJS.RVW.17.00160

163. NACU, V. *Grefe tisulare în optimizarea regenerării osoase posttraumatice dereglate*. Chişinău. Tipografia Sirius; 2010

164. **COBZAC, V.**, VERESTIUC, L., JIAN, M., NACU, V. Chondrocytes isolation from hyaline cartilage by continuous monitoring method. *Mold Med J*. 2021; 64(6), pp. 13-19. ISSN 2537-6373. Disponibil: <https://doi.org/10.52418/moldovan-med-j.64-6.21.03>

165. SCHMITZ, N., LAVERTY, S., KRAUS, VB., AIGNER, T. Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010; 18(3), pp. S113-6. ISSN 1063-4584. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1016/j.joca.2010.05.026

166. **COBZAC V**, JIAN, M., GLOBALA, T., NACU, V. The cartilaginous tissue regeneration on weight bearing and non-weight bearing surfaces of the knee. In: Tiginyanu I, Sontea V, Railean S. (Eds.) *ICNBME 2021: The 5th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, Proceedings of ICNBME-2021, 3-5 noiembrie 2021, Chisinau, Moldova*. IFMBE Proceedings 87; 2022. p. 334–341. ISSN 1680-0737. Disponibil: https://doi.org/10.1007/978-3-030-92328-0_44

167. **COBZAC, V.**, JIAN, M., GLOBALA, T., NACU, V. Joint cartilage experimental defect regeneration by hierarchic biphasic combined grafts. *Mold Med J*. 2022; 66(2), pp. 20-29. ISSN 2537-6373. Disponibil: <https://doi.org/10.52418/moldovan-med-j.65-2.22.03>

168. JIAN, M., **COBZAC, V.**, MOGHILDEA, I., POPESCU, V., NACU, V. Techniques of liver decellularization. *Mold Med J*. 2018; 61(4), pp. 21-24. ISSN 2537-6373. Disponibil: DOI: 10.5281/zenodo.2222303

169. SHIKIMAKA, O., BIVOL, M., SAVA, BA., DUMITRU, M., TARDEI, C., SBARCEA, BG., GRABCO, D., PYRTSAC, C., TOPAL, D., PRISACARU, A., **COBZAC, V.**, NACU, V. Hydroxyapatite–bioglass nanocomposites: Structural, mechanical, and biological aspects. *Beilstein J. Nanotechnol*. 2022; 13:1490–1504. ISSN 2190-4286. Disponibil: DOI: 10.3762/bjnano.13.123

170. **COBZAC, V.**, VEREȘTIUC, L., JIAN, M., NACU V. Assessment of ionic and anionic surfactants effect on demineralized osteochondral tissue. In: *International Conference on Innovative Research - ICIR EUROINVENT 2019 16–17 Mai 2019, Iasi, Romania*. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering; 2019; 572:012084. ISSN 1757-899X. Disponibil: DOI: 10.1088/1757-899X/572/1/012084

171. BRANISTE. T., **COBZAC, V.**, ABABII, P., PLESCO, I., RAEVSCHI, S., DIDENCU, A., MANIUC, M., et al. Mesenchymal stem cells proliferation and remote manipulation upon

- exposure to magnetic semiconductor nanoparticles. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2020; 25:e00435. ISSN 2215-017X. Disponibil: DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00435
172. CAO, R., ZHAN, A., CI, Z., WANG, C., SHE, Y., XU, Y., et al. A biomimetic biphasic scaffold consisting of decellularized cartilage and decalcified bone matrixes for osteochondral defect repair. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9:639006. ISSN 2296-634X. Disponibil: DOI: 10.3389/fcell.2021.639006
173. ZHANG, W., ZHANG, F., SHI, H., TAN, R., HAN, S., YE, G., et al. Comparisons of rabbit bone marrow mesenchymal stem cell isolation and culture methods *in vitro*. *PLoS One*. 2014; 9(2), pp. e88794. ISSN 1932-6203. Disponibil: DOI: 10.1371/journal.pone.0088794
174. JONES, EA., KINSEY, SE., ENGLISH, A., JONES, RA., STRASZYNSKI, L., MEREDITH, DM., MARKHAM, AF., et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*. 2002; 46(12), pp. 3349-60. ISSN 2326-5191. Disponibil: DOI: 10.1002/art.10696
175. NASEF, A., FOUILLARD, L., EL-TAGURI, A., LOPEZ, M. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Libyan J Med*. 2007; 2(4), pp. 190-201. ISSN 2079-1224. Disponibil: DOI: 10.4176/070705
176. BONAB, MM., ALIMOGHADDAM, K., TALEBIAN, F., GHAFFARI, SH., GHAVAMZADEH, A., NIKBIN, B. Aging of mesenchymal stem cell *in vitro*. *BMC Cell Biol*. 2006; 7:14. ISSN 2661-8850. Disponibil: DOI: 10.1186/1471-2121-7-14
177. HOEMANN, C., KANDEL, R., ROBERTS, S., SARIS, DB., CREEMERS, L., MAINIL-VARLET, P., et al. International cartilage repair society (ICRS) recommended guidelines for histological endpoints for cartilage repair studies in animal models and clinical trials. *Cartilage*. 2011; 2(2), pp. 153-72. ISSN 1947-6035. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1177/1947603510397535
178. JIAN, M., **COBZAC, V.**, NACU, V. The isolation of fibroblasts by volumetric regulation cycles. In: *Tiginyanu I, Sontea V, Railean S. (Eds.) ICNBME 2021: 5th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, Proceedings of ICNBME-2021, 3-5 noiembrie 2021, Chisinau, Moldova*. IFMBE Proceedings 87; 2022. p. 325–333. ISSN 1680-0737. Disponibil: https://doi.org/10.1007/978-3-030-92328-0_43
179. ALBRECHT, C., TICHY, B., NÜRNBERGER, S., HOSINER, S., ZAK, L., ALDRIAN, S., MARLOVITS, S. Gene expression and cell differentiation in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts: a comparative study. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011; 19(10), pp. 1219-27. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1016/j.joca.2011.07.004
180. ORTH, P., MADRY, H. Complex and elementary histological scoring systems for articular cartilage repair. *Histol Histopathol*. 2015; 30(8), pp. 911-9. ISSN 0213-3911. Disponibil: DOI: 10.14670/HH-11-620
181. MADRY, H., VAN DIJK, CN., MUELLER-GERBL, M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010; 18(4), pp. 419-33. ISSN 0942-2056. Disponibil: DOI: 10.1007/s00167-010-1054-z
182. HARRIS, JD., SISTON, RA., PAN, X., FLANIGAN, DC. Autologous chondrocyte implantation: a systematic review. *J Bone Joint Surg Am*. 2010; 92(12), pp. 2220-33. ISSN 0375-9229. Disponibil: DOI: 10.2106/JBJS.J.00049
183. SALZMANN, GM., CALEK, AK., PREISS, S. A second-generation autologous minced cartilage repair technique. *Arthrosc Tech*. 2017; 6(1), pp. e127-e131. ISSN 2212-6287. Disponibil: DOI: 10.1016/j.eats.2016.09.011
184. YONENAGA, K., NISHIZAWA, S., FUJIHARA, Y., ASAWA, Y., SANSHIRO, K., NAGATA, S., et al. The optimal conditions of chondrocyte isolation and its seeding in the

- preparation for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010; 16(6), pp. 1461-9. ISSN 1937-3392. Disponibil: DOI: 10.1089/ten.TEC.2009.0597
185. VILLAR-SUÁREZ, V., CALLES-VENAL, I., BRAVO, IG., FERNÁNDEZ-ALVAREZ, JG., FERNÁNDEZ-CASO, M., VILLAR-LACILLA, JM. Differential behavior between isolated and aggregated rabbit auricular chondrocytes on plastic surfaces. *J Biomed Biotechnol*. 2004; 2004(2), pp. 86-92. ISSN 1110-7243. Disponibil: DOI: 10.1155/S1110724304312039
186. OSENI, AO., BUTLER, PE., SEIFALIAN, AM. Optimization of chondrocyte isolation and characterization for large-scale cartilage tissue engineering. *J Surg Res*. 2013; 181(1), pp. 41-8. ISSN 0022-4804. Disponibil: DOI: 10.1016/j.jss.2012.05.087
187. NARANDA, J., GRADIŠNIK, L., GORENJAK, M., VOGRIN, M., MAVER, U. Isolation and characterization of human articular chondrocytes from surgical waste after total knee arthroplasty (TKA). *PeerJ*. 2017; 5:e3079. ISSN 2167-8359. Disponibil: DOI: 10.7717/peerj.3079
188. MUHAMMAD SA, NORDIN, N., HUSSIN, P., MEHAT, MZ., TAN, SW., FAKURAZI, S. Optimization of protocol for isolation of chondrocytes from human articular cartilage. *Cartilage*. 2021; 13(2), pp. 872S-884S. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1177/1947603519876333
189. JIAN, M., **COBZAC, V.**, MOSTOVEI, A., NACU, V. The procedure of bone cells obtaining, culture and identification. In: *Tiginyanu I, Sontea V, Railean S. (Eds.) ICNBME 2019: 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, Proceedings of ICNBME-2019, 18-21 septembrie 2019, Chisinau, Moldova*. IFMBE Proceedings 77; 2020. p. 595–599. ISSN 1680-0737. Disponibil: https://doi.org/10.1007/978-3-030-31866-6_106
190. BRANISTE, T., **COBZAC V.**, ABABII, P., PLESCO, I., RAEVSCHI, S., DIDENCU, A., MANIUC, M., et al. The influence of semiconductor nanoparticles upon the activity of mesenchymal stem cells. In: *Tiginyanu I, Sontea V, Railean S. (Eds.) ICNBME 2019: 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, Proceedings of ICNBME-2019, 18-21 septembrie 2019, Chisinau, Moldova*. IFMBE Proceedings 77; 2020. p. 607–611. ISSN 1680-0737. Disponibil: https://doi.org/10.1007/978-3-030-31866-6_108
191. HU, X., ZHANG, W., LI, X., ZHONG, D., LI, Y., LI, J., JIN, R. Strategies to modulate the redifferentiation of chondrocytes. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021; 9:764193. ISSN 2296-4185. Disponibil: DOI: 10.3389/fbioe.2021.764193
192. YAO, Y., WANG, C. Dedifferentiation: inspiration for devising engineering strategies for regenerative medicine. *NPJ Regen Med*. 2020; 5:14. ISSN 2057-3995. Disponibil: DOI: 10.1038/s41536-020-00099-8
193. MANDL, EW., VAN DER VEEN, SW., VERHAAR, JA., VAN OSCH, GJ. Multiplication of human chondrocytes with low seeding densities accelerates cell yield without losing redifferentiation capacity. *Tissue Eng*. 2004; 10(1-2), pp. 109-18. ISSN 2041-7314. Disponibil: DOI: 10.1089/107632704322791754
194. JEYAKUMAR, V., NICULESCU-MORZSA, E., BAUER, C., LACZA, Z., NEHRER, S. Redifferentiation of articular chondrocytes by hyperacute serum and platelet rich plasma in collagen type I hydrogels. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(2):316. ISSN 1422-0067. Disponibil: DOI: 10.3390/ijms20020316
195. BAO, X., LI, Z., LIU, H., FENG, K., YIN, F., LI, H., QIN, J. Stimulation of chondrocytes and chondroinduced mesenchymal stem cells by osteoinduced mesenchymal stem cells under a fluid flow stimulus on an integrated microfluidic device. *Mol Med Rep*. 2018; 17(2), pp. 2277-2288. ISSN 1791-3004. Disponibil: DOI: 10.3892/mmr.2017.8153

196. LEE J, LEE, JY., CHAE, BC., JANG, J., LEE, E., SON, Y. Fully dedifferentiated chondrocytes expanded in specific mesenchymal stem cell growth medium with FGF2 obtains mesenchymal stem cell phenotype *in vitro* but retains chondrocyte phenotype *in vivo*. *Cell Transplant.* 2017; 26(10), pp. 1673-1687. ISSN 0963-6897. Disponibil: DOI: 10.1177/0963689717724794
197. EREMIA, V., NACU, V., PETROVICI, V., BABUCI, S. Particularities of the regenerative processes in the reconstruction of diaphragmatic defects with decelularized grafts of porcine pericardium in experimental model. *Moldavian Journal of Pediatric Surgery.* 2019; nr. 1, pp. 31-40. ISSN 2587-3210. Disponibil: <https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/20545>
198. KALKAN R, NWEKWO, CW., ADALI, T. The use of scaffolds in cartilage regeneration. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2018; 28(4), pp. 343-348. ISSN 1045-4403. Disponibil: DOI: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2018024574
199. ZHANG, H., YANG, L., YANG, XG., WANG, F., FENG, JT., HUA, KC., et al. demineralized bone matrix carriers and their clinical applications: An overview. *Orthop Surg.* 2019; 11(5), pp. 725-737. ISSN 1757-7853. Disponibil: DOI: 10.1111/os.12509
200. LIN, X., CHEN, J., QIU, P., ZHANG, Q., WANG, S., SU, M., et al. Biphasic hierarchical extracellular matrix scaffold for osteochondral defect regeneration. *Osteoarthritis Cartilage.* 2018; 26(3), pp. 433-444. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1016/j.joca.2017.12.001
201. CHENG, A., SCHWARTZ, Z., KAHN, A., LI, X., SHAO, Z., SUN, M., et al. advances in porous scaffold design for bone and cartilage tissue engineering and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2019; 25(1), pp. 14-29. ISSN 1937-3368. Disponibil: DOI: 10.1089/ten.TEB.2018.0119
202. SCOTTI, C., BURAGAS, MS., MANGIAVINI, L., SOSIO, C., DI GIANCAMILLO, A., DOMENEGHINI, C., et al. A tissue engineered osteochondral plug: an *in vitro* morphological evaluation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2007; 15(11), pp. 1363-9. ISSN 0942-2056. Disponibil: DOI: 10.1007/s00167-007-0359-z
203. STAEDT, H., DAU, M., SCHIEGNITZ, E., THIEM, DGE., TAGADIUC, O., PALARIE, V., et al. A collagen membrane influences bone turnover marker *in vivo* after bone augmentation with xenogenic bone. *Head Face Med.* 2020; 16(1), p. 35. ISSN 1746-160X. Disponibil: DOI: 10.1186/s13005-020-00249-9
204. BIOMET MANUFACTURING LLC. *Demineralized osteochondral plug*. Inventor: Troxel K. 29 November 2007. Appl: 25 May 2006. Int. Cl: A61F 2/28. US patent 2007/0276506 A1.
205. WHITE, LJ., TAYLOR, AJ., FAULK, DM., KEANE, TJ., SALDIN, LT., REING, JE., et al. The impact of detergents on the tissue decellularization process: A ToF-SIMS study. *Acta Biomater.* 2017; 50:207-219. ISSN 1742-7061. Disponibil: DOI: 10.1016/j.actbio.2016.12.033
206. SCHNEIDER, C., LEHMANN, J., VAN OSCH, GJ., HILDNER, F., TEUSCHL, A., MONFORTE, X., et al. Systematic comparison of protocols for the preparation of human articular cartilage for use as scaffold material in cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods.* 2016; 22(12), pp. 1095-1107. ISSN 1937-3392. Disponibil: DOI: 10.1089/ten.TEC.2016.0380
207. GILPIN, A., YANG, Y. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:9831534. ISSN 2314-6133. Disponibil: DOI: 10.1155/2017/9831534
208. SUTHERLAND, AJ., BECK, EC., DENNIS, SC., CONVERSE, GL., HOPKINS, RA., BERKLAND, CJ., DETAMORE, MS. Decellularized cartilage may be a chondroinductive material for osteochondral tissue engineering. *PLoS One.* 2015; 10(5), pp. e0121966. ISSN 1932-6203. Disponibil: DOI: 10.1371/journal.pone.0121966

209. PAVLOVSCHI, E., STOIAN, A., VEREGA, G., NACU, V. *In vivo* experimental study of the arterial supply of the rabbit posterior limb. *Mold Med J.* 2021; 64(6), pp. 26-32. ISSN 2537-6373. Disponibil: <https://doi.org/10.52418/moldovan-med-j.64-6.21.05>
210. CHEN, D., ZHANG, Y., LIN, Q., CHEN, D., LI, X., DAI, J., SUN, Y. The effect of cartilage decellularized extracellular matrix-chitosan compound on treating knee osteoarthritis in rats. *PeerJ.* 2021; 9:e12188. ISSN 2167-8359. Disponibil: DOI: 10.7717/peerj.12188
211. DE LAURETO, PP., TOSATTO, L., FRARE, E., MARIN, O., UVERSKY, VN., FONTANA, A. Conformational properties of the SDS-bound state of alpha-synuclein probed by limited proteolysis: unexpected rigidity of the acidic C-terminal tail. *Biochemistry.* 2006; 45(38), pp. 11523-31. ISSN 0006-2960. Disponibil: DOI: 10.1021/bi052614s
212. MALCOVA, T., GLOBALA, L., VASCAN, A., ȚUGUI, E., STOIAN, A., NACU, V. Mechanical and morphological characterization of decellularized umbilical vessels as tissue engineering scaffolds. In: Tiginyanu I, Sontea V, Railean S. (Eds.) *ICNBME 2019: 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, Proceedings of ICNBME-2019, 18-21 septembrie 2019, Chisinau, Moldova.* IFMBE Proceedings 77; 2020. p. 589–593. ISSN 1680-0737. Disponibil: https://doi.org/10.1007/978-3-030-31866-6_105
213. KIM, SS., SONG, CK., SHON, SK., LEE, KY., KIM, CH., LEE, MJ., WANG, L. Effects of human amniotic membrane grafts combined with marrow mesenchymal stem cells on healing of full-thickness skin defects in rabbits. *Cell Tissue Res.* 2009; 336(1), pp. 59-66. ISSN 0302-766X. Disponibil: DOI: 10.1007/s00441-009-0766-1
214. KIM, IG., PARK, SA., LEE, SH., CHOI, JS., CHO, H., LEE, SJ., et al. Transplantation of a 3D-printed tracheal graft combined with iPSC cell-derived MSCs and chondrocytes. *Sci Rep.* 2020; 10:4326. ISSN 2045-2322. Disponibil: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61405-4>
215. MALCOVA, T., NACU, V., ROJNOVEANU, G., ANDRÉE, B., HILFIKER, A. evaluation of ultrasound application for the decellularization of small caliber vessels. In: Tiginyanu I, Sontea V, Railean S. (Eds.) *ICNBME 2021: The 5th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, Proceedings of ICNBME-2021, 3-5 noiembrie 2021, Chisinau, Moldova.* IFMBE Proceedings 87; 2022. p. 350–357. ISSN 1680-0737. Disponibil: https://doi.org/10.1007/978-3-030-92328-0_46
216. ZAK, L., ALBRECHT, C., WONDRASCH, B., WIDHALM, H., VEKSZLER, G., TRATTNIG, S., et al. Results 2 years after matrix-associated autologous chondrocyte transplantation using the novocart 3D scaffold: An analysis of clinical and radiological data. *Am J Sports Med.* 2014; 42(7), pp. 1618-27. ISSN 0363-5465. Disponibil: DOI: 10.1177/0363546514532337
217. CHICATUN, F., PEDRAZA, CE., MUJA, N., GHEZZI, CE., MCKEE, MD., NAZHAT, SN. Effect of chitosan incorporation and scaffold geometry on chondrocyte function in dense collagen type I hydrogels. *Tissue Eng Part A.* 2013; 19(23-24), pp. 2553-64. ISSN 1937-335X. Disponibil: DOI: 10.1089/ten.TEA.2013.0114
218. LIN, S., LEE, WYW., FENG, Q., XU, L., WANG, B., MAN, GCW., et al. Synergistic effects on mesenchymal stem cell-based cartilage regeneration by chondrogenic preconditioning and mechanical stimulation. *Stem Cell Res Ther.* 2017; 8:221. ISSN 1757-6512. Disponibil: DOI: 10.1186/s13287-017-0672-5
219. KÄMMERER, PW., HEYMANN, P., PALARIE, V., NEFF, A., DRAENERT, FG. Cleaning problems associated with diamond trephine drills in bone surgery. *Ann Maxillofac Surg.* 2013; 3(2), pp. 201-2. ISSN 2231-0746. Disponibil: DOI: 10.4103/2231-0746.119226
220. ZHAO, Z., LI, Y., WANG, M., ZHAO, S., ZHAO, Z., FANG, J. Mechanotransduction pathways in the regulation of cartilage chondrocyte homeostasis. *J Cell Mol Med.* 2020; 24(10), pp. 5408-5419. ISSN 1582-1838. Disponibil: DOI: 10.1111/jcmm.15204

221. CHOMCHALAO, P., Pongcharoen, S., Sutheerawattananonda, M., Tiyaboonchai, W. Fibroin and fibroin blended three-dimensional scaffolds for rat chondrocyte culture. *Biomed Eng Online*. 2013; 12:28. ISSN 1475-925X. Disponibil: DOI: 10.1186/1475-925X-12-28
222. LANDÍNEZ-PARRA, NS., GARZÓN-ALVARADO, DA., VANEGAS-ACOSTA, JC. Mechanical behavior of articular cartilage. *InTech: Injury and Skeletal Biomechanics*. 2012; pp. 197-216. ISBN 978-953-51-0690-6. Disponibil: DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/46881>
223. LI, L., YU, F., ZHENG, L., WANG, R., YAN, W., WANG, Z., et al. Natural hydrogels for cartilage regeneration: Modification, preparation and application. *J Orthop Translat*. 2018; 17:26-41. ISSN 2214-031X. Disponibil: DOI: 10.1016/j.jot.2018.09.003
224. LAWLESS, BM., SADEGHI, H., TEMPLE, DK., DHALIWAL, H., ESPINO, DM., HUKINS, DWL. Viscoelasticity of articular cartilage: Analysing the effect of induced stress and the restraint of bone in a dynamic environment. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2017; 75:293-301. ISSN 1751-6161. Disponibil: DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.07.040>
225. POPOV, VL. Active bio contact mechanics: concepts of active control of wear and growth of the cartilage in natural joints. *AIP Conf. Proc*. 2019; 2167:020285-1–020285-5. ISSN 0094-243X. Disponibil: <https://doi.org/10.1063/1.5132152>
226. WEN, C., XU, L., XU, X., WANG, D., LIANG, Y., DUAN L. Insulin-like growth factor-1 in articular cartilage repair for osteoarthritis treatment. *Arthritis. Res. Ther*. 2021; 23:277. ISSN 1478-6354. Disponibil: <https://doi.org/10.1186/s13075-021-02662-0>
227. DECKER, RS. Articular cartilage and joint development from embryogenesis to adulthood. *Semin Cell Dev Biol*. 2017; 62:50-56. ISSN 1084-9521. Disponibil: DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.10.005
228. KURENKOVA, AD., ROMANOVA, IA., KIBIRSKIY, PD., TIMASHEV P., MEDVEDEVA, EV. Strategies to convert cells into hyaline cartilage: Magic spells for adult stem cells. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(19), pp. 11169. ISSN 1422-0067. Disponibil: DOI: 10.3390/ijms231911169
229. JIAN, M., **COBZAC, V.**, NACU, V. Dispozitive și metode brevetate cu utilizare în ingineria tisulară. *INTELLECTUS*. 2022; nr. 1 pp. 94-100. ISSN 1810-7079. Disponibil: <https://doi.org/10.56329/1810-7087.22.1.09>
230. FRANK, RM., COTTER, EJ., HANNON, CP., HARRAST, JJ., COLE, BJ. Cartilage restoration surgery: incidence rates, complications, and trends as reported by the american board of orthopaedic surgery part II candidates. *Arthroscopy*. 2019; 35(1), pp. 171-178. ISSN 0749-8063. Disponibil: DOI: 10.1016/j.arthro.2018.08.028
231. SARIS, D., PRICE, A., WIDUCHOWSKI, W., BERTRAND-MARCHAND, M., CARON, J., DROGSET, JO., et al. SUMMIT study group. Matrix-applied characterized autologous cultured chondrocytes versus microfracture: two-year follow-up of a prospective randomized trial. *Am J Sports Med*. 2014; 42(6), pp. 1384-94. ISSN 0363-5465. Disponibil: DOI: 10.1177/0363546514528093
232. Kent State University Libraries. SPSS Tutorials: Independent Samples T Test. Disponibil: <https://libguides.library.kent.edu/SPSS/IndependentTTest>. [accesat la 04.01.2021].
233. Kent State University Libraries. SPSS Tutorials: One-Way ANOVA. Disponibil: <https://libguides.library.kent.edu/SPSS/OneWayANOVA>. [accesat la 04.01.2021].
234. Kent State University Libraries. SPSS Tutorials: Chi-Square Test of Independence. Disponibil: <https://libguides.library.kent.edu/SPSS/ChiSquare>. [accesat la 04.01.2021].

235. Wikipedia. Kolmogorov–Smirnov test. Disponibil: https://en.wikipedia.org/wiki/Kolmogorov%E2%80%93Smirnov_test#Two-sample_Kolmogorov%E2%80%93Smirnov_test. [accesat la 16.12.2019].
236. KALTER, SS, HENNESSEN, W. The standardization of animals to improve biomedical research, production, and control. In: Karger Basel S. (ed.) *IABS International Congress for Biological Standardization 1979, 16-20 Septembrie 1979, San Antonio, Texas, USA*. International Association of Biological Standardization; 1980. 247 p. ISSN 0301-5149
237. NACU, V., LĂBUȘCA, L. *Medicină regenerativă și Nanomedicină*. Chișinău. Tipografia Sirius; 2021. 179 p. ISBN 978-9975-57-308-5
238. NACU, V., LĂBUȘCA, L. *Regenerative medicine and Nanomedicine*. Chișinău. Tipografia Print Caro. 2022; 176 p. ISBN 978-9975-165-02-0
239. COJOCARI, Ș., IGNATOV, O., JIAN, M., **COBZAC, V.**, BRANIȘTE, T., MONAICO, E., *et al.* Zinc oxide and gallium nitride nanoparticles application in biomedicine: A review. In: *Tiginyanu I, Sontea V, Railean S. (Eds.) ICNBME 2021: 5th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, Proceedings of ICNBME-2021, 3-5 noiembrie 2021, Chisinau, Moldova*. IFMBE Proceedings 87; 2022. p. 373–381. ISSN 1680-0737. Disponibil: https://doi.org/10.1007/978-3-030-92328-0_49
240. MACAGONOVA, O., MUȘET, G., COCIUG, A., JIAN M., **COBZAC, V.**, SAREV, V., NACU, V. Metodă de modelare a leziunilor de tipul pemfigusului. *Curierul Medical*. 2016; 5(3), pp. 72-74. ISSN 2537-6373.
241. KARL, M., PALARIE, V., NACU, V., GROBECKER-KARL, TA. A pilot animal study aimed at assessing the mechanical quality of regenerated alveolar bone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2020; 35(2), pp. 313-319. ISSN 0882-2786. Disponibil: DOI: 10.11607/jomi.7694
242. VÁZQUEZ-PORTALATI, NN., KILMER, CE., PANITCH, A., LIU, JC. Characterization of collagen type I and II blended hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *Biomacromolecules*. 2016; 17(10), pp. 3145-3152. ISSN 1525-7797. Disponibil: DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00684
243. Zhao X, HU, DA., WU, D., HE, F., WANG, H., HUANG, L., *et al.* Applications of biocompatible scaffold materials in stem cell-based cartilage tissue engineering. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021; 9:603444. ISSN 2296-4185. Disponibil: DOI: 10.3389/fbioe.2021.603444
244. MACAGONOVA, O., NACU, V., COCIUG, A., JIAN, M., **COBZAC, V.**, URSU, A. Dispozitive și metode inovative în procesarea țesuturilor biologice. *Intellectus*. 2017; 2:91-90. ISSN 1810-7079.
245. NACU, V., **COBZAC, V.**, JIAN, M., VERESTIUC, L. Decellularized-demineralized osteochondral allografts testing on rabbit model. Preliminary report. *TERMIS 2018*. Kyoto, Japonia, 2018. p. 78. a92022.
246. **COBZAC, V.**, VEREȘTIUC, L., JIAN, M., NACU, V. Assessment of ionic and anionic surfactants effect on demineralized osteochondral tissue. *The 5th International Conference on Innovative Research. ICIR 2019*. Iasi, Romania; 2019. p. 122. ISSN 2601-4580.
247. **COBZAC, V.**, JIAN, M., MOSTOVEI, A., NACU, V. Bone augmentation with natural and synthetic materials. *International Chemical Engineering and Material Symposium, SICHEM 2020*. Bucharest, Romania, 2020, p. 114. ISSN 2537-2254.
248. **COBZAC, V.**, JIAN, M., NACU, V. The efficiency of device for fixation and cellularization of small sized grafts. *International Conference on Innovative Research, ICIR 2021*. Iași, Romania; 2021. p. 79. ISSN 2601-4580.

249. **COBZAC, V.**, JIAN, M., MADAN, V., CROITOR, G., NACU, V. Collagen/Chitosan hybrid sponge as a scaffold for cell culture. *Maedica, Ediție specială: Al VIII-lea congres național de ortopedie și traumatologie cu participare internațională*. Chișinău, 2016. 4(61), p. 47. ISSN 1810-1852. Disponibil: <https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/14091>
250. **COBZAC, V.**, JIAN, M., MADAN, V., CROITOR, GH., NACU, V. Method of chondrocytes isolation from hyaline cartilage. *Maedica, Ediție specială: Al VIII-lea congres național de ortopedie și traumatologie cu participare internațională*. Chișinău, 2016. 4(61), p. 47-48. ISSN 1810-1852. Disponibil: <https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/14091>
251. **COBZAC, V.**, JIAN, M., CROITOR, G., NACU, V. Cultivarea de condrocite autologe pentru terapia celulara. *Maedica, Ediție specială, Conferința Stiintifică „Nicolae Anestiadi - Nume etern al Chirurgiei Basarabene”*. Chisinau, 2016. 3(60), p. 10. ISSN 1810-1852. Disponibil: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/129518
252. **COBZAC, V.**, JIAN, M., CROITOR, G., NACU, V. Suport celular pentru ingineria tisulară. *Maedica, Ediție specială, Conferința Stiintifică „Nicolae Anestiadi - Nume etern al Chirurgiei Basarabene”*. Chișinău, 2016, 3(60), p. 9. ISSN 1810-1852. Disponibil: https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/129487
253. JIAN, M., **COBZAC, V.** Obtaining of a suitable osteochondral graft for articular cartilage engineering. *The 7th International medical congress for students and young doctors, MedEspera2018*. Chișinău, 2018, p. 202. ISBN 978-9975-47-174-9. Disponibil: <https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/10979>
254. **COBZAC, V.**, VEREȘTIUC, L., JIAN, M., NACU, V. Tissue engineered grafts in articular cartilage defects treatment. *Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „N. Testemițanu”* Chișinău, 2020. p. 500. Disponibil: <https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/15217>
255. **COBZAC, V.**, JIAN, M., GLOBA, T., NACU, V. The cartilaginous tissue regeneration on weight bearing and non-weight bearing surfaces of the knee. *The 5th International conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME-2021*. Chișinău, 2021. p. 89. ISBN 978-9975-72-592-7. Disponibil: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/142553

ANEXE

Anexa 1. Scorul histologic unificat al cartilajului regenerat

	Criterii		Scara
1	Paternal celular în cartilajul regenerat	Cartilaj hialin	0
		Predominant cartilaj hialin	1
		Predominant fibrocartilaj	2
		Doar non-cartilaj	3
2	Morfologia celulară (se alege inițial categoria - a, b, c, sau d)	(a) normală	0
		(b) în mare parte celule rotunde cu morfologie condrocitară:	
		> 75% din țesut cu coloane în zona radială	0
		25-75% din țesut cu coloane în zona radială	1
		<25% din țesut cu coloane în zona radială (structură dezorganizată)	2
		(c) circa 50% de celule rotunde cu morfologie condrocitară:	
		> 75% din țesut cu coloane în zona radială	2
		25-75% din țesut cu coloane în zona radială	3
		<25% din țesut cu coloane în zona radială (structură dezorganizată)	4
		(d) în mare parte celulele fusiforme (fibroblast-like)	5
3	Formarea de clustere condrocitare	Absentă	0
		<25% din celule	1
		25-100% din celule	2
4	Nivelul de celularizare	Celularitate normală	0
		Hipocelularitate ușoară	1
		Hipocelularitate moderată	2
		Hipocelularitate severă	3
5	Metacromazia matriciei	normală	0
		ușor redusă	1
		moderat redusă	2
		marcat redusă	3
		nu se colorează	4
6	Suprafața articulară	Netedă și intactă	0
		Laminare orizontală superficială	1
		Fisuri până de la 25% până la 100% din grosime	2
		Perturbări severe, rupturi, inclusiv fibrilații	3
7	Integrarea grefei cu cartilajul articular din jur	Continuitate și integrare normală	0
		Celularitate redusă	1
		Lacună sau lipsa de continuitate pe o parte	2
		Lacună sau lipsa de continuitate pe două părți	3
8	Arhitectura întregului defect fără includerea marginelor	normală	0
		1-3 defecte mici	1
		1-3 defecte mari	2
		distrucție severă	3
9	Grosimea cartilajului nou format	100% din cartilajul adiacent normal	0
		50-100% din cartilajul adiacent normal	1
		0-50% din cartilajul adiacent normal	2
10	Prezența modificărilor degenerative ale cartilajului adiacent	Celularitate normală, fără clustere, colorare normală	0
		Celularitate normală, puține clustere, colorare moderată	1
		Celularitate moderată, număr clustere moderat, colorare moderată	2
		Hipocelularitate severă, fără colorare	3
11	Umplerea defectului în raport cu suprafața cartilajului	111-125 %	1
		91-110 %	0
		76-90 %	1
		51-75 %	2
		26-50 %	3

	adiacent normal	<25 %	4
12	Formarea liniei de demarcație	Completă	0
		75-99 %	1
		50-74 %	2
		25-49 %	3
		<25 %	4
13	Procentul noului os subcondral restabilit	90-100 %	0
		75-89 %	1
		50-74 %	2
		25-49 %	3
		<25 %	4


REPUBLICA MOLDOVA
Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

**BREVET
DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**
Nr. 1169

Eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

Titlul: **Metoda de obținere a spongiei de colagen**

Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD

Data depozit: 2016.12.06
Durata brevetului : 6 ani

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată

 Director General


CHIȘINĂU


REPUBLICA MOLDOVA
Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

**BREVET
DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**
Nr. 1332

Eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

Titlul: **Dispozitiv pentru fixarea și celularizarea grefelor de dimensiuni mici**

Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD

Data depozit: 2018.07.02
Durata brevetului : 6 ani

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată

 Director General


CHIȘINĂU


REPUBLICA MOLDOVA
Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

**BREVET
DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**
Nr. 1137

Eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

Titlul: **Dispozitiv pentru reticularea spongiei de colagen cu vapori de glutaraldehidă**

Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD

Data depozit: 2016.09.30
Durata brevetului : 6 ani

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată

 Director General


CHIȘINĂU


REPUBLICA MOLDOVA
Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

**BREVET
DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**
Nr. 1177

Eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

Titlul: **Grefă pentru restabilirea defectului osteocondral**

Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD

Data depozit: 2017.04.11
Durata brevetului : 6 ani

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată

 Director General


CHIȘINĂU


REPUBLICA MOLDOVA
Agencia de Stat pentru
Proprietatea Intelectuala

BREVET
DE INVENTIE
DE SCURTĂ DURATĂ
Nr. 1582

Eliberat in temeiul Legii nr. 50/2008 privind protectia inventiilor

Titlul: Dispozitiv pentru separarea pastei osoase demineralizate
Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINA SI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD
Data depozit: 2020.10.26
Durata brevetului : 6 ani

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată

 **Director General**

CHIȘINĂU


REPUBLICA MOLDOVA
Agencia de Stat pentru
Proprietatea Intelectuala

BREVET
DE INVENTIE
DE SCURTĂ DURATĂ
Nr. 1584

Eliberat in temeiul Legii nr. 50/2008 privind protectia inventiilor

Titlul: Metodă de izolare a culturilor celulare
Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINA SI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD
Data depozit: 2020.10.26
Durata brevetului : 6 ani

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată

 **Director General**

CHIȘINĂU

Anexa 3. Acte de implementare a invențiilor

I.
APROB

Prorector pentru activitatea științifică
USMF „Nicolae Testemițanu”
Prof. univ., dr. hab. șt. med.,
Gh. Rojnovceanu

ACTUL 107
DE IMPLEMENTARE A INVENȚIEI
(în procesul științifico-didactic)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** Metodă de obținere a spongiei de colagen
2. **Autorii:** COBZAC Vitalie, MD; NACU Viorel, MD; JIAN Mariana, MD; COȘCIUG Stanislav, MD; PALADI Constantin, MD; MACAGONOVA Olga, MD.
3. **Numarul invenției:** 1169 (13) Y
4. **Sursa de informație:** Prezenta invenție este elaborată în cadrul laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare în procesul de obținere a spongiei de colagen în baza cercetării studiilor privind obținerea spongiilor de colagen.
5. **Unde și când a fost implementată:** În obținerea spongiei de colagen în activitatea laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare pentru realizarea cercetărilor în cadrul Programului de Stat "Regenerare prin terapie celulară a țesuturilor și a organelor afectate", în martie 2016.
6. **Eficacitatea implementării:** Problema pe care o rezolvă invenția constă în crearea unei metode și a unui dispozitiv nou, ce ne permite o liofilizare mai rapidă și uniformă a colagenului lichid, dar și o manipulare mai ușoară cu spongia liofilizată.
7. **Obiectii/proponeri:** La etapa implementării obiectii nu sunt.
Prezenta invenție este implementată conform descrierii în cerere.

Șef al laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare
Prof. univ., dr. hab. șt. med. Viorel Nacu

Șef Departament Știință,
Prof. univ., dr. hab. șt. med. Ghenadie Curocichin

APROB

Prorector pentru activitatea științifică
USMF „Nicolae Testemițanu”
Prof. univ., dr. hab. șt. med.,
Gh. Rojnovceanu

ACTUL 106
DE IMPLEMENTARE A INVENȚIEI
(în procesul științifico-didactic)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** Dispozitiv pentru reticularea spongiei de colagen cu vapori de glutaraldehidă.
2. **Autorii:** COBZAC Vitalie, MD; NACU Viorel, MD; JIAN Mariana, MD; PALADI Constantin, MD; SARIU Violeta, MD.
3. **Numarul invenției:** MD 1137(13) Y
4. **Sursa de informație:** Prezenta invenție este elaborată în cadrul laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare în procesul de reticulare a spongiei de colagen în baza studiilor asupra procesului de reticulare a spongiilor de colagen.
5. **Unde și când a fost implementată:** În obținerea spongiilor de colagen la etapa de reticulare cu vapori de glutaraldehidă în activitatea laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare pentru realizarea cercetărilor în cadrul Programului de Stat "Regenerare prin terapie celulară a țesuturilor și a organelor afectate, în februarie 2016."
6. **Eficacitatea implementării:** Eficacitatea implementării respectivului dispozitiv constă în posibilitatea reticulării spongiilor de colagen eficient, sigur, calitativ, ușor și econom.
7. **Obiectii/proponeri:** La etapa implementării obiectii nu sunt.
Prezenta invenție este implementată conform descrierii în cerere.

Șef al laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare
Prof. univ., dr. hab. șt. med. Viorel Nacu

Șef Departament Știință,
Prof. univ., dr. hab. șt. med. Ghenadie Curocichin

	Instituție Publică USMF „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova Institutul Național de Cercetare în Medicină și Sănătate	Pag. 1 / 2
APROB		
Prorector pentru activitate de cercetare, USMF „Nicolae Testemițanu” din RM academician al AȘM, prof. univ., dr. hab. șt. med. Stanislav GROPPA 2022		
ACTUL nr. 04 DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI (în procesul științifico-practic)		
<p>1. Denumirea ofertei pentru implementare: DISPOZITIV PENTRU FIXAREA ȘI CELULARIZAREA GREFELOR DE DIMENSIUNI MICI 2. Autori: COBZAC Vitalie, doctorand, cercetător științific, NACU Viorel, dr. hab. șt. med., GLAVAN Alina, dr. șt. med., JIAN Mariana, cercetător științific, SEDAIA Ecaterina, dr. șt. med., ABABII Polina, dr. șt. med. 3. Numărul inovației: Nr. 1332 din 07 februarie 2018. 4. Unde și când a fost implementată: Laboratorul de Inginerie tisulară și culturi celulare al USMF „Nicolae Testemițanu”, perioada 2017-2021. 5. Eficacitatea implementării: Problema pe care o rezolvă invenția constă în fixarea sigură a grefei în interiorul dispozitivului și reducerea pierderii excesive de celule în timpul turnării suspensiei celulare pe greță, astfel crescând randamentul celularizării grefelor. 6. Rezultatele: Rezultatul constă în sporirea eficienței, siguranței și calității dispozitivului, precum și în ușurința utilizării și confecționării acestuia. Totodată dispozitivul este econom și permite celularizarea mai abundentă a grefelor, protecția materialului celularizat și transplantarea ușoară a acestuia. Propunerea este utilizată în practică experimentală în cadrul laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare. <i>Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.</i></p> <p>Șef, Laborator de Inginerie tisulară și culturi celulare dr. hab. șt. med., prof. univ. Viorel NACU</p> <p>Șef Departament Cercetare, dr. hab. șt. med., conf. univ. Elena RAEVSCI</p> <p>Coordonat: E. Groza</p>		
1		

APROB

Prorector pentru activitatea științifică
USMF „Nicolae Testemițanu”
Prof. univ., dr. hab. șt. med.,
Gh. Rojnovceanu

ACTUL 108
DE IMPLEMENTARE A INVENȚIEI
(în procesul științifico-didactic)

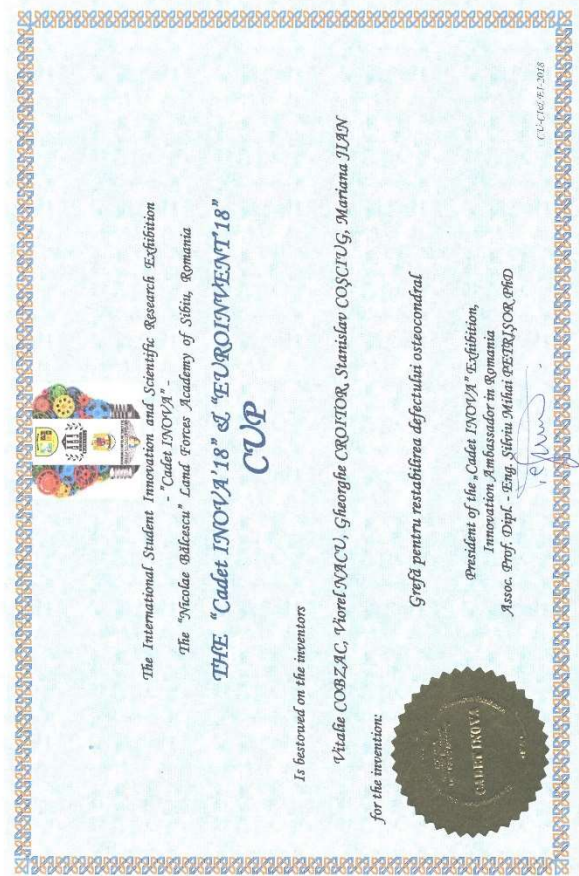
1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** Greță pentru restabilirea defectului osteocondral.
2. **Autorii:** COBZAC Vitalie, MD; NACU Viorel, MD; CROITOR Gheorghe, MD; COȘCIUG Stanislav, MD; JIAN Mariana, MD.
3. **Numarul invenției:** 1177 (13) Y
4. **Sursa de informație:** Prezenta invenție este elaborată în cadrul laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare în procesul de obținere a greței pentru restabilirea defectului osteocondral în baza studiilor literare privind obținerea grefelor.
5. **Unde și când a fost implementată:** În obținerea greței pentru restabilirea defectului osteocondral în activitatea laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare pentru realizarea cercetărilor în cadrul Programului de Stat "Regenerare prin terapie celulară a țesuturilor și a organelor afectate", în februarie 2016.
6. **Eficacitatea implementării:** Problema pe care o rezolvă invenția constă în obținerea unei grețe osteocondrale alte sau xenogene, demineralizate, decelularizate și perforate în toată lungimea care permite o integrare mai bună a țesutului în organismul gazdă, fără risc de rejet al transplantului. De asemenea, datorită perforării greței în toată lungimea crește posibilitatea de îmbogățire mai uniformă a transplantului cu celule condroprogenitoare, dar și prezintă o suprafață de contact mai mare pentru celulele gazdă și vasele sangvine, aceasta în final asigurând o integrare mai rapidă a transplantului.
7. **Obiectii/proponeri:** La etapa implementării obiectii nu sunt.
Prezenta invenție este implementată conform descrierii în cerere.

Șef al laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare
Prof. univ., dr. hab. șt. med. Viorel Nacu

Șef Departament Știință,
Prof. univ., dr. hab. șt. med. Ghenadie Curocichin

	INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „NICOLAE TESTEMIȚANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA	Pag. 1 / 1
	<p>APROB Procesor pentru activitate de cercetare, USMF „Nicolae Testemițanu” din RM Academicien al AȘM, prof. univ. dr. hab. șt. med. Stanislav GROPPA 2022</p> <p>ACTUL nr. 12 DE IMPLEMENTARE A INVENȚIEI (în procesul științifico-practic)</p> <p>1. Denumirea ofertei pentru implementare: Dispozitiv pentru separarea pastei osoase demineralizate 2. Autori: Cobzac Vitalie, Nacu Viorel, Jian Mariana. 3. Numărul invenției: MD 1582 (BOPI nr. 12 din 31.12.2021). 4. Unde și când a fost implementată invenția: Metoda de izolare a culturilor celulare a fost implementată în laboratorul de Inginerie tisulară și culturi celulare în anul 2019-2022. 5. Eficacitatea implementării: eficacitatea invenției constă în elaborarea unui dispozitiv pentru stecurarea lichidelor utilizate în pregătirea pastei osoase demineralizate, care reduce semnificativ pierderile de masă osoasă în urma schimbării lichidelor utilizate în procesarea pastei osoase în condiții sterile. 6. Rezultatul implementării: Rezultatul invenției constă în aceea că dispozitivul poate fi utilizat cu siguranță în condiții sterile, prezintă o eficiență înaltă în păstrarea unui volum important de pastă osoasă în timpul schimbării lichidelor pentru procesare, iar construcția sa simplă îl face ușor în utilizare.</p> <p><i>Prezenta invenție este implementată conform revendicărilor descrise în brevet.</i></p> <p>Sef. Laborator de Inginerie tisulară și culture celulare dr. hab. st. med., prof. univ. Viorel NACU</p> <p>Șef Departament Cercetare, dr. hab. șt. med., conf. univ. Elena RAEVSCHI</p> <p>* Coordonat: <u>E. Groza</u> E. Groza</p> <p style="text-align: center;">1</p>	

	INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „NICOLAE TESTEMIȚANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA	Pag. 1 / 1
	<p>APROB Procesor pentru activitate de cercetare, USMF „Nicolae Testemițanu” din RM Academicien al AȘM, prof. univ. dr. hab. șt. med. Stanislav GROPPA 2022</p> <p>ACTUL nr. 11 DE IMPLEMENTARE A INVENȚIEI (în procesul științifico-practic)</p> <p>1. Denumirea ofertei pentru implementare: Metodă de izolare a culturilor celulare 2. Autori: Jian Mariana, Nacu Viorel, Cobzac Vitalie, Branîște Tudor 3. Numărul invenției: MD 1584 (BOPI nr. 12 din 31.12.2021). 4. Unde și când a fost implementată invenția: Metoda de izolare a culturilor celulare a fost implementată în laboratorul de Inginerie tisulară și culturi celulare în anul 2019-2022. 5. Eficacitatea implementării: eficacitatea metodei date constă în prevenirea contaminării vasului pentru cultura celulară, lipsa necesității de utilizare a unor reactivi suplimentari costisitori, aderența fermă a țesutului la suprafața de cultură celulară fără riscul detașării și izolarea stabilă a unui număr mare de celule într-o perioadă scurtă de timp dintr-o cantitate mică de țesut în cadrul unei proceduri. 6. Rezultatul implementării: Rezultatul invenției constă în lipsa cheltuielilor suplimentare pentru achiziția diferitor substanțe, necesare pentru aderența explantului la suprafața de cultură celulară, totodată constă în prezervarea unei cantități mari de resurse ca timpul și reactivele, dar și posibilitatea de izolare a unei game vaste și numeroase de celule animale într-o perioadă scurtă de timp din țesuturi diferite în cadrul unei proceduri.</p> <p><i>Prezenta invenție este implementată conform revendicărilor descrise în brevet.</i></p> <p>Sef. Laborator de Inginerie tisulară și culture celulare dr. hab. st. med., prof. univ. Viorel NACU</p> <p>Șef Departament Cercetare, dr. hab. șt. med., conf. univ. Elena RAEVSCHI</p> <p>* Coordonat: <u>E. Groza</u> E. Groza</p> <p style="text-align: center;">1</p>	



Science, Education and Technology PLATFORM

Certificate of Recognition

INNOVATION AWARD

for promoting Science, Education and Technology at EUROINVENT, 16-18 May, 2019, Iasi, ROMANIA for the work:

Title: *Dispozitiv pentru reticularea spongilor de colagen cu vapori de glutaraldehidă*

Authors: *COBZAC Vitalie, NACU Viorel, CROITOR Gheorghe, COȘCIUG Stanislav, JIAN MARIANA*

Editor of SciEdTech: Prof. Habil. *Antoș FICAI*

Date: 22.03.2019

www.sciedtech.eu

"CAROL DAVILA" UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY, BUCHAREST

ROMANIA

Innovation Award

is hereby granted to:

COBZAC VITALIE, NACU VIOREL, CROITOR GHEORGHE, COȘCIUG STANISLAV, JIAN MARIANA

for

GRAFTING FOR RESTORING THE OSTEOCHONDRAL DEFECT

The 22nd International Exhibition of Inventions "INVENTICA 2018", Iași - Romania

June 29, 2018

Rect. *Ioaneta SINEȘCU*
Acad. Ioaneta SINEȘCU

ASSOCIATION OF POLISH INVENTORS AND RATIONALIZERS

SPECIAL AWARD

for

COBZAC VITALIE, NACU VIOREL, CROITOR GHEORGHE, COȘCIUG STANISLAV, JIAN MARIANA

from

NICOLAE TESTE MIȚAȚAN STATE UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY

for the invention

GRAFTING FOR RESTORING THE OSTEOCHONDRAL DEFECT

The President of SPWR
Michał Szota
Prof. Michał Szota

Did you know?
Polish discovery that revolutionized the world.

Earth moves around the Sun
Mikołaj Kopernik

Commodore 64
Joakim Torzell

Elements Road and Polon
Hans Birkbeck-Curie
First bulletproof vest
Jan Szczepanik

Blue Laser
Institute of High Pressure Physics of the Polish Academy of Sciences

INTERNATIONAL SHOW INVENT

Indonesian Invention and Innovation Promotion Association

SPECIAL AWARD

No : INNOPA/TK/SA/603/IX/2018

Awarded to :

COBZAC Vitalie, NACU Viorel, CROITOR Gheorghe, COȘCIUG Stanislav, JIAN Mariana

In honour of the highest standard of excellence Presented by the valuable invention entitled

Graft for restoration of osteochondral defect

Has participated in :
The 3rd Istanbul International Invention Fair

Held on 27-29 September 2018
Istanbul Lutfi Kırdar ICEC, Turkey

Erricha
Erricha Insan Prati
President of INNOPA

Member of : **Official Events:**

IIFIA **UinA** **IYIA**

Science, Education and Technology PLATFORM

Certificate of recognition
Innovation Award


for promoting Science, Education and Technology at INFOINVENT 2019, CHISINAU, MOLDOVA for the work:

Title: **DISPOZITIV PENTRU FIXAREA ȘI CELULARIZAREA GREFELOR DE DIMENSIUNI MICI**

Authors: **Cobzac Vitalie, Nacu Viorel, Glavan Alina, Jian Mariana, Sedaia Ecaterina, Ababil Polina**

Director scientific: **Prof. dr. ing. habil. Anton FICAI**

Date: **23.11.2019**



Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului "REGELE MIHAI I AL ROMÂNIEI" din Timișoara

FAKULTATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ

A 4-a Editie a Salonului Internațional de Invenții și Inovări, "TRAIAN VUJA" Timișoara, România, 12-14 Iunie 2019

DIPLOMĂ DE EXCELENȚĂ ȘI PREMIUL SPECIAL

al USAMVB "REGELE MIHAI I AL ROMÂNIEI" din Timișoara

Pentru lucrarea : **Dispozitiv pentru fixarea și celularizarea grefelor de dimensiuni mici**

Autori : **Cobzac Vitalie, Nacu Viorel, Glavan Alina, Jian Mariana, Sedaia Ecaterina, Ababil Polina**

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu" – Republica Moldova

RECTOR,
Prof. univ. dr. ing. **POPESCU COSMIN**




WIIPA

WIIPA SPECIAL AWARD

Presented to

COBZAC Vitalie, NACU Viorel, GLAVAN Alina, JIAN Mariana, SEDAIA Ecaterina, ABABIL Polina



In recognition of

Small-sized graft fixation and cellularization device

exhibited at

European Exhibition of Creativity and Innovation, EUROINVENT
May 2021
Palace of Culture, Romania

Manli Hsieh
Manli Hsieh
President
World Invention Intellectual Property Associations

romania2019.eu

PREMIU SPECIAL




Pentru lucrarea **DISPOZITIV PENTRU FIXAREA ȘI CELULARIZAREA GREFELOR DE DIMENSIUNI MICI**

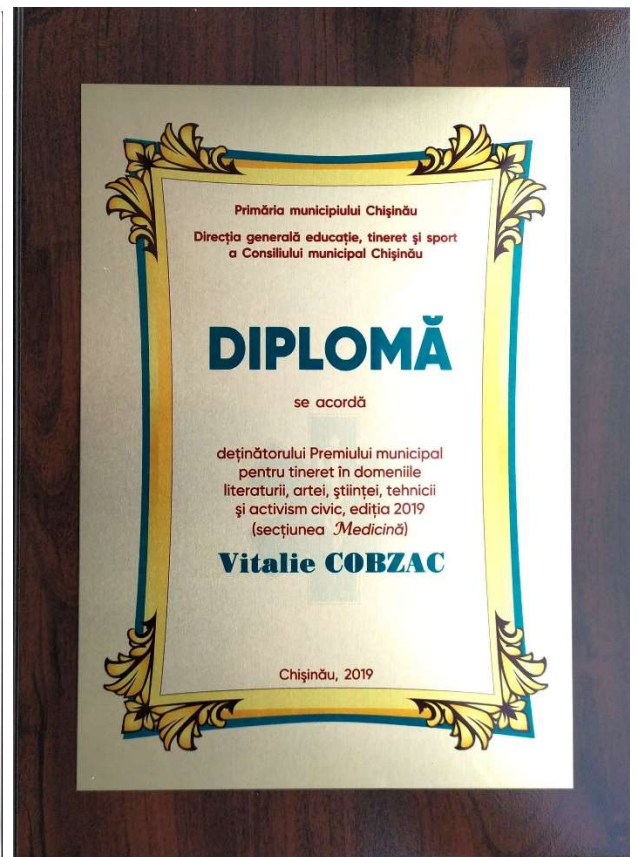
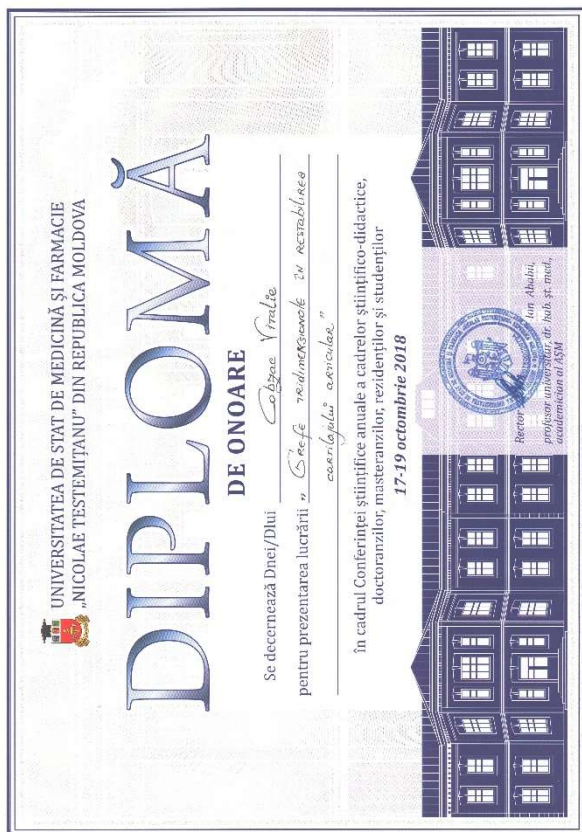
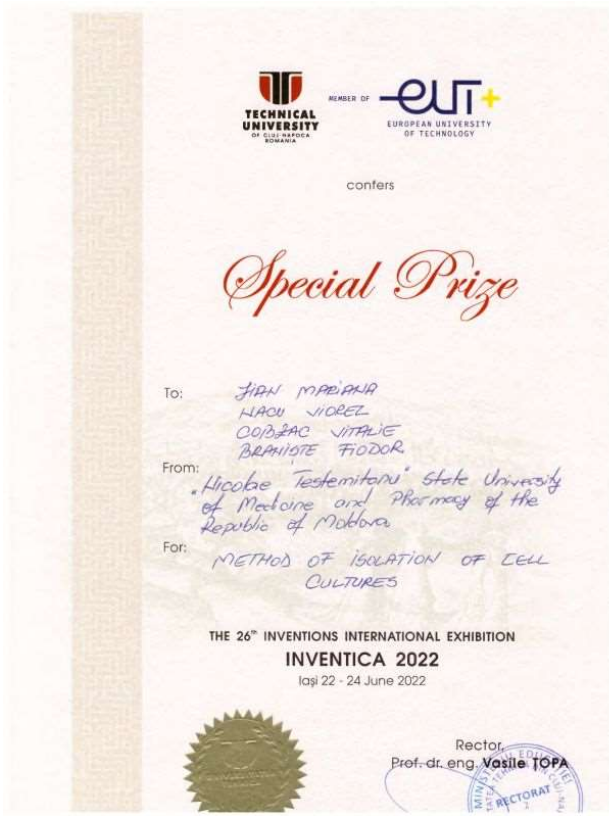
Autori : **Cobzac Vitalie, Nacu Viorel, Glavan Alina, Jian Mariana, Sedaia Ecaterina, Ababil Polina**

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu" din Republica Moldova

12.14 Iunie 2019

Prof. dr. ing. **Manli Hsieh**





UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA

DIPLOMĂ

Se decernează

Dlui Vitalie Cobzac

doctorand, anul IV, specialitatea
Inginerie tisulară și culturi celulare

Laureat al Concursului „Performanțe în cercetare”

pentru ciclul de lucrări „Noi tehnologii pentru
Medicina Regenerativă”

CONGRESUL
CONSACRAT ANIVERSĂRII A 75-A
DE LA FONDAREA USMF „NICOLAE TESTEMIȚANU”



Chișinău, Republica Moldova

Rector
Emil Ceban
Emil Ceban,
profesor universitar, dr. hab. șt. med.,
președinte al Comitetului
organizatoric al Congresului

Prorector pentru activitate
de cercetare
Stanislav Groppa
Stanislav Groppa,
profesor universitar, dr. hab. șt. med.,
academician al AȘM,
președinte al Biroului Comitetului
științific al Congresului

THE ACADEMY OF ROMANIAN SCIENTISTS

Innovative Spirit Award

This award is proudly presented to

Vitalie Cobzac

for the continuous work and effort in cultivating the innovative
spirit among young researchers.



ECATERINA ANDRONESCU

Andronescu

25 - 26 June 2021

Ediția a XV-a **IGGPI** AGENȚIA DE STAT PENTRU PROMOVAREA INTELLECTUALĂ A REȘTELOR MOLDOVA

Expoziția Internațională Specializată
„INFOINVENT”

DIPLOMĂ
MEDALIA DE AUR

se acordă
COBZAC VITALIE, NACU VIOREL, JIAN MARIANA, COȘCIUG STANISLAV

PALADI CONSTANTIN, MACAGONOVA OLEA

pentru
METODĂ DE OBTINERE A SPONGIEI DE COLAGEN

[Signature] PREȘEDINTELE COMITETULUI ORGANIZATORIC
[Signature] PREȘEDINTELE JURULUI INTERNAȚIONAL

15-18 noiembrie 2017,
 Chișinău, Republica Moldova

SALONUL INTERNAȚIONAL AL CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE, INOVĂRII ȘI INVENTICII
PRO INVENT
 EDIȚIA XVI, 21-23 MARTIE 2018, CLUJ-NAPOCA

DIPLOMA
 DE EXCELENȚĂ
 ȘI MEDALIA DE AUR

Se acordă *Cobzac Vitalie, Nacu Viorel, Croitor Gheorghe, Coșciug Stanislav, Jian Mariana*
 De la *Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” Republica Moldova*
 Pentru *GREFA PENTRU RESTABILIREA DEFECTULUI OSTEOCONDRAI*

PREȘEDINTELE SALONULUI,
 Prof. dr. ing. WALTER TOPA
 Universității Științifice din Cluj-Napoca

PREȘEDINTELE JURULUI,
 Prof. dr. ing. RADU Munteanu

Science, Education and Technology PLATFORM

Certificate of Recognition

For promoting Science, Education and Technology at ProInvent 21-23 March 2018, Cluj Napoca, ROMANIA for the work:

Title: *Work for restoring of osteochondral defect*

Authors: *Cobzac Vitalie, Nacu Viorel, Croitor Gheorghe, Coșciug Stanislav, Jian Mariana*

Editor of SciEdTech:
 Prof. Habiș Anton FICAI

Date:
 23.03.2018

www.sciedtech.eu

EURO INVENT 10th EDITION 2018

DIPLOMA OF GOLD MEDAL is awarded to:

Grafting for restoring the osteochondral defect
COBZAC Vitalie, NACU Viorel, CROITOR Gheorghe, COȘCIUG Stanislav, JIAN Mariana

President of International Jury
 Dr.Eng. Morteza Mousavi/Abdullah

President of Exhibition
 Prof. Ion Ștefan

May 19, 2018

SALONUL INTERNAȚIONAL DE
**INVENTII
INOVAȚII**
„TRAIAN VUIA” TIMIȘOARA

Diplomă

SE ACORDĂ  **MEDALIA
DE AUR**

pentru invenția
Grefă pentru restabilirea defectului osteocondral
autori
**Cobzac Vitalie, Nacu Viorel, Croitor Gheorghe, Coșciug Stanislav,
Jian Mariana**

instituția
**UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „
NICOLAE TESTEMIȚANU” Republica Moldova**

Președinte juriu
Radu Dimeca

Președinte salon
Remi RĂDULESCU

Data 15 iunie 2018

Diploma
**GOLD MEDAL
INVENTICA 2018**

Offered to Mr / Ms
„Nicolae Testemițanu”
State University of Medicine and Pharmacy

**METODĂ DE OBTINERE A SPONGIEI DE COLAGEN/
METHOD OF COLLAGEN SPONGE OBTAINING**

**COBZAC VITALIE, MD, NACU VIOREL, MD,
JIAN MARIANA, MD, COȘCIUG STANISLAV, MD,
PALADI CONSTANTIN, MD, MACAGONOVA OLGA, MD**

in recognition of high scientific contribution
and loyalty to the XXII-th International Salon of Research,
Innovation and Technological Transfer

INVENTICA 2018
Iasi, Romania,
27 - 29 June 2018

**MANAGER
NATIONAL INSTITUTE OF INVENTICS
Prof. Neculai SEGHEdin PhD**

Diploma
**GOLD MEDAL
INVENTICA 2018**

Offered to Mr / Ms
„Nicolae Testemițanu”
State University of Medicine and Pharmacy

**GRAFTING FOR RESTORING
THE OSTEOCHONDRAL DEFECT**

**COBZAC VITALIE, NACU VIOREL,
CROITOR GHEORGHE, COȘCIUG STANISLAV,
JIAN MARIANA**

in recognition of high scientific contribution
and loyalty to the XXII-th International Salon of Research,
Innovation and Technological Transfer

INVENTICA 2018
Iasi, Romania,
27 - 29 June 2018

**MANAGER
NATIONAL INSTITUTE OF INVENTICS
Prof. Neculai SEGHEdin PhD**

**DIPLOMA
OF
GOLD MEDAL**

Method of collagen sponge obtaining

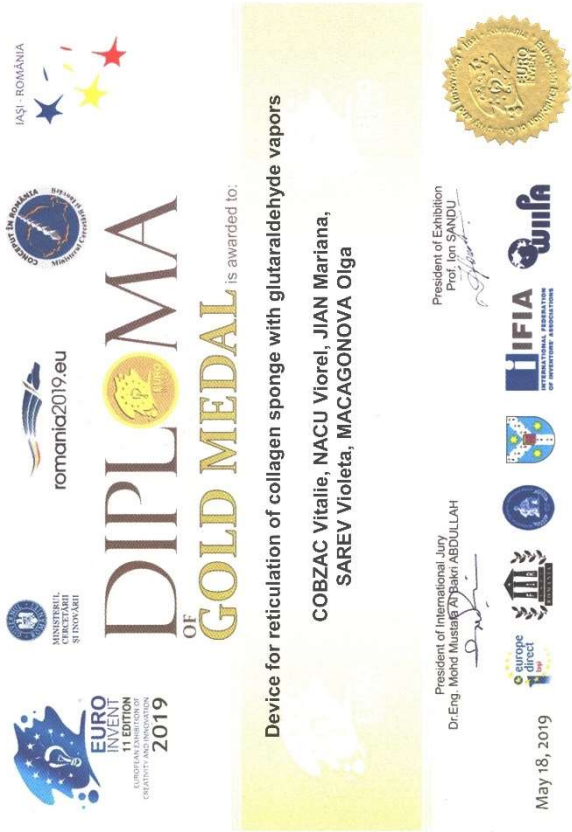
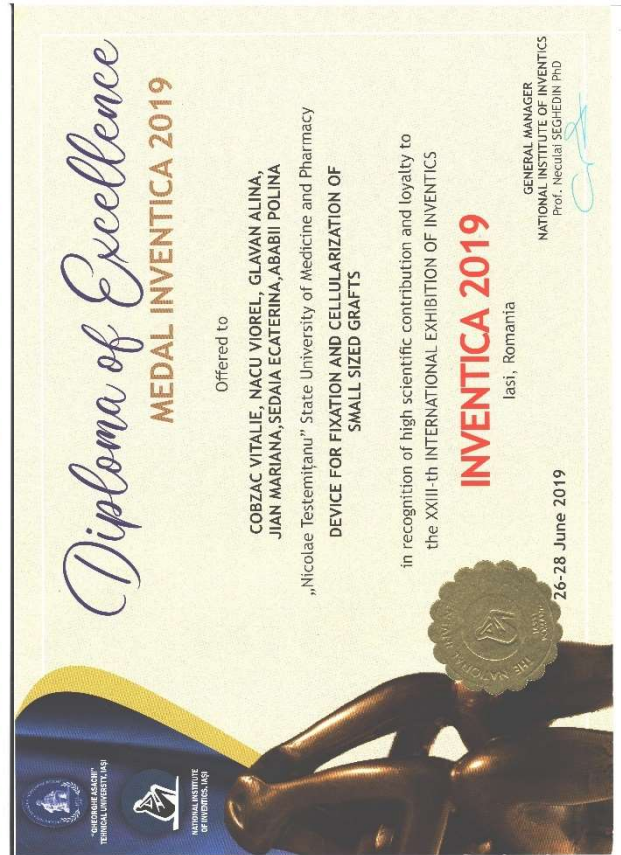
**COBZAC Vitalie, NACU Viorel, JIAN Mariana, COȘCIUG Stanislav,
PALADI Constantin, MACAGONOVA Olga**

President of Exhibition
Prof. Ion SPANU

President of International Jury
Dr.Eng. Mohd Mustafizul BAKR ABDULLAH

**MANAGER
NATIONAL INSTITUTE OF INVENTICS
Prof. Neculai SEGHEdin PhD**

May 18, 2019



University **POLITEHNICA** of Bucharest

BESTOWS

GOLD MEDAL & DIPLOMA

TO

METODA DE IZOLARE A CULTURILOR CELULARE

JIAN MARIANA, NACUVIREL, COBZAC VITALE, BRANȘTE TUDOR

for achieving excellency in innovation through dedication and the
consistent wish to push the borders of what can be obtained through
science and technology

Mihnea Cosmin COSTOIU


Rector



October 08-10, 2022



Anexa 6. Distincții: Medalii de Argint



**TECHNICAL UNIVERSITY
CLUJ-NAPOCA
ROMANIA**


*Diploma of Excellence
and
Silver Medal*

Awarded by the Technical University of Cluj-Napoca
ROMANIA


To: *Cobzac Vitalie, Nacu Viorel
Jian Mariana, Palade Constantina
Sareu Violeta*

For the invention: *Metoda de obtinere a
spongiei de colagen.*

The 15th edition of
"INFOINVENT"
INTERNATIONAL SPECIALIZED EXHIBITION
15 - 18 NOVEMBER 2017,
CHISINAU, REPUBLICA MOLDOVA



Rector,
Prof. Vasile TOPA, dr. eng.




3rd Istanbul International Inventions Fair
ISIF'18 [PATENT]
Invention, R&D and Innovation by TURKISH PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Silver Medal Certificate

presented to

COBZAC Vitalie, NACU Viorel, CROITOR Gheorghe,
COȘCIUG Stanislav, JIAN Mariana

from
MOLDOVA

in recognition of excellent and creative efforts to invent

Graft for restoration of osteochondral defect

exhibited at the
3rd Istanbul International Inventions Fair
ISIF'18 in Istanbul, Turkey
27th- 29th September 2018



Prof. Dr. Habip ASAN
President
Turkish Patent and Trademark Office



The International Student Innovation and Scientific Research Exhibition
- "Cadet INOVA'18" -
The "Nicola Balcescu" Land Forces Academy of Sibiu, Romania
19-21 April 2018

**THE SILVER MEDAL
OF THE "CADET INOVA'18" EXHIBITION**

Is bestowed on the researcher/researchers
**Vitalie COBZAC, Viorel NACU, Mariana JIAN, Stanislav COȘCIUG, Constantin
PALADI, Olga MACAGONOVA**

for the innovation:
METHOD OF COLLAGEN SPONGE OBTAINING




President of the Exhibition,
Dipl. - Eng.
Sibiu, Nicolai CRĂCIUN, PhD

President of the Jury,
Dipl. - Eng.
Andrei VICTOR SUNDU, PhD




19/04/2018




The International Student Innovation and Scientific Research Exhibition
- "Cadet INOVA'18" -
The "Nicola Balcescu" Land Forces Academy of Sibiu, Romania
19-21 April 2018

**THE SILVER MEDAL
OF THE "CADET INOVA'18" EXHIBITION WITH THE JURY'S PRAISE**


Is bestowed on the researcher/researchers
**Vitalie COBZAC, Viorel NACU, Gheorghe CROITOR, Stanislav COȘCIUG,
Mariana JIAN**

for the innovation:
GRAFTING FOR RESTORING THE OSTEOCHONDRAL DEFECT



President of the Exhibition,
Dipl. - Eng.
Sibiu, Nicolai CRĂCIUN, PhD

President of the Jury,
Dipl. - Eng.
Andrei VICTOR SUNDU, PhD

19/04/2018



International Invention Innovation
Competition in Canada, iCAN



Toronto, Canada

CERTIFICATE OF AWARD

THIS CERTIFICATE IS PROUDLY PRESENTED TO

**COBZAC Vitalie NACU Viorel GLAVAN Alina
JIAN Mariana SEDAIA Ecaterina ABABII Polina**

FOR THE ACHIEVEMENT OF

SILVER MEDAL

BY THE INVENTION - INNOVATION ENTITLED :

Small-sized graft fixation and cellularization device

AT THE 6TH ANNUAL INTERNATIONAL INVENTION
INNOVATION COMPETITION IN CANADA, iCAN 2021

ORGANIZED BY TORONTO INTERNATIONAL SOCIETY
OF INNOVATION & ADVANCED SKILLS (TISIAS)

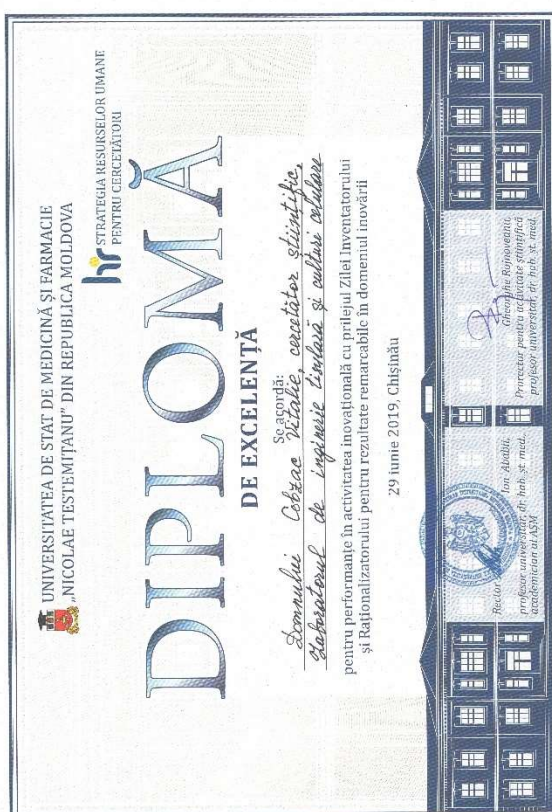
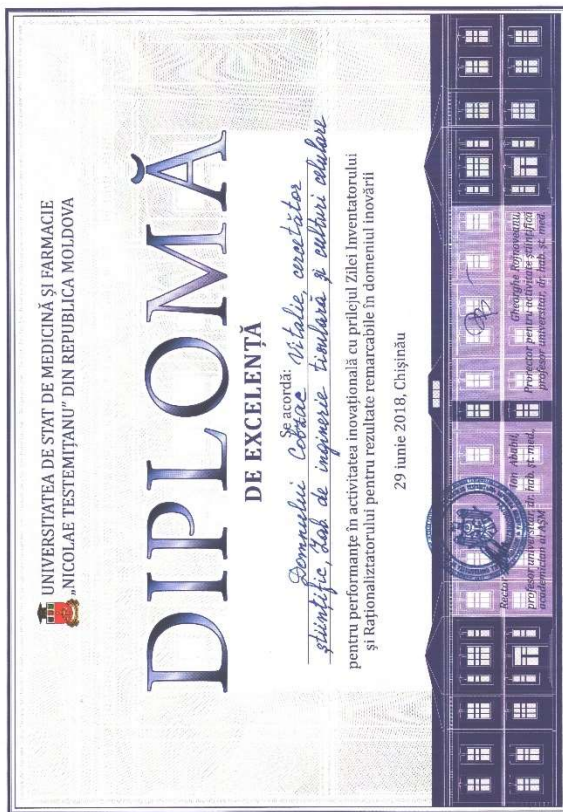
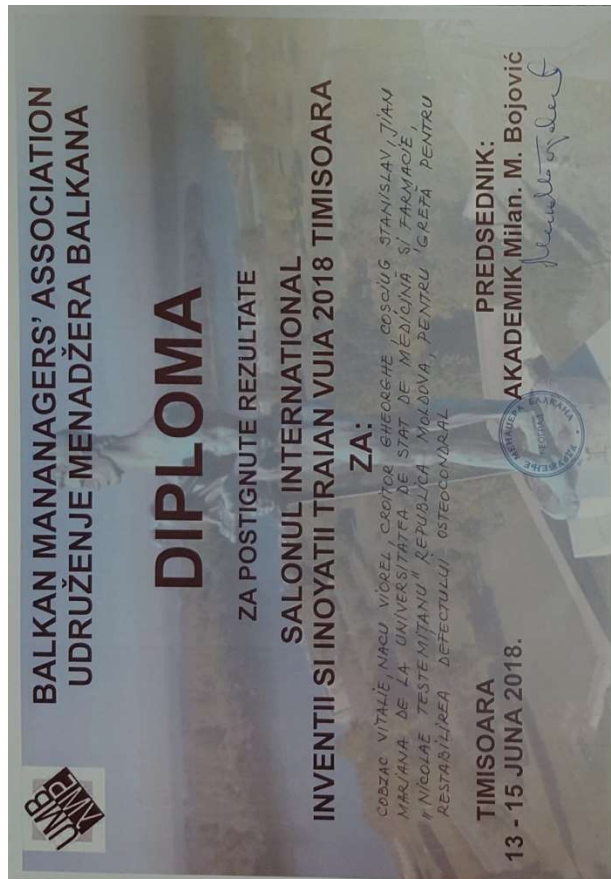
HELD ON AUGUST 28TH, 2021 IN TORONTO, CANADA




MOONSUK CHANG
ORGANIZING CHAIRMAN




BOB HUYBRECHTS
GOVERNOR OF THE IJCA





UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA

hr STRATEGIA RESURSELOR UMANE
PENTRU CERCETĂTORI

DIPLOMĂ

Se decernează

Dlui Vitalie Cobzac

pentru promovarea activă a realizărilor științifice în cadrul Expoziției
internaționale specializate „Infoinvent”, ediția a XVI-a, Chișinău

20-23 Noiembrie 2019



Rector

E. Căbă



Emil Căban,

profesor universitar, dr. hab. șt. med.

Prorector pentru activitate
de cercetare

Stanislav Groppa

Stanislav Groppa,

profesor universitar, dr. hab. șt. med.,
academician al AȘM

Anexa 8. Burse de cercetare doctorală



Nr. CE/DG/28/2017

ADEVERINȚĂ DE BURSĂ

Domnul **Vitalie COBZAC** (păra de naționalitate : Republica Moldova), născut la data de 23/11/1986, doctorand la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova, beneficiar de o Bursă de cercetare doctorală a Agenției universitare a Francofoniei (AUF), în cadrul programului de burse „Eugen Ionescu” finanțat de Guvernul României, care îi permite să își desfășoare activitatea de cercetare în domeniul *Medicină* la Universitatea de medicină și farmacie „Gr.T. Popa” din Iași, România, care acceptă să îl primească.

Acastă bursă este atribuită pentru o durată de 3 luni în anul universitar 2016-2017 și include:

- un titlu de transport dus-întors pe ruta Chișinău-Iași-Chișinău care îi permite beneficiarului să ajungă la instituția gazdă și să se întoarcă în instituția sa de origine după încheierea perioadei de mobilitate;
- o alocație lunară de cercetare doctorală de 800 de euro, excluzând orice altă contribuție (cum ar fi taxele de laborator, taxele de viză și cheltuielile legate de obținerea acesteia, bagajul suplimentar, etc.);
- o asigurare de sănătate-accident-reparație subscrisă în numele beneficiarului pentru perioada mobilității.

Se precizează că acordarea acestei burse nu implică crearea unei relații de angajare sau de subordonare între AUF și beneficiarul bursei. Cercetarea derulată de beneficiar se supune regulilor în vigoare din cadrul instituției de origine și/sau instituției gazdă.

Plățile se vor efectua în monedă locală (RON) la cursul de schimb oficial al AUF în vigoare.

Prezenta adeverință se eliberează pentru a servi persoanei interesate.

Întocmit la București în data de 23 februarie 2017, în două exemplare originale, unul în franceză și unul în română.



Mohamed KETATA
Director Regional
Agenția universitară a Francofoniei
în Europa centrală și orientală



Dan NECULĂESCU
Secretar de Stat
Ministerul Afacerilor Externe din România



UNIVERSITÉ DE MÉDECINE ET PHARMACIE
GRIGORE T. POPA IASI

16, rue de l'Université, 700115, Iassy, Roumanie
www.unfiasi.ro

ATTESTATION DE FIN DE STAGE

Il certifie que par la présente attestation que monsieur Vitalie COBZAC, chercheur à l'USMF „Nicolae Testemițanu” de Chișinău (République de Moldavie) a effectué un stage de recherche doctorale au sein de Centre de Formation et Recherche dans l'Ingénierie Tissulaire et Médecine Régénérative de la Faculté de Bioingénierie Médicale à l'Université de Médecine et Pharmacie „Grigore T. Popa” de Iași dans l'intervalle allant du 24 avril au 23 juillet 2017. Bénéficiaire d'une bourse de doctorat dans le Programme de bourses „Eugen Ionescu” 2016-2017, le boursier, pendant sa période de mobilité, a suivi un programme d'activité axé sur le thème „Des greffes combinées en restauration de défet expérimental de cartilage articulaire chez le lapin”.

Au cours de cette période, Vitalie Cobzac a utilisé l'infrastructure de la Université de Médecine et Pharmacie „Grigore T. Popa” (bibliothèque, laboratoires de recherche, réactifs et matériels de laboratoire) dans l'analyse des composés de coordination.

Les recherches menées par le boursier visent les aspects suivants:

1. Le développement de supports à base de collagène type I extrait du tendon bovin et polysaccharides (acide hyaluronique, le chitosane, le chondroïtine sulfate A)
2. L'obtention de supports ostéochondrales de lapin déminéralisé et décellularisé;
3. L'analyse physico-chimiques, morphologiques des supports et leur propriétés mécaniques.
4. Faire des tests *in vitro* pour déterminer la cytocompatibilité des supports et leur popularisation cellulaire (cellules souches mésenchymateuses et chondrocytes de lapin).
5. Participation à des conférences internationales organisées par l'USMF „Nicolae Testemițanu” et les sociétés d'Orthopédie et Traumatologie et Médecine Régénérative de Roumanie et Moldavie.
6. Rédaction d'un article avec facteur d'impact.

Au cours de période de stage, monsieur Vitalie COBZAC a fait preuve de professionnalisme et d'une forte capacité à travailler en équipe. Nous sommes pleinement satisfaits de notre collaboration pendant son stage, Vitalie COBZAC a l'expérience accumulée de poursuivre les recherches et la coopération bilatérale.

Responsable administratif
Monsieur/Madame : Monica Hancianu
Fonction : recteur, vice-recteur
Université de Médecine et Pharmacie Grigore T. Popa Iași
Signature et tampon :



Responsable scientifique
Monsieur/Madame : Liliana Verestuc
Grade académique : Professeur
Signature :



BUREAU DU RECTEUR
+40 232 211 818 tel / +40 232 211 820 fax
rectorat@unfiasi.ro

page 1 de 1



ADEVERINȚĂ DE BURSĂ

Domnul **Vitalie COBZAC** (păra de naționalitate : Republica Moldova), născut la data de 23/11/1986, doctorand la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova, beneficiar de o Bursă de cercetare doctorală a Agenției universitare a Francofoniei (AUF), în cadrul programului de burse „Eugen Ionescu” finanțat de Guvernul României, care îi permite să își desfășoare activitatea de cercetare în domeniul *Medicină* la Universitatea de medicină și farmacie „Gr.T. Popa” din Iași, România, care acceptă să îl primească.

Acastă bursă este atribuită pentru o durată de 3 luni în anul universitar 2017-2018 și include:

- un titlu de transport dus-întors pe ruta Chișinău-Iași-Chișinău care îi permite beneficiarului să ajungă la instituția gazdă și să se întoarcă în instituția sa de origine după încheierea perioadei de mobilitate;
- o alocație lunară de cercetare doctorală de 800 de euro, excluzând orice altă contribuție (cum ar fi taxele de laborator, taxele de viză și cheltuielile legate de obținerea acesteia, bagajul suplimentar, etc.);
- o asigurare de sănătate-accident-reparație subscrisă în numele beneficiarului pentru perioada mobilității.

Se precizează că acordarea acestei burse nu implică crearea unei relații de angajare sau de subordonare între AUF și beneficiarul bursei. Cercetarea derulată de beneficiar se supune regulilor în vigoare din cadrul instituției de origine și/sau instituției gazdă.

Plățile se vor efectua în monedă locală (RON) la cursul de schimb oficial al AUF în vigoare.

Prezenta adeverință se eliberează pentru a servi persoanei interesate.

Întocmit la București în data de 20 februarie 2018, în două exemplare originale, unul în franceză și unul în română.



Mohamed KETATA
Director Regional
Agenția universitară a Francofoniei
în Europa centrală și orientală



Dan NECULĂESCU
Secretar de Stat
Ministerul Afacerilor Externe din România



UNIVERSITÉ DE MÉDECINE ET PHARMACIE
GRIGORE T. POPA IASI

16, rue de l'Université, 700115, Iassy, Roumanie
www.unfiasi.ro

ATTESTATION DE FIN DE STAGE

On certifie par la présente attestation que, Monsieur Vitalie COBZAC, chercheur à l'USMF „Nicolae Testemițanu” de Chișinău (République de Moldavie) a effectué un stage de recherche doctorale au sein de Centre de Formation et Recherche dans l'Ingénierie Tissulaire et Médecine Régénérative de la Faculté de Bioingénierie Médicale à l'Université de Médecine et Pharmacie „Grigore T. Popa” de Iași dans l'intervalle allant du 19 mars au 19 juin 2018. Bénéficiaire d'une bourse de doctorat dans le Programme de bourses „Eugen Ionescu” 2017-2018, le boursier, pendant sa période de mobilité, a suivi un programme d'activité axé sur le thème „Préparation du support ostéochondral déminéralisé et décellularisé approprié pour l'ingénierie du cartilage articulaire”.

Au cours de cette période, Vitalie Cobzac a utilisé l'infrastructure de l'Université de Médecine et Pharmacie „Grigore T. Popa” (bibliothèque, laboratoires de recherche, réactifs et matériels de laboratoire) dans l'analyse des composés de coordination.

Les recherches menées par le boursier visent les aspects suivants:

1. Tester plusieurs méthodes et concentration de différentes substances pour obtenir un support ostéochondral déminéralisé et décellularisé approprié pour l'ingénierie du cartilage articulaire.
2. L'analyse physico-chimiques, morphologiques des supports et leur propriétés mécaniques.
3. Faire des tests *in vitro* pour déterminer la cytocompatibilité des supports et leur popularisation cellulaire avec cellules souches mésenchymateuses et chondrocytes d'animaux de laboratoire (lapin).
4. Participation à des conférences internationales organisées par l'USMF „Nicolae Testemițanu” et les sociétés d'Orthopédie et traumatologie et Médecine régénérative de Roumanie et Moldavie.
5. Rédaction des articles scientifiques avec facteur d'impact.

Au cours de période de stage, Monsieur Vitalie COBZAC a fait preuve de professionnalisme et d'une forte capacité à travailler en équipe. Nous sommes pleinement satisfaits de notre collaboration pendant son stage, Vitalie COBZAC a l'expérience accumulée de poursuivre les recherches et la coopération bilatérale.

Responsable administratif
Madame : Monica Hancianu
Fonction : Vice-recteur
Université de Médecine et Pharmacie Grigore T. Popa Iași
Signature et tampon :



Responsable scientifique
Monsieur/Madame : Liliana Verestuc
Grade académique : Professeur
Signature :

BUREAU DU RECTEUR
+40 232 211 818 tel / +40 232 211 820 fax
rectorat@unfiasi.ro



WORLD FEDERATION OF SCIENTISTS

THE PRESIDENT

Mr. Vitalie Cobzac
State University of Medicine and
Pharmacy "Nicolae Testemitanu"
Chisinau, Republic of Moldova

Geneva, 13th May 2019

Concerns: Moldovan Scholarship Programme

Dear Mr. Cobzac,

Following the recommendation made by Academician Gheorghe Duca, National Representative of the World Federation of Scientists in Moldova, I have the pleasure of granting you a one-year scholarship to conduct research under the direct supervision of Professor Viorica Nacu at the State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau. The topic of your research, related to the WFS Planetary Emergency "Medicine & Biotechnology", will be "Combined grafts in experimental defect regeneration of the articular cartilage".

The scholarship will amount to 150 Swiss Francs per month and will be paid to you every two months against receipt. Please note that we must receive the following for the continuation of the scholarship:

- 1) A copy of this letter signed for acceptance by return mail.
2) The delivery of an interim report after six months, and a final report at the end of the scholarship.
3) Signed receipts every two months.

Wishing you success with your research work, I remain,

Yours sincerely

Handwritten signature of Professor Antonino Zichichi

Professor Antonino Zichichi
President

Enclosures: Basic Rules & Guidelines and Receipt Form

Main contacts:
ESTONIA - HELSINKI TALLIN - 10 Ravala Boulevard Tel: +37220412391 Fax: +37220449646 Email: reitars@post.ee
GEORGIA - TBILISI - 52 Kazbegi Avenue Tel: +99520299881 Fax: +99520299882 Email: biologicalcenter@
LITHUANIA - VILNIUS - 3 Giedrute Avenue Tel: +37020413651 Fax: +37020413465 Email: mdr@pab.lt
MEXICO - MEXICO CITY - 26 Via Guadalupe Tel: +525521289493 Fax: +525521289738 Email: jorjorjor@unam.mx
MONTENEGRO - PODGORICA - 22 Slobode Road Tel: +38214557591 Fax: +38214311095
NETHERLANDS - ROTTERDAM - 32A St. Janslandweg Tel: +31204919647 Fax: +31204919647
RUSSIA - MOSCOW - 48 Lenin Street Tel: +7495442162011 Fax: +7495442162012
SLOVAKIA - BRATISLAVA - 23 Srobarova Tel: +42122597755 Fax: +42122780219 Email: claudia.mont@iakovce.com
USA - Columbia University in the City of New York, NY 10027-NEW YORK - 534 West 119th Street Tel: +12122846239 Fax: +12122822169
EUROPEAN UNION - BRUSSELS - 1000 Brussels Tel: +3222797755 Fax: +32227978219 Email: claudia.mont@iakovce.com

Sections in the following countries:
ALGERIA • ARGENTINA • AUSTRIA • BELGIUM • BULGARIA • CANADA • CHINA • CZECH REPUBLIC • DENMARK • EGYPT • ESTONIA • FINLAND • FRANCE • GERMANY • GREECE • HUNGARY • INDIA • ITALY • JAPAN • JORDAN • KOREA • KUWAIT • LITHUANIA • MEXICO • POLAND • PORTUGAL • ROMANIA • RUSSIA • SLOVAKIA • SPAIN • SWEDEN • SWITZERLAND • THE NETHERLANDS • TUNISIA • TURKEY • UK • URBAN • USA • VIETNAM

Certificate for Vitalie Cobzac awarded to him for the completion of training visit in the Leibniz Research Laboratories for Biotechnology and Artificial Organs (LEBAO) at the Hannover Medical School (MHH), Germany during 1 Oct 2021 - 31 Mar 2022. Includes logos for NanoMedTWIN and lebao.

Certificate of Attendance for Vitalie COBZAC. Acknowledges completion of the five-day online training programme given on 16th-20th November 2020 at the JRC Nanobiotechnology Laboratory. Signed by Prof. Angeliopoulou, Head of Cellular Biotech Safety Unit.

Certificate of Participation for Vitalie COBZAC. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Has participated in the 7th European Training Course on Quality Management for 'Tissues Establishments' that took place from 26 September to 09 November 2022. Signed by Laurent Hallet, PRO, Head of Department D60, EDQM.

LISTA PUBLICAȚIILOR

ale dlui Cobzac Vitalie,

la teza de doctor în științe medicale,

cu tema: „Grefe combinate în restabilirea defectului experimental de cartilaj articular”

realizată în cadrul Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare,

a IP USMF „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE

- **Articole în reviste științifice peste hotare:**

- ✓ **articole în reviste ISI, SCOPUS și alte baze de date internaționale**

1. **Cobzac V.**, Verestiuc L., Jian M., Nacu V. Assesment of ionic and anionic surfactants effect on demineralized osteochondral tissue. In: *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 2019; 572:012084. doi:10.1088/1757-899X/572/1/012084 (**SCOPUS**).
2. **Cobzac V.**, Jian M., Nacu V. Cellularization of small sized grafts from biological material using the gravitational modality principle. In: *J. Phys.: Conf. Ser.* 2021; 1960:012004. doi: 10.1088/1742-6596/1960/1/012004 (**SCOPUS**).
3. **Cobzac V.**, Jian M., Globa T., Nacu V. The cartilaginous tissue regeneration on weight bearing and non-weight bearing surfaces of the knee. In: *IFMBE Proceedings.* 2022; 87:334–341. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-92328-0_44 (**SCOPUS**).

- **Articole în reviste științifice naționale acreditate:**

- ✓ **articole în reviste de categoria B/B+**

4. **Cobzac V.**, Mostovei A., Jian M., Nacu V. An efficient procedure of isolation, cultivation and identification of bone marrow mesenchymal stem cells. In: *Mold Med Journal.* 2019; 62(1):35-41. doi: 10.5281/zenodo.2590011 (**DOAJ**).
5. **Cobzac V.**, Verestiuc L., Jian M., Nacu V. Chondrocytes isolation from hyaline cartilage by continuous monitoring method. In: *Mold Med Journal.* 2021; 64(6):13-19. doi: <https://doi.org/10.52418/moldovan-med-j.64-6.21.03> (**DOAJ**).
6. **Cobzac V.**, Jian M., Globa T., Nacu V. Joint cartilage experimental defect regeneration by hierarchic biphasic combined grafts. In: *Mold Med J.* 2022; 66(2):20-29. doi: <https://doi.org/10.52418/moldovan-med-j.65-2.22.03> (**DOAJ**).
7. Jian M., **Cobzac V.**, Nacu V. Dispozitive și metode brevetate cu utilizare în ingineria tisulară. In: *INTELLECTUS.* 2022; 1:94-100. doi: <https://doi.org/10.56329/1810-7087.22.1.09>

- **Rezumate/abstracte/teze în lucrările conferințelor științifice internaționale**

8. **Cobzac V.**, Verestiuc L., Jian M., Nacu V. Preclinical testing of decellularized and demineralized osteochondral allografts on rabbit model. In: *The 56th annual meeting of veterinary sciences „Towards a global health”*. Iași, România; 2017. p.79
9. **Cobzac V.**, Coșciug S., Jian M., Nacu V. Appreciation of cartilage permeability within demineralized and decellularized osteochondrol allogeneic graft with trypan blue. In: *Матеріали Науково-практичної конференції з міжнародною участю. Актуальні питання травматології та остеосинтезу*. Чернівці, Україна; 2017. p. 140.
10. **Cobzac V.**, Jian, M., Coșciug S., Nacu V. Comparison of in vitro effect of osteochondral demineralised and demineralised-decellularized grafts on cells used in cartilage regeneration. In: *EATB 26*. Treviso, Italia; 2017. p. 24-25.
11. **Cobzac V.**, Verestiuc L., Jian M., Coșciug S., Nacu V. Preclinical testing of ODDG. Preliminary report. In: *The 2nd International Biomedical Congres of Sofia*. Sofia, Bulgaria; 2017. p.74.
12. Nacu V., **Cobzac V.**, Jian M., Verestiuc L. Decellularized-demineralized osteochondral allografts testing on rabbit model. Preliminary report. In: *TERMIS 2018*. Kyoto, Japonia; 2018. p.78.
13. **Cobzac V.**, Nacu V., Jian M., Coșciug S., Paladi C, Macagonova O. Method of collagen sponge obtaining. In: *The International Student Innovation and Scientific Research Exhibition „Cadet INOVA '18”*. Sibiu, Romania; 2018. p. 207.
14. **Cobzac V.**, Nacu V., Croitor G., Coșciug S., Jian M. Grafting for restoring the osteochondral defect. In: *The International Student Innovation and Scientific Research Exhibition „Cadet INOVA '18”*. Sibiu, Romania; 2018. p. 208.
15. **Cobzac V.**, Nacu V., Croitor G., Coșciug S., Jian M. Grafting for restoring the osteochondral defect. In: *Proceedings of the 10th Edition of Euroinvent European Exhibition of Creativity and Innovation*. Iasi, Romania; 2018. p. 191.
16. **Cobzac V.**, Nacu V., Jian M., Coșciug S., Paladi C, Macagonova O. Method of collagen sponge obtaining. În: *Salonul Internațional al Cercetării Științifice, Inovării și Inventicii, Ediția XVI*. Cluj-Napoca, Romania; 2018. p. 186-187.
17. **Cobzac V.**, Verestiuc L., Jian M., Nacu V. Assesment of ionic and anionic surfactants effect on demineralized osteochondral tissue. In: *The 5th International Conference on Innovative Research. ICIR 2019*. Iasi, Romania; 2019. p. 122.
18. **Cobzac V.**, Nacu V., Jian M., Sarev V., Macagonova O. Device for reticulation of collagen sponge with glutaraldehyde vapors. In: *The International Student Innovation and Scientific Research Exhibition „Cadet INOVA '19”*. Sibiu, Romania; 2019. p. 175.

19. **Cobzac V.**, Nacu V., Jian M., Coșciug S., Paladi C., Macagonova O. Method of collagen sponge obtaining. In: *Proceedings of the 11th Edition of Euroinvent European Exhibition of Creativity and Innovation*. Iasi, Romania. 2019. p. 195-196.
20. **Cobzac V.**, Nacu V., Jian M., Sarev V., Macagonova O. Device for reticulation of collagen sponge with glutaraldehyde vapors. In: *Proceedings of the 11th Edition of Euroinvent European Exhibition of Creativity and Innovation*. Iasi, Romania. 2019. p. 197.
21. **Cobzac V.**, Nacu V., Croitor G., Coșciug S., Jian M. Grafting for restoring the osteochondral defect. În: *Salonul Internațional al Cercetării Științifice, Inovării și Inventicii, Ediția XVII*. Cluj-Napoca, Romania. 2019. p. 213-214.
22. **Cobzac V.**, Jian M., Mostovei A., Nacu V. Bone augmentation with natural and synthetic materials. In: *International Chemical Engineering and Material Symposium, SICHEM 2020*. Bucharest, Romania; 2020. p. 114.
23. **Cobzac V.**, Nacu V., Glavan A., Jian M., Sedaia E., Ababii P. Small-sized graft fixation and cellularization device. In: *The International Student Innovation and Scientific Research Exhibition „Cadet INOVA '20”*. Sibiu, Romania; 2020. p. 233.
24. **Cobzac V.**, Nacu V., Glavan A., Jian M., Sedaia E., Ababii P. Small-sized graft fixation and cellularization device. In: *Proceedings of the 13th Edition of Euroinvent European Exhibition of Creativity and Innovation*. Iasi, Romania; 2021. p. 194.
25. Jian M., Nacu V., **Cobzac V.**, Braniște T. Method of isolation of cell cultures. În: *Salonul Internațional de Invenții și Inovații „Traian Vuia”, ediția a VIII-a*. Timișoara, România; 2022. p. 51.
26. **Cobzac V.**, Jian M., Nacu V. The efficiency of device for fixation and cellularization of small sized grafts. In: *International Conference on Innovative Research, ICIR 2021*. Iași, Romania; 2021. p. 79.
27. **Cobzac V.**, Verestiuc L., Jian M., Nacu V. Selection of an appropriate cross-linking method of collagen sponges for articular cartilaginous tissue engineering. In: *Virtual International Scientific Conference on “Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering – NanoBioMat 2021”*. Bucharest, Romania; 2021. p. 40.
28. Jian M., Nacu V., **Cobzac V.**, Braniște T. Method of isolation of cell cultures. In: *Proceedings of the 14th Edition of Euroinvent European Exhibition of Creativity and Innovation*. Iasi, Romania; 2022. p. 171.

- **Rezumate/abstracte/teze în lucrările conferințelor științifice naționale**

29. **Cobzac V.**, Jian M., Madan V., Croitor Gh., Nacu V. Collagen/Chitosan hybrid sponge as a scaffold for cell culture. În: *Maedica, Ediție specială: Al VIII-lea congres național de ortopedie și traumatologie cu participare internațională*. Chișinău; 2016. 4(61), p. 47.
30. **Cobzac V.**, Jian M., Madan V., Croitor Gh., Nacu V. Method of chondrocytes isolation from hyaline cartilaj. În: *Maedica, Ediție specială: Al VIII-lea congres național de ortopedie și traumatologie cu participare internațională*. Chișinău; 2016. 4(61), p. 47-48.
31. **Cobzac V.**, Jian M., Croitor Gh., Nacu V. Cultivarea de condrocite autologe pentru terapia celulară. În: *Maedica, Ediție specială, Conferința Stiințifică „Nicolae Anestiadi - Nume etern al Chirurgiei Basarabene”*. Chisinău; 2016. 3(60), p. 10.
32. **Cobzac V.**, Jian M., Croitor Gh., Nacu V. Suport celular pentru ingineria tisulară. În: *Maedica, Ediție specială, Conferința Stiințifică „Nicolae Anestiadi - Nume etern al Chirurgiei Basarabene”*. Chișinău; 2016. 3(60), pp. 9-10.
33. **Cobzac V.**, Nacu V., Jian M., Paladi C., Sarev V. Dispozitiv pentru reticularea spongiei de colagen cu vapori de glutaraldehidă. În: *Catalog oficial Expoziția Internațională Specializată „Infoinvent 2017”, Ediția a XV-a*. Chișinău; 2017. p. 144.
34. **Cobzac V.**, Nacu V., Jian M., Coșciug S., Paladi C., Macagonova O. Metodă de obținere a spongiei de colagen. În: *Catalog oficial Expoziția Internațională Specializată „Infoinvent 2017”, Ediția a XV-a*. Chișinău; 2017. p. 145.
35. **Cobzac V.**, Nacu V., Croitor G., Coșciug S., Jian M. Grefă pentru restabilirea defectului osteocondral. În: *Catalog oficial Expoziția Internațională Specializată „Infoinvent 2017”, Ediția a XV-a*. Chișinău; 2017. p. 145-146.
36. Jian M., **Cobzac V.**, Popescu V., Nacu V. Verestiuc L. Obtaining of a suitable osteochondral graft for articular cartilage engineering. In: *The 7th International medical congress for students and young doctors, MedEspera2018*. Chișinău; 2018. p. 202.
37. **Cobzac V.**, Nacu V., Glavan A., Jian M, Sedaia E., Ababii P. Dispozitiv pentru fixarea și celularizarea grefelor de dimensiuni mici. În: *Catalog oficial Expoziția Internațională Specializată „Infoinvent 2019” Ediția a XVI-a*. Chișinău; 2019. p. 119.
38. **Cobzac V.**, Verestiuc L., Jian M., Nacu V. Tissue engineered grafts in articular cartilage defects treatment. În: *Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „N. Testemițanu”*, Chișinău; 2020. p. 500.
39. **Cobzac V.**, Jian M., Globa T., Nacu V. The cartilaginous tissue regeneration on weight bearing and non-weight bearing surfaces of the knee. In: *The 5th International conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME-2021*. Chișinău; 2021. p. 89.

- **Brevete de invenții, patente, certificate de înregistrare, materiale la saloanele de invenții**
 40. **Cobzac V.**, Nacu V., Jian M., Sarev V., Macagonova O. Dispozitiv pentru reticularea spongiei de colagen cu vapori de glutaraldehidă. Brevet de invenție MD 1137 Y. BOPI nr.4/2017, 2017.04.30.
 41. **Cobzac V.**, Nacu V., Jian M., Coșciug S., Paladi C., Macagonova O. Metodă de obținere a spongiei de colagen. Brevet de invenție MD 1169 Y. BOPI nr.7/2017, 2017.07.31.
 42. **Cobzac V.**, Nacu V., Croitor G., Coșciug S., Jian M. Grefă pentru restabilirea defectului osteocondral. Brevet de invenție MD 1177 Y. BOPI nr.8/2017, 2017.08.31.
 43. **Cobzac V.**, Nacu V., Glavan A., Jian M., Sedaia E., Ababii P. Dispozitiv pentru fixarea și celularizarea grefelor de dimensiuni mici. Brevet de invenție MD 1332 Y. BOPI nr.4/2019, 2019.04.30.
 44. **Cobzac V.**, Nacu V., Jian M. Dispozitiv pentru separarea pastei osoase demineralizate. Brevet de invenție MD 1582 Y. BOPI nr.12/2021, 2021.12.31.
 45. Jian M., Nacu V., **Cobzac V.**, Braniște F. Metodă de izolare a culturilor celulare. Brevet de invenție MD 1584 Y. BOPI nr.12/2021, 2021.12.31.
- **Participări cu comunicări la foruri științifice:**
 - ✓ **internaționale**
 46. **Cobzac V.**, Coșciug A., Jian M., Nacu V. Appreciation of cartilage permeability within demineralised and decellularized osteochondral allogeneic graft with trypan blue. *Науково-практична конференція з міжнародною участю. Актуальні проблеми травматології та остеосинтезу. Чернівці, Україна, 27 квітня 2017.*
 47. Nacu V., Țîmbădari T., **Cobzac V.**, Coșciug S., Cociug A. Tissue and cell transplantation in the Republic of Moldova. *Науково-практична конференція з міжнародною участю. Актуальні проблеми травматології та остеосинтезу. Чернівці, Україна, 27 квітня 2017.*
 48. **Cobzac V.** Preclinical testing of decellularized and demineralized osteochondral allografts on rabbit model. Preliminary report. *Simpozionul „Medicină Regenerativă – știință practică și intrdisciplinaritate”.* Iasi, Romania, 18 octombrie 2017.
 49. **Cobzac V.** Preclinical testing of ODDG. Preliminary report. *The 2nd international biomedical congress of Sofia.* Sofia, Bulgaria, 17-19 November 2017.
 50. **Cobzac V.**, Jian M., Coșciug S., Nacu V. Comparison of in vitro effect of osteochondral demineralised and demineralised-decellularized grafts on cells used in cartilage regeneration. *EATB 26.* Treviso, Italia, 17- 22 octombrie 2017.

51. **Cobzac V.**, Vereștiuc L., Jian M., Nacu V. Assesment of ionic and anionic surfactants effect on demineralized osteochondral tissue. *The 5th edition of International Conference on Innovative Research, ICIR 2019*. Iași, Romania, 16-18 May 2019.
 52. **Cobzac V.** Combined grafts in the treatment of osteochondral defects. *SPEAKER în cadrul conferinței CONFESTESIS, ediția a II-a*. Iași, România, 24-26 octombrie 2019.
 53. **Cobzac V.**, Jian M., Mostovei A., Nacu V. Bone augmentation with natural and synthetic materials. *International Chemical Engineering and Material Symposium, SICHEM 2020*. Bucharest, Romania, 17-18 September 2020.
 54. **Cobzac V.**, Jian M., Nacu V. The efficiency of device for fixation and cellularization of small sized grafts. *The 7th edition of International Conference on Innovative Research, ICIR 2021*. Iași, Romania, 20-21 May 2021.
 55. **Cobzac V.**, Verestiuc L., Jian M., Nacu V. Selection of an appropriate cross-linking method of collagen sponges for articular cartilaginous tissue engineering. *Virtual International Scientific Conference on “Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering – NanoBioMat 2021”*. Bucharest, Romania, 25-26 June 2021.
- ✓ **naționale**
56. **Cobzac V.**, Jian M., Madan V., Croitor Gh., Nacu V. Metoda izolarii conrocitelor din cartilajul hialin. *Al VIII-lea congres național de ortopedie și traumatologie cu participare internațională*. Chișinău, 12-14 octombrie 2016.
 57. **Cobzac V.**, Jian M., Globa T., Nacu V. The cartilaginous tissue regeneration on weight bearing and non-weight bearing surfaces of the knee. *The 5th International conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME-2021*. Chișinău, 3-5 November 2021.
 58. Jian M., **Cobzac V.**, Popescu V., Verestiuc L. Obtaining of a suitable osteochondral graft for articular cartilage engeneering. *The 7th International medical congress for students and young doctors, MedEspera2018*. Chișinău, 3-5 May 2018.
 59. **Cobzac V.**, Vereștiuc L., Jian M., Coșciug S., Nacu V. Matrixuri tridimensionale în ingineria tisulară. *Zilele Universității și Conferința științifică anuală, consacrate aniversării a 90-a de la nașterea ilustrului medic și savant Nicolae Testemițanu*. Chișinău, 16-20 octombrie 2017.
 60. **Cobzac V.** Grefe tridimensionale în restabilirea cartilajului articular. *Zilele Universității și Conferința științifică anuală*. Chișinău, 15-19 octombrie 2018.
 61. **Cobzac V.**, Vereștiuc L., Jian M., Nacu V. Grefe obținute prin inginerie tisulară în tratamentul defectelor de cartilaj articular. *Congresul consacrat aniversării a 75-a de la*

fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova. Chișinău, 21-23 octombrie 2020.

62. **Cobzac V.** Regenerarea defectelor de cartilaj articular. *Conferința științifică anuală consacrată aniversării a 77-a de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova. Chișinău, 18-21 octombrie 2022.*

- **Participări cu postere la foruri științifice:**

- ✓ **internaționale**

63. Nacu V., **Cobzac V.**, Jian M., Verestiuc L. Decellularized-demineralized osteochondral allografts testing on rabbit model. Preliminary report. *The 5th TERMIS World Congress.* Kyoto, Japan, 5-7 September 2018.

- **Proiecte de cercetare la tema tezei:**

- ✓ **naționale**

64. Proiect din cadrul programului de stat „Regenerare prin terapie celulară a țesuturilor și organelor afectate”, perioada 2014-2015, proiectul „Testarea posibilităților de utilizare a celulelor stem pentru refacerea cartilajului hialin al articulațiilor diartrodiale în afecțiunile degenerativ distrofice”, cifrul 14.519.04.01A, cu finanțare de la bugetul de stat - executor proiect.

65. Proiect din cadrul programului de stat „Regenerare prin terapie celulară a țesuturilor și organelor afectate”, perioada 2016-2017, proiectul „Aplicarea clinică a terapiei celulare în refacerea cartilajului hialin al articulațiilor diartrodiale în afecțiunile degenerativ distrofice”, cifrul 16.00354.80.01A, cu finanțare de la bugetul de stat - executor proiect.

- **Stagii de cercetare peste hotare:**

66. Bursa „Eugen Ionescu” de cercetare doctorală în cadrul Centrului de formare și cercetare în ingineria țesuturilor, organe artificiale și medicină regenerativă a UMF „Grigore T. Popa” din Iași, România, 24 aprilie - 23 iulie 2017.

67. Bursa „Eugen Ionescu” de cercetare doctorală (renouvellement) în cadrul Centrului de formare și cercetare în ingineria țesuturilor, organe artificiale și medicină regenerativă a UMF „Grigore T. Popa” din Iași, România, 19 martie – 19 iunie 2018.

68. Bursa Federației Mondiale a Savanților (FMS), 1 iunie 2019 - 31 mai 2020.

69. Training visit in the Leibniz Research Laboratories for Biotechnology and Artificial Organs (LEBAO) at the Hannover Medical School (MHH), Germany, organised in the framework of the Horizon2020 project “NanoMedTwin”, 1 October 2021 - 31 March 2022.

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnatul, Cobzac Vitalie declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Cobzac Vitalie

Semnătura



Data: 18 august 2023

DECLARATION ON ACCOUNTABILITY

I declare the personal responsibility that information presented in this thesis are the result of my own research and scientific achievements. I realize that, otherwise, will suffer the consequences in accordance with law.

Cobzac Vitalie

Signature



Date: August 18, 2023

CV-ul AUTORULUI



Nume: Cobzac

Prenume: Vitalie

Data și locul nașterii: 23 noiembrie, 1986, Chișinău, Republica Moldova.

Cetățenie: Republica Moldova, România.

Studii :

1993-2002 – Gimnaziu Nr. 42, or. Codru, mun. Chișinău, R. Moldova.

2002-2005 – Liceul teoretic „Vasile Alecsandri”, or. Chișinău, R. Moldova.

2005-2011 – Studii superioare la Facultatea de Medicină generală, USMF “Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova.

2011- 2015 – Studii de Rezidențiat specialitatea Ortopedie și Traumatologie, USMF “Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova.

2016-2021 – Studii de doctorat, programul de doctorat 341.01 Inginerie tisulară și culturi celulare, USMF “Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova.

Stagii:

24 aprilie - 23 iulie 2017 – Bursa „Eugen Ionescu” în cadrul Centrului de formare și cercetare în Ingineria tisulară și Medicină regenerativă al UMF „Grigore T. Popa” din Iași, România.

19 martie - 19 iunie 2018 – Bursa „Eugen Ionescu” (renouvellement), în cadrul Centrului de formare și cercetare în Ingineria tisulară și Medicină regenerativă al UMF „Grigore T. Popa” din Iași, România.

1 iunie 2019 - 31 mai 2020 – Bursa Federației Mondiale a Savanților.

16-20 noiembrie 2020 – JRC Nanobiotechnology Laboratory (online).

1 octombrie 2021 - 31 martie 2022 - Leibniz Research Laboratories for Biotechnology and Artificial Organs (LEBAO) at the Hannover Medical School (MHH), Germany.

26 septembrie - 9 noiembrie 2022 - European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, Council of Europe (online).

Activitatea profesională:

2009-2012 – asistent medical de salon, Secția Traumatism Asociat, IMSP Institutul de Medicină Urgentă (IMU).

2012-2013 – felcer de urgență, IMSP IMU.

2014-2015 – medic rezident Ortoped-Traumatolog, Secția Ortopedie și Traumatologie Nr. 2, IMSP IMU.

2015-2020 – medic Ortoped-Traumatolog de urgență, Secția Ortopedie și Traumatologie Nr. 2, IMSP IMU (cumul).

Ianuarie 2016-august 2016 – secretar al Comisiei de Urgentare a pacienților pentru tratament costisitor implanto-protetic, IMSP IMU (cumul).

2014-2015 – cercetător științific stagiar, Laboratorul de Inginerie tisulară și culturi celulare, USMF “Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova (cumul).

2015-prezent – cercetător științific, Laboratorul de Inginerie tisulară și culturi celulare, USMF “Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova.

2018-prezent – medic specialist, Banca de Țesuturi Umane, IMSP Spitalul Clinic de Traumatologie și Ortopedie (cumul).

Domeniile de activitate științifică:

Obținerea, testarea și selectarea prin metode *in vitro* și *in vivo* a diferitor grefe și substanțe cu scop de utilizare și implementare în practica clinică.

Participări la foruri științifice și expoziții naționale/internaționale:

1. Al VIII-lea congres național de ortopedie și traumatologie cu participare internațională. Chișinău, Republica Moldova, 26-27 august 2016.

2. Conferința Probleme actuale în traumatologie și osteosinteză. Cernăuți, Ucraina, 27-28

martie 2017.

3. Simpozionul de Medicină regenerativă - știință practică și interdisciplinaritate. Iași, România, 18-20 octombrie 2017.
4. Al 26-lea Congresul anual al Asociației Europene a Băncilor de Țesuturi și Celule. Treviso, Italia, 18-20 octombrie 2017
5. Al II-lea Congres Internațional de Biomedicină. Sofia, Bulgaria, 17-19 noiembrie 2017.
6. Congresul Mondial al Societății Internaționale de Inginerie Tisulară și Medicină Regenerativă, TERMIS 2018. Kyoto, Japonia, 4-7 septembrie 2018.
7. Expoziția Internațională Specializată „Infinvent”. Edițiile a XV-a și a XVI-a. Chișinău, 2017 și 2019.
8. Congresul Medical Internațional pentru Studenți și Medici tineri, MedEspera 2018.
9. Expoziția internațională de inovare și cercetare științifică a studenților „Cadet INOVA” Edițiile a 18-a, a 19-a și a 20-a. Sibiu, România, 2018, 2019 și 2020.
10. Expoziția europeană de creativitate și inovație EUROINVENT Edițiile a 10-a, a 11-a, a 12-a și a 13-a și Conferința Internațională de Cercetare Inovatoare-ICIR EUROINVENT Edițiile a 11-a și a 13-a Iași, România, 2018, 2019, 2020 și 2021.
11. Salonul Internațional al Cercetării Științifice, Inovării și Inventicii „Proinvent”. Edițiile a XVI-a, a XVII-a și a XVIII-a. Cluj-Napoca, România, 2018, 2019 și 2020.
12. Conferința Internațională de Estetică - Abordări Plastice și Regenerative în Medicină și Chirurgie, CONFESTESIS-2019. Iași, România, 24-26 octombrie 2019.
13. Simpozionul Internațional de inginerie chimică și materiale, SICHEM 2020. București, România, 17-18 septembrie 2020.
14. Congresul Național al Asociației „Romtransplant”. Iași, România, 23-26 septembrie 2020.
15. Conferința Internațională de Nanotehnologii și Inginerie Biomedicală. Chișinău, 3-5 noiembrie 2021.
16. Conferința Științifică Anuală a USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2017, 2018, 2020 și 2022.

Distincții de preciere a activității științifice: Premii speciale (cupe, trofee) – 20; Medalii de aur – 32; Medalii de argint – 9; Medalii de bronz – 2.

Publicații: Articole în reviste științifice internaționale cotate Clarivate și SCOPUS – 15; Articole în culegeri științifice internaționale – 1; Articole în reviste categoria C – 6, categoria B/B+ – 12; Articole în alte culegeri naționale – 10; Teze în materialele congreselor, conferințelor, simpozioanelor științifice naționale/internaționale – 75; Comunicări la manifestări științifice naționale/internaționale – 28; Brevete de invenție obținute – 11.

Participări la proiecte științifice naționale și internaționale:

Naționale:

1. Proiect din cadrul programului de stat „Regenerare prin terapie celulară a țesuturilor și organelor afectate”, perioada 2014-2015, proiectul „Testarea posibilităților de utilizare a celulelor stem pentru refacerea cartilajului hialin al articulațiilor diartrodiale în afecțiunile degenerativ distrofice”, cifrul 14.519.04.01A, cu finanțare de la bugetul de stat - executor proiect.
2. Proiect din cadrul programului de stat „Regenerare prin terapie celulară a țesuturilor și organelor afectate”, perioada 2016-2017, proiectul „Aplicarea clinică a terapiei celulare în refacerea cartilajului hialin al articulațiilor diartrodiale în afecțiunile degenerativ distrofice”, cifrul 16.00354.80.01A, cu finanțare de la bugetul de stat - executor proiect.
3. Proiect instituțional „Ingineria tisulară în crearea și restabilirea țesutului hepatic” perioada 2015-2018, cifrul 15.817.04.04 F, cu finanțare de la bugetul de stat - executor proiect.
4. Proiect tineri cercetători „Restabilirea defectelor osoase cu grefe tridimensionale acelulare” cifrul 18.80012.80.14A, perioada 2018-2019, cu finanțare de la bugetul de stat - executor proiect.
5. Proiect din cadrul programului de stat „Medicina de precizie în prevenirea, diagnosticul și tratamentul patologiilor” cifrul 18.80.07.11A/PS, proiectul „Ingineria tisulară în tratamentul miniinvaziv a chisturilor osoase benigne și necrozelor aseptice” perioada 2018-2019, cu

finanțare de la bugetul de stat - executor proiect.

6. Proiect tineri cercetători „Elaborarea suprafețelor cu grad controlat de hidrofobie datorită nanomicrostructurii”, cifrul 04/26.10.18A, perioada 2019, cu finanțare de la bugetul de stat - executor proiect.

7. Proiect tip Program de Stat „Nanoarhitecturi în bază de GaN și matrici tridimensionale din materiale biologice pentru aplicații în microfluidică și inginerie tisulară”, cu cifrul 20.80009.5007.20. perioada 2020-2023, cu finanțare de la bugetul de stat - executor proiect.

Limbi vorbite (comprehensiune orală/citit/scriș/exprimare scrișă/conversație): română – maternă; franceză – B2/B2/B2/B2/B2; engleză – B2/B2/B2/B2/B2; rusă – C1/C1/C1/C1/C1; germană - A1/A1/A1/A1/A1.

Date de contact:

Adresa: Laboratorul de Inginerie tisulară și culturi celulare, USMF “Nicolae Testemițanu”, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt 165, MD-2004, Republica Moldova.

Telefon serviciu: +373 22 205324; **e-mail:** vitalie.cobzac@usmf.md