

**Școala doctorală în domeniul Științe medicale**

Cu titlu de manuscris

C.Z.U: [576.3.085+611.018+616.13/.14-089.844](043.2)

**MALCOVA Tatiana**

**MODIFICĂRILE MORFOLOGICE ȘI BIOMECANICE ÎN  
DECELULARIZAREA VASELOR SANGUINE**

**341.01 INGINERIE TISULARĂ ȘI CULTURI CELULARE**

**Rezumatul tezei de doctor în științe medicale**

**Chișinău, 2023**

Teza a fost elaborată în cadrul Laboratorului de inginerie tisulară și culturi celulare, Catedra de anatomie și anatomie clinică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova.

**Conducător**

Nacu Viorel,  
dr. hab. șt. med., prof. univ.

  
semnătura


**Conducător prin cotutelă**

Ciubotaru Anatol,  
dr. hab. șt. med., prof. univ.

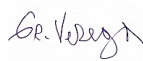
  
semnătura

**Membrii comisiei de îndrumare**

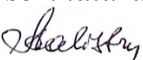
Topor Boris,  
dr. hab. șt. med., prof. univ.

  
semnătura

Verega Grigore,  
dr. hab. șt. med., conf. univ.

  
semnătura

Calistru Anatol,  
dr. șt. med., conf. univ.

  
semnătura

Susținerea va avea loc la data de 20 decembrie 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 05 octombrie 2023 (proces-verbal nr. 20).

**Componenta Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat:**

**Președinte:**

Casian Dumitru,  
dr. hab. șt. med., conf. univ.

  
semnătura

**Membrii:**

Nacu Viorel,  
dr. hab. șt. med., prof. univ.

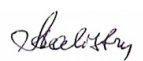
  
semnătura

Ciubotaru Anatol,  
dr. hab. șt. med., prof. univ.

  
semnătura

**Referenți oficiali:**

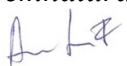
Calistru Anatol,  
dr. șt. med., conf. univ.

  
semnătura

Fulga Veaceslav,  
dr. hab. șt. med., conf. univ.

  
semnătura

Ficai Anton,  
dr. hab. șt. ing., prof. univ., Membru corespondent al  
Academiei Oamenilor de Știință din România

  
semnătura

**Autor**

Malcova Tatiana

  
semnătura

## CUPRINS

|   |    |
|---|----|
| <b>REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII</b>  | 4  |
| <b>CONȚINUTUL TEZEI</b>   | 8  |
| 1.INGINERIA TISULARĂ ESTE VIITORUL ÎN DEZVOLTAREA GREFELOR<br>VASCULARE           | 9  |
| 2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE   | 10 |
| 3. CARACTERIZAREA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A ȚESUTULUI<br>VASCULAR DECELULARIZAT | 12 |
| CONCLUZII GENERALE  | 19 |
| RECOMANDĂRI PRACTICE  | 20 |
| LIMITELE STUDIULUI  | 20 |
| <b>BIBLIOGRAFIE</b>   | 20 |
| <b>LISTA PUBLICAȚIILOR AUTORULUI LA TEMA TEZEI</b>                                | 23 |
| <b>ANNOTATION</b>   | 27 |
| <b>ADNOTARE</b>   | 28 |
| <b>АННОТАЦИЯ</b>  | 29 |

## REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

### Actualitatea și importanța subiectului studiat

Bolile cardiovasculare continuă să fie una dintre cele mai răspândite probleme de sănătate la nivel mondial. Cele mai recente statistici din domeniu prevăd că, din cauza îmbătrânirii populației, incidența anuală a letalității legate de bolile cardiovasculare va crește de la 16,7 milioane în 2002 la 23,3 milioane în 2030 [1, 2, 3, 4, 5].

Opțiunile de tratament disponibile pentru aceste patologii sunt variabile și pot fi împărțite în următoarele grupe: modificările în stilul de viață, terapia medicamentoasă și intervențiile de revascularizare [3, 6]. În pofida beneficiilor terapiei comportamentale și medicamentoase, acestea nu sunt întotdeauna salvatoare. În unele cazuri, cel mai bun tratament medical conservator poate eșua, metodele alternative fiind necesare pentru a obține rezultate clinice pozitive de durată. Ghidurile elaborate în domeniu recomandă intervenția chirurgicală de bypass la pacienții cu simptome persistente. Procedura presupune realizarea unei căi alternative de irigare cu sânge în zonă prin „înlocuirea” vaselor sanguine sever îngustate cu o grefă. În acest fel, se creează o nouă cale pentru fluxul sanguin și se restabilește funcțional teritoriul afectat [7, 8].

În prezent, sunt disponibile următoarele tipuri de grefe pentru arterele modificate: autogrefe, alogrefe, xenogrefe și proteze sintetice [9]. Deși în reconstrucția vasculară sunt utilizate diverse materiale, o grefă „ideală” rămâne o necesitate clinică nerealizată și care nu este disponibilă „off-the-shelf”. În plus, în prezent există anumite rezerve vasculare la pacientul, care necesită operație reconstructivă de pontaj cu înlocuirea vaselor sanguine de diametru mic (<6,0 mm) [10].

Limitările în utilizarea vaselor autologe (cum ar fi artera mamară internă, vena safenă magna sau artera radială) sunt legate de disponibilitatea scăzută, majoritatea vaselor fiind afectate de leziuni aterosclerotice difuze, flebită, boala varicoasă, sunt hipoplazice sau au fost îndepărtate anterior; puține vase rămân într-adevăr potrivite pentru acest scop. Protezele din material sintetic precum Dacron sau Politetrafluoretilenă (PTFE) sunt predispuse la tromboză și hiperplazie neointimală, în special atunci când sunt aplicate în poziție de înaltă presiune cu debit scăzut. Rezultate clinice nesatisfăcătoare se înregistrează, inclusiv la utilizarea țesuturilor xenogene sau alogene din cauza dilatării anevrismale, infecției și trombozei precoce. Lipsa în clinică a unui substituent adecvat a impus cercetări în domeniu pentru dezvoltarea biomaterialelor alternative în crearea protezelor vasculare [7, 10, 11, 12].

Ingineria tisulară poate depăși neajunsurile grefelor disponibile în prezent prin generarea de vase funcționale pe bază biologică, care ar putea reproduce mai fidel țesutul nativ. Una dintre abordările în acest domeniu se referă la utilizarea tehnicilor de decelularizare, care permite generarea matricelor funcționale [10, 13, 14, 15, 16].

Decelularizarea (DC) presupune îndepărtarea celulelor și a antigenelor cu prezervarea integrității matricei extracelulare (MEC), inclusiv a arhitecturii vascularizației. Un alt avantaj important al acestei tehnici constă în păstrarea integrității canalului vascular care face grefă potrivită pentru repopularea celulară (reelularizare) [14]. Astfel, matricea tridimensională naturală obținută conține markerii necesari pentru asigurarea migrării și proliferării celulare post-implantare [17, 18].

Decelularizarea poate fi realizată prin metode fizice, chimice și biologice. La alegerea protocolului adecvat, este necesar să se ia în considerare faptul că acesta poate modifica proprietățile MEC, ceea ce poate avea un impact negativ asupra stabilității *in vivo*. Pe de altă parte, cantitatea mare de ADN restant poate provoca reacții inflamatorii și, prin urmare, o funcționalitate proastă a grefei la implantare. Pentru a asigura succesul terapiei bazate pe



ingineria tisulară, este esențial să se găsească un echilibru între eliminarea completă a celulelor și păstrarea integrității MEC [7, 19, 20, 21].

Până în prezent au fost deja descrise protocoale de decelularizare pentru diferite țesuturi/organe. În pofida efortului enorm depus, nu s-a reușit deocamdată implementarea practică a protocoalelor de lucru pentru toate țesuturile. De exemplu, decelularizarea țesuturilor groase, cum ar fi peretele vascular, este încă o provocare [22, 23]. În plus, majoritatea procedurilor publicate se bazează pe prelucrarea țesuturilor cu soluții chimice sau enzimatică cu evaluarea efectului variației duratei de tratament și a etapelor de spălare intermitentă asupra eficienței DC [18]. Există puține date privind fezabilitatea și eficacitatea metodelor fizice, cum ar fi șocul osmotic, presiunea, ultrasunetul, electroporarea sau procesele de înghețare-dezghețare [18, 24].

Modul de administrare a substanțelor chimice (condiții statice, agitare sau perfuzie) are un impact major asupra caracteristicilor diferitor materiale și suprafețe. Modificarea metodei poate avea un impact semnificativ asupra eficacității eliminării celulelor, precum și asupra păstrării proprietăților funcționale ale țesutului decelularizat (integritatea MEC, rigiditatea și complianța). Înțelegerea acestor efecte este crucială pentru a evalua și măsura cu exactitate influența diferitor agenți asupra rezultatelor DC [2, 18, 25].

### **Scopul studiului**

Dezvoltarea unor tehnici noi de decelularizare a vaselor sanguine de calibru mare și mic.

### **Obiectivele cercetării**

1. Evaluarea eficienței metodelor asistate cu ultrasunet pentru decelularizarea arterei carotide porcine;
2. Testarea efectului amplitudinii acustice asupra matricei vasculare;
3. Evaluarea eficacității tratamentului chimic (SDS, SDC, Triton X-100, soluție hipotonică) și enzimatic (DNază-I) în decelularizarea țesutului vascular;
4. Evaluarea impactului diametrului vascular asupra eficienței protocolului de decelularizare;
5. Verificarea informativității metodelor calitative (H&E și DAPI) pentru confirmarea eliminării celulelor din matrice;
6. Caracterizarea morfologică, biochimică și biomecanică a vaselor sanguine decelularizate;
7. Evaluarea biocompatibilității matricei aceluare prin efectuarea testului de contact *in vitro*;
8. Determinarea eficienței metodei perfuzionale pentru eliminarea uniformă a celulelor din segmentele lungi de vase sanguine.

### **Metodologia cercetării științifice**

Prin analiza publicațiilor cercetătorilor internaționali din domeniu, a fost elaborat suportul metodologic al acestui studiu. Pentru realizarea scopului și obiectivelor propuse a fost realizat un studiu experimental preclinic. Ca material de bază pentru cercetare au fost alese arterele porcine. Au fost obținute fragmente arteriale (aorta porcină și artera carotidă porcină), care au fost împărțite în câteva grupe experimentale, inclusiv controlul negativ (eșantion netratat). Pe baza rezultatelor anterioare de succes în utilizarea soluției combinate SDS-SDC pentru decelularizarea diferitor țesuturi, aceasta a fost aleasă pentru experimentul propus. Astfel, probele au fost procesate cu detergenți cu/fără tratament enzimatic suplimentar pentru a evalua posibilitatea eliminării celulelor din țesut (prezența resturilor celulare și eventual a antigenelor face materialul susceptibil pentru a iniția sensibilizarea). A fost testată, de asemenea, eficiența unui alt detergent, și anume Triton X-100. În plus, au fost utilizate

diferite forme de expunere dinamică a soluțiilor de lucru (rotație vs ultrasunet). Grefele decelularizate au fost analizate cu ajutorul testelor histologice și imunohistochemice (Hematoxilină-Eozină, H&E, 4',6-diamidino-2-fenilindol, DAPI, anti-colagen IV) și mecanice (sudurabilitate). De asemenea, s-a efectuat evaluarea cantitativă a ADN-ului restant, a GAG-ilor, a hidroxiprolinei, testul de citotoxicitate și examenul electron microscopic.

Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul programei SPSS, versiunea 16.0. Datele sunt raportate ca medie±DS. Distribuția normală gaussiană a fost testată prin aplicarea testelor de normalitate (testul Shapiro-Wilk); iar omogenitatea varianței a fost verificată prin testul Levene. Diferențele dintre grupuri au fost detectate prin efectuarea testului t independent pentru valorile omogene distribuite normal și a testului Welch pentru valorile neomogene distribuite normal. Testul Mann-Whitney U a fost aplicat pentru datele neparametrice sau pentru datele parametrice care nu respectă distribuția normală. Diferențele au fost considerate semnificative la o valoare p mai mică de 0,05.

Comitetul de evaluare etică al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” a aprobat proiectul de cercetare (Decizia nr. 31 din 26.12.2017). Testele au fost realizate în cadrul Laboratorului de inginerie tisulară și culturi celulare, Chișinău, Republica Moldova, și Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe (LEBAO), Medizinische Hochschule Hannover (MHH), Hanovra, Germania.

#### **Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute**

Problema științifică rezolvată constă în identificarea factorilor asociați cu îndepărtarea eficientă a celulelor și stabilirea unei proceduri noi de decelularizare a vaselor sanguine cu caracterizarea optimă a structurilor obținute, fapt care va permite modificarea paradigmei experimentale prin selectarea rațională din punct de vedere științific a condițiilor experimentale.

Efectuarea studiului experimental cu compararea și caracterizarea multilaterală a eficienței DC a diferitor abordări de decelularizare în ceea ce privește eliminarea celulelor și păstrarea rezistenței matricei a contribuit la completarea unor lacune din literatura științifică actuală. Rezultatele cercetării efectuate au demonstrat că există o variabilitate importantă printre tehnicile utilizate pentru decelularizarea vaselor sanguine și pentru calitatea matricei finale. Analiza interrelațiilor dintre diametrul vaselor sanguine și succesul eliminării celulelor a demonstrat necesitatea unor abordări experimentale diferențiate în funcție de dimensiunea vasului.

#### **Importanța teoretică și principalele rezultate științifice**

1. În prezent, deciziile cercetătorilor cu privire la metoda de decelularizare pentru țesutul vascular, la selecția modelului de testare, precum și la metodele de examinare pentru caracterizarea matricei acelulare nu sunt standardizate și sunt determinate de experiența și preferințele personale;
2. Grosimea peretelui este un parametru important care influențează eficiența decelularizării. Astfel, vasele sanguine cu diametru mare față de cele cu diametru mic trebuie tratate diferit;
3. Chiar și detergenții ionici puternici, cum ar fi SDS sau SDC, nu sunt eficienți pentru producerea de țesut acelular. Eliminarea fragmentelor lipicioase de ADN din matrice necesită un tratament enzimatic suplimentar (procesare cu DNază);
4. Este demonstrată necesitatea de a efectua mai multe teste, atât calitative (colorații histologice), cât și cantitative (cuantificarea resturilor de ADN), pentru a confirma eliminarea completă a elementelor celulare din țesut. În plus, abordarea duală este obligatorie pentru evaluarea conservării proteinelor din matrice;

5. Evaluarea siguranței prin efectuarea testelor de biocompatibilitate *in vitro* este indispensabilă înainte de evaluarea *in vivo* (experimente pe animale);
6. Ultrasunetul nu îmbunătățește în mod direct eliminarea celulelor din țesut. El poate chiar afecta semnificativ integritatea matricei atunci când se aplică unde de amplitudine mare.

### **Valoarea aplicativă a cercetării**

Pe baza rezultatelor studiului a fost specificată eficiența decelularizării diferitor substanțe chimice; în plus, a fost demonstrată indispensabilitatea tratamentului enzimatic în combinație cu detergenți puternici pentru producția matricelor vasculare acelulare. Datele obținute pe parcursul cercetării argumentează științific modificarea strategiei actuale de cercetare prin utilizarea preferențială a arterei carotide față de aortă ca model de testare pentru dezvoltarea grefelor vasculare ingineresti de diametru mic, luând în considerare diferențele existente în condițiile experimentale pentru o eliminare eficientă și reușită a celulelor în funcție de grosimea peretelui. Identificarea rezultatelor favorabile asociate cu utilizarea detergenților neionici și a ciclurilor repetate de spălare pentru eliminarea eficientă a resturilor de detergenți ionici este importantă în dezvoltarea matricelor biocompatibile. Încercarea eșuată de a utiliza ultrasunetul pentru DC a țesutului vascular definește necesitatea de a efectua studii suplimentare privind mecanismul de distrugere celulară indusă de ultrasunet.

### **Implementarea rezultatelor cercetării**

Impactul practic al prezentului studiu constă în implementarea unei tehnici noi de decelularizare a vaselor sanguine în Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova. În plus, rezultatele obținute (procedurile disponibile de decelularizare a țesutului vascular, metodele de evaluare a integrității morfologice, biomecanice și biochimice a țesutului decelularizat, testul de biocompatibilitate) au fost prezentate studenților mediciști în cadrul cursurilor de la Catedra de anatomie și anatomie clinică și a cursului opțional de Medicină Regenerativă.

### **Aprobarea rezultatelor științifice**

Rezultatele obținute au fost discutate și prezentate în cadrul următoarelor forumuri științifice: MedEspera 2018: 7<sup>th</sup> International Medical Congress for Students and Young Doctors (Chișinău, 2018), Simpozionul internațional de medicină moleculară (Istanbul, Turcia, 2019), the 4<sup>th</sup> International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering (Chișinău, 2019), Zilele Anatomice Timișoara (Timișoara, România, 2019), MedEspera 2020: 8<sup>th</sup> International Medical Congress for Students and Young Doctors (ediția online, 2020), Congresul Consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu” (ediția online, 2020), Conferința Națională de Chirurgie (ediția online, România, 2021), Conferința Științifică Anuală. Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță (ediție online, 2021), the 5<sup>th</sup> International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering (ediție online, 2021), MedEspera 2022: 9<sup>th</sup> International Medical Congress for Students and Young Doctors (Chișinău, 2022), Conferința Națională de Chirurgie (Eforie Nord, România, 2023), 6<sup>th</sup> International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering (Chișinău, 2023); saloane de cercetare, inovare și invenție (medalia de aur): 15<sup>th</sup> European Exhibition Of Creativity And Innovation (Iași, România, 2023), International Exhibition of Innovation and Technology Transfer EXCELLENT IDEA – 2023, ediția a doua (Chișinău, 2023), două trofee: Innovation Award for promoting Science, Education and technology at EuroInvent 2023, Iași, România și Special Award for the Invention from Titu Maiorescu University of Bucharest (2023), și lecții publice: „Ingineria

tisulară și medicina regenerativă: provocări și realizări” (Ziua Internațională a Sănătății, 09 noiembrie 2019, Chișinău), „Grefele vasculare decelularizate prin inginerie tisulară vor fi un standard de tratament în viitor?” (Expoziția MoldMedizin & MoldDent, 11-13 septembrie 2019, Chișinău).

#### **Publicații pe tema cercetării**

La tema de cercetare au fost publicate 20 de lucrări științifice, inclusiv: articole în culegeri indexate în SCOPUS – 3, articole în reviste de specialitate din străinătate – 1, articole în reviste din Registrul național al revistelor de specialitate – 5, materiale/teze la conferințe internaționale – 4, materiale/teze la conferințe internaționale organizate în Republica Moldova – 3, materiale/teze la conferințe (conferințe naționale) – 4. Numărul de publicații fără coautori – 2. În perioada de cercetare au fost obținute 1 certificat de inovator, 1 act de implementare, 2 medalii de aur, 2 trofee speciale la Saloanele de Inventică și 4 locuri premiate la conferințe internaționale.

#### **Structura tezei.**

Teza include adnotări în limbile română, rusă și engleză, lista abrevierilor, introducere (reflectă actualitatea și importanța științifico-practică a problemei abordate în teză, scopul, obiectivele, noutatea științifică, importanța teoretică și valoarea aplicativă a cercetării, aprobarea rezultatelor studiului), 4 capitole (Revista literaturii, Materiale și metode de cercetare, Rezultate și Discuții) cu concluzii generale, recomandări practice și limitări ale studiului. Lucrarea este urmată de lista de referințe bibliografice cu 287 de surse, declarația autorului și CV-ul autorului.

**Cuvinte-cheie:** boli cardiovasculare, boala arterială periferică, chirurgie bypass, grefă vasculară, inginerie tisulară, grefă vasculară obținută prin inginerie tisulară, decelularizare, detergent, tratament enzimatic, ultrasunet.

## CONȚINUTUL TEZEI

1. Capitolul **INGINERIA TISULARĂ ESTE VIITORUL ÎN DEZVOLTAREA GREFELOR VASCULARE** reprezintă o scurtă trecere în revistă a diferitor metode ingineresti care au fost raportate în literatura de specialitate până în prezent și utilizate pentru obținerea grefelor vasculare. A fost identificată metoda actuală de ultimă generație, anume decelularizarea, utilizată pentru a crea substituenți vasculari.

Bolile cardiovasculare rămân una dintre cele mai răspândite probleme de sănătate la nivel mondial; în plus, numărul pacienților diagnosticați este în creștere; patologiiile cu afectarea vaselor sanguine de diametru mic și mediu sunt cauza principală de deces [1]. În 2008, 17,3 milioane de oameni au decedat din cauza afecțiunilor cardiovasculare; dintre care, 7,3 milioane de decese s-au datorat bolilor coronariene [4, 9]. Cele mai recente statistici în domeniu prevăd că, din cauza îmbătrânirii populației, incidența anuală a mortalității cauzate de aceste patologii va crește de la 16,7 milioane în 2002 la 23,3 milioane în 2030 [2].

Tratamentele convenționale pentru bolile cardiovasculare implică, de obicei, modificări ale dietei și ale stilului de viață, terapia medicamentoasă și opțiunile invazive chirurgicale [11, 25, 26-27]. „Standardul de aur” pentru înlocuirea/repararea vaselor sanguine ocluzionate la pacienții cu simptome persistente este bypass-ul vascular [7, 8]. În prezent, în activitatea clinică sunt disponibile următoarele tipuri de grefe: autogrefe, alogrefe, xenogrefe și proteze artificiale [9]. Vasele autologe, cum ar fi artera mamară internă, vena safenă mare sau artera radială, sunt cea mai bună alegere în cazul reconstrucțiilor vasculare de calibru mic, unde grefele sintetice au rate inacceptabile de eșec [28]. Cu toate acestea, procedurile chirurgicale în antecedente, leziunile aterosclerotice difuze, flebita anterioară, dilatarea varicoasă, hipoplazia sau particularitățile anatomice structurale limitează disponibilitatea acestora [7, 10, 11, 12].

Luând în considerare un număr enorm de pacienți diagnosticați cu boală cardiovasculară și lipsa grefelor vasculare adecvate, ingineria tisulară a devenit o abordare alternativă pentru crearea de noi „conducte” funcționale, care pot promova adeziunea, proliferarea și diferențierea celulelor vasculare și pot răspunde la compușii vasoactivi endogeni [27-29]. Pentru a depăși problema actuală legată de lipsa materialului adecvat pentru bypass-ul vascular, cercetătorii au lucrat la dezvoltarea unui biomaterial nou care poate optimiza interacțiunea țesut-biomaterial și mima proprietățile mecanice ale țesutului nativ, promova aderarea celulelor, creșterea și diferențierea acestora, facilita producția proteinelor din MEC și inhiba trombogenitatea. Materialul inovator ar putea revoluționa practica cotidiană în domeniu și ar putea reduce riscul de eșec al grefelor vasculare [28, 29].

Dcelularizarea țesuturilor vasculare pentru dezvoltarea grefelor vasculare se bucură de o atenție semnificativă în ultimii 20 de ani [30]. Decelularizarea este un proces complex care necesită o analiză atentă a condițiilor de lucru pentru a crea o matrice vasculară neimunogenă, cu prezervarea proteinelor MEC, capabilă să inducă regenerarea vasculară post-implantare [27, 31]. Pentru a asigura rezultatul cu succes al terapiilor bazate pe ingineria tisulară, este esențial să se găsească echilibrul dintre îndepărtarea completă a celulelor și păstrarea integrității MEC [7, 19, 20, 21].

DC poate fi realizată cu utilizarea diferitor agenți (chimici, biologici, fizici), toate permițând inducerea rupturii membranelor celulare și producerea materialului non-imunogen comparabil structural și funcțional cu țesutul nativ [21, 24, 27, 28]. Nu există o metodă universală pentru DC, deoarece fiecare tip de țesut trebuie luat în considerare individual, pentru a asigura rezultate optime. În funcție de tipul de țesut-țintă și de aplicația prevăzută, protocoalele trebuie stabilite cu atenție pentru siguranță și eficacitate [22].

## 2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Acest capitol descrie toate materialele și metodele care au fost utilizate în faza experimentală, inclusiv metodele folosite pentru caracterizarea morfologică, biochimică și biomecanică a vaselor sanguine netratate și decelularizate. Toate testele au fost efectuate în cadrul Laboratorului de inginerie tisulară și culturi celulare, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova, Chișinău, și Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe (LEBAO), Medizinische Hochschule Hannover (MHH), Hannover, Germania sub evaluarea și monitorizarea experților locali.

Vasele porcine au fost colectate de la porci Landrace (3-4 luni) într-un abator local sau unitatea de animale a Medizinische Hochschule Hannover (MHH); arterele porcine au fost alese din cauza asemănărilor structurale cu țesuturile umane și a bunei disponibilități a acestora. Îngrijirea animalelor a respectat Ghidul pentru îngrijirea și utilizarea animalelor de laborator. Vasele au fost recoltate în maxim 2 ore după sacrificarea animalelor și transportate imediat la laborator în soluție PBS la 4°C. Pentru a evita prejudiciile posibile, determinate de variabilitatea individuală, au fost utilizate numai specimene (trei replici biologice) suficient de lungi pentru a fi selectate grupurile martori și grupurile experimentale. Vasele au fost curățate de grăsime și țesutul adiacent, folosind pense și foarfece, și spălate cu grijă pentru a îndepărta cheagurile de sânge restante.

Vasele prelevate au fost stocate la -80°C; pentru conservarea adecvată a proprietăților structurale și mecanice aorta a fost depozitată în DMSO. Arterele carotide proaspăt recoltate au fost folosite ca martor nativ pentru analiza electron microscopică, arterele înghețate-dezghetate au fost folosite ca martori pentru toate celelalte experimente.

### **Decelularizarea chimică vs combinată a aortei porcine**

O metodă de decelularizare cu detergenți bazată pe utilizarea a doi detergenți ionici, ca SDS și SDC, și a unui non-ionic, Triton X-100, și abordarea combinată bazată pe tratarea suplimentară a probelor cu DNază-I au fost adaptate pentru a decelulariza vasele porcine, anume a aortei porcine.

### **Decelularizarea chimică a vaselor sanguine de origine porcină**

Decelularizarea a început cu efectuarea unei etape inițiale de îngheț-dezghet (așa cum s-a menționat mai sus). Vasele au fost spălate cu apă deionizată timp de 24 de ore la temperatura camerei sub rotație continuă pentru a induce liza celulară prin șoc osmotic. Apoi, probele au fost tratate cu soluție de decelularizare ce conține 0,5% SDS și 0,5% SDC (w/v) în tampon hipotonic (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaCl și 10 mM EDTA) timp de 24 de ore. La sfârșitul procesului, vasele au fost spălate cu PBS timp de 24 de ore pentru a îndepărta resturile de celule și detergentul rezidual și tratate suplimentar cu 1% Triton X-100 (v/v) în tampon hipotonic timp de 24 de ore. În cele din urmă, vasele au fost spălate cu PBS timp de 48 de ore.

### **Abordarea combinată în decelularizarea vaselor sanguine porcine (detergent-enzimatică)**

La sfârșitul procesului de decelularizare, segmente de vas au fost incubate suplimentar cu soluție de DNază de 300 U/mL în 1 mM MgCl<sub>2</sub> în PBS la 37°C timp de 48 de ore. Segmentele de vas tratate au fost spălate de 3 ori cu PBS.

Fiecare etapă de decelularizare a fost efectuată sub rotație, folosind role rotative (TRM50) cu 35 de rotații pe minut.

### **Evaluarea eficienței protocolului de decelularizare în funcție de diametrul vasului**

Abordarea combinată de decelularizare detergent-enzimatică a fost adaptată pentru a

decelulariza vasele porcine. Durata de expunere a țesutului la acțiunea detergenților ionici a fost diferită: 6 ore, 12 ore, 18 ore și 24 de ore. După fiecare timp de decelularizare, respectiv, vasele au fost spălate cu soluție PBS și spălate suplimentar cu 1% Triton X-100 (v/v). În cele din urmă, segmentele au fost incubate timp de 48 de ore în soluție de DNază I (300 U/ml).

La finele procesului fragmente de țesut din fiecare lot au fost fixate în 4% paraformaldehidă pentru stabilizare sau congelate direct în tek O.C.T., pentru un ulterior examen histologic. Segmentele de vas rămase au fost depozitate la 4°C în PBS.

### **Decelularizarea arterelor carotide porcine proaspete vs congelate**

Înghețarea-dezghețarea țesutului poate influența calitatea procesului de decelularizare. Studiul examinează eficiența protocolului combinat descris în DC arterelor carotide porcine proaspete, datele rezultate fiind comparate cu datele omoloage obținute la prelucrarea probelor congelate prin efectuarea colorației H&E și DAPI.

### **Evaluarea aplicabilității ultrasunetului în decelularizarea vaselor sanguine**

DC a țesutului vascular a fost efectuată prin combinarea metodei fizice (ultrasunet) cu cele chimice (șoc osmotic și detergent). Pentru procesarea probelor a fost utilizată sonda UP200S (Hielscher, Germania) și sonotrod-ul S1 adaptat pentru probele de la 0,1 la 5 ml. Având în vedere că bulele de colaps pot produce creșterea semnificativă a temperaturii lichidului prin eliberarea de energie [13], experimentele au fost efectuate într-o cameră rece (+4°C). În plus, probele au fost plasate într-o baie de gheață pentru a preveni supraîncălzirea țesutului.

*Protocol 1:* Pentru decelularizare, vasele (segmente de 0,5-1 cm, diametrul intern 4 mm) au fost spălate cu PBS și scufundate în tuburi Eppendorf de 2,0 mL care conțin 1,5 ml tampon hipoton (0,3% NaCl în apă distilată). Probele au fost expuse la ultrasunet cu o frecvență de 24 kHz, 200 W, mod de lucru „1” (iradiere acustică permanentă). Au fost aplicate două valori diferite de amplitudine și doi timpi diferiți de expunere: 20% vs 100% și, respectiv, 3 ore vs 12 ore.

*Protocol 2:* Probele din acest grup au fost plasate în tuburi Eppendorf de 2,0 mL care conțin 1,5 mL 1% Triton X-100 și au fost expuse la ultrasunet cu o frecvență de 24 kHz, 200 W, amplitudine 20%, mod de lucru „1” pentru 48 de ore. Distanța probei până la vârful sondei a fost de 1 cm.

Probele martor au fost tratate cu aceeași soluție sub rotație continuă (viteză de 50 rpm, Biometra WT 17).

După decelularizare, fragmentele de vas din fiecare grup au fost fixate în 4% paraformaldehidă pentru stabilizare sau congelate direct în tek O.C.T., pentru efectuarea examenului histologic. Segmentele de vas rămase au fost depozitate la 4°C în PBS.

### **Caracterizarea matricelor porcine decelularizate**

Matricele decelularizate au fost caracterizate prin mai multe metode, și anume:

- ✓ Evaluarea calitativă a ADN-ului sau componentelor citoplasmatică și nucleare rămase prin colorațiile H&E și DAPI;
- ✓ Testarea morfometrică a țesutului decelularizat prin aprecierea grosimii peretelui vascular;
- ✓ Evaluarea calitativă a suprafeței luminale rămase prin analiza electron microscopică și metoda imunohistochimică pentru colagen IV prin;
- ✓ Analiza cantitativă a ADN-ului restant prin teste spectrofotometrice;
- ✓ Analiza cantitativă a hidroxiprolinei și GAG restante prin teste spectrofotometrice;
- ✓ Evaluarea integrității mecanice a matricei rămase prin testul de suturabilitate;
- ✓ Testarea biocompatibilității prin cuantificarea îndepărtării SDS și testul de contact de viabilitate a celulelor;

- ✓ Evaluarea eficienței decelularizării perfuzionale pentru segmentele vasculare lungi.

### 3. CARACTERIZAREA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A ȚESUTULUI VASCULAR DECELULARIZAT

#### Decelularizarea cu detergenți vs combinată a aortei porcine

Experimentul a evidențiat eficiența cocktailurilor chimice în combinație cu o soluție enzimatică pentru obținerea matricelor vasculare decelularizate (figura 1). Colorațiilor H&E și DAPI au demonstrat în mod evident prezența nucleelor celulare în peretele aortic (grupul de control). Colorarea H&E a probelor decelularizate nu a evidențiat nicio celulă intactă persistentă în toate grupurile, inclusiv în cazul probelor tratate exclusiv cu detergenți, și conservarea brută a MEC. Cu toate acestea, colorarea DAPI a acelorași specimene a descoperit cantități substanțiale de ADN rezidual. Doar tratamentul cu nuclează de 48 de ore a condus la decelularizarea completă, toate straturile fiind lipsite de resturi celulare (figura 1). Rezultatele examenului histologic sugerează că colorația H&E nu poate fi utilizată ca o unică dovadă calitativă a DC și ar trebui să fie completată, cel puțin, cu o colorare AND-specifică, precum DAPI [32].

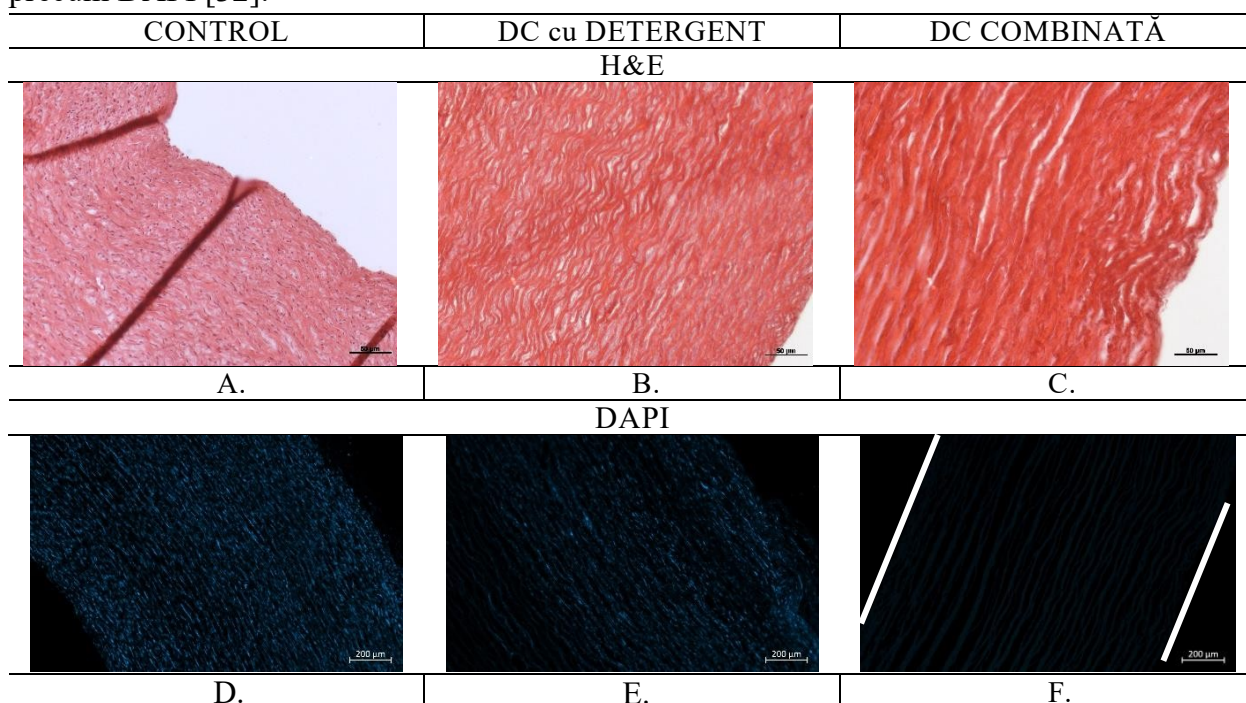


Figura 1. Decelularizarea combinată garantează o spălare eficientă a celulelor din țesutul

**vascular.** Colorația H&E (A, B, C) și colorația DAPI (D, E, F), grup martor (A, D) și grup experimental (B, C, E, F). **H&E:** Citoplasma are aspect roz, nucleul este albastru-violet, matricea extracelulară se prezintă sub diferite nuanțe de roz. **DAPI:** Nucleele sunt albastre,

liniile albe reprezintă marginile exterioare ale matricei.

Scale bar. A, B: 100 μm; C 50 μm; D, E, F: 200 μm

#### Evaluarea eficienței protocolului de decelularizare în funcție de diametrul vasului

Aorta porcină și arterele carotide au fost tratate cu detergenți și DNază I sub rotație. Chiar dacă colorarea H&E nu a evidențiat celule persistente în toate grupurile, DAPI a fost mai specific pentru identificarea ADN-ului rezidual. Astfel, DC completă, definită drept eliminarea elementelor celulare și ADN-ului, a arterei carotide a necesitat o expunere de 12 ore la detergenți, în timp ce aorta a necesitat un tratament de 24 de ore (figura 2).

Această descoperire sugerează că vasele sanguine cu diametru mare necesită o



prelucrare mai extinsă comparativ cu vasele sanguine cu diametru mic. În acest fel, nu poate fi recomandat niciun protocol comun de decelularizare pentru ambele tipuri de vase sanguine [33].

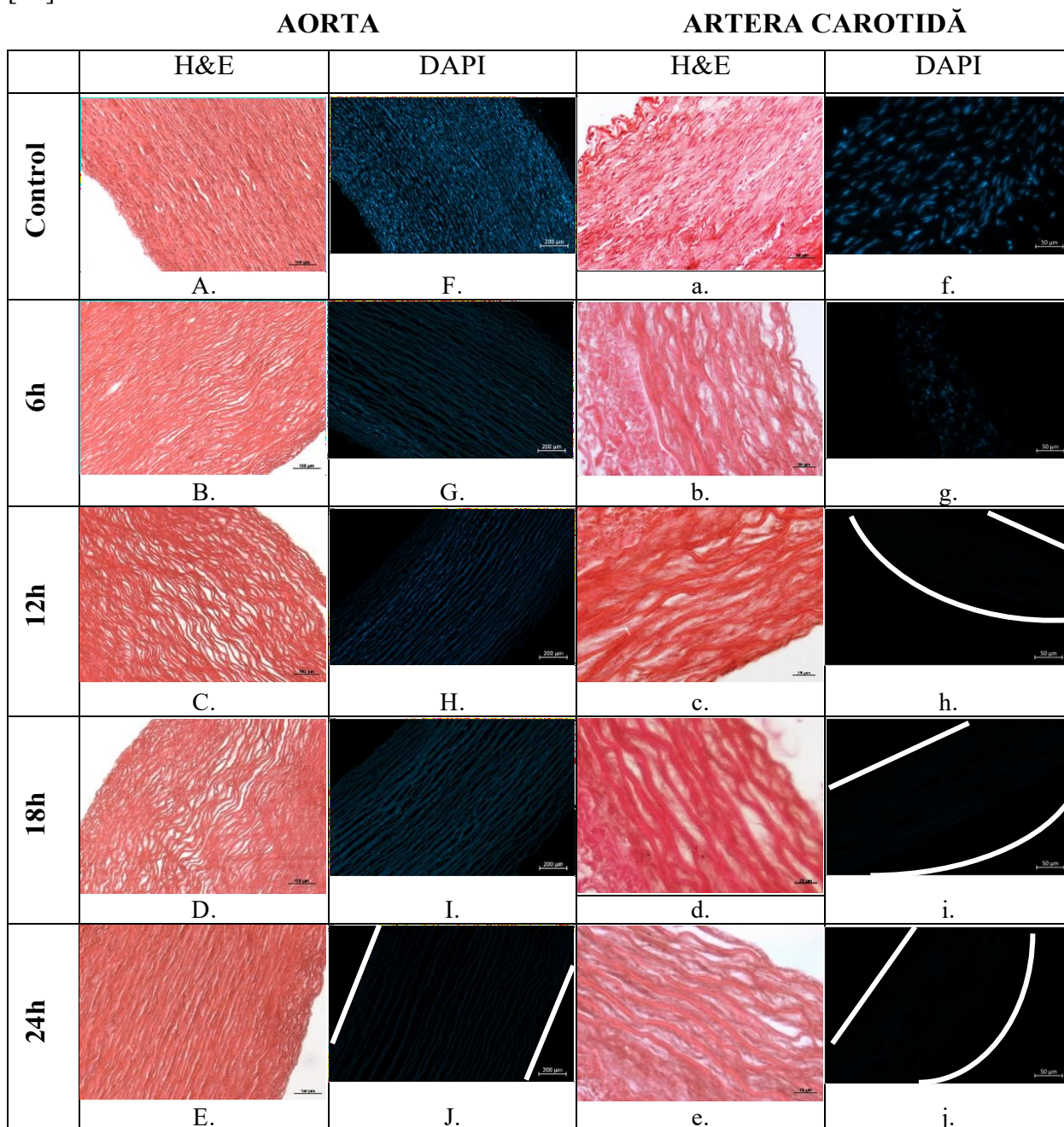


Figura 2. Diferențele în eficiența decelularizării vaselor porcine în funcție de diametrul lor. Colorația H&E (A, B, C, D, E, a, b, c, d, e) și colorația DAPI (F, G, H, I, J, f, g, h, i, j); lotul martor (A, F, a, f) și lotul experimental (B-E, G-J, b-e, g-j).

#### Decelularizarea arterelor carotide porcine proaspete vs congelate

Secțiunile transversale ale vasului din fiecare grup experimental au fost examinate prin colorațiile H&E și DAPI. Aceste metode calitative au oferit o reprezentare vizuală a integrității matricei obținute și a absenței oricărui materiale celulare rămase.

#### Evaluarea aplicabilității ultrasunetului în decelularizarea vaselor sanguine

Aplicarea ultrasunetului în decelularizarea vaselor sanguine nu pare a fi o strategie eficientă. Ambele colorații H&E și DAPI au dezvăluit prezența unor cantități uriașe de celule intacte. În plus, structura țesutului a fost afectată semnificativ atunci când au fost utilizate

unde de amplitudine mare (100%) [34] (figura 3).

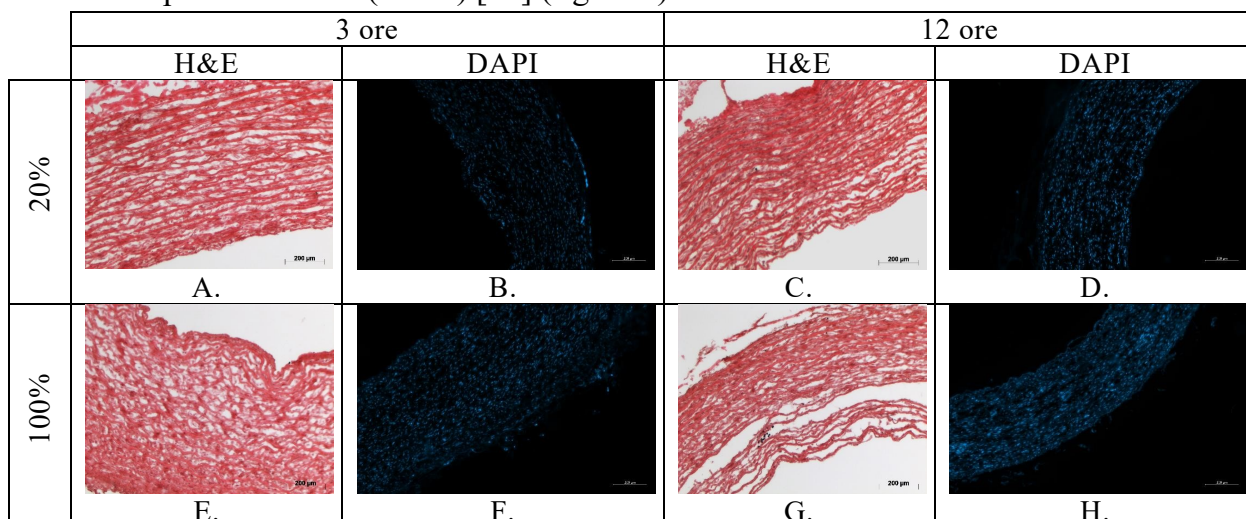


Figura 3. Utilizarea ultrasunetului în decelularizarea vaselor sanguine (colorațiile H&E și DAPI). Scală. A, B, C, D: 200 μm

Undele ultrasonore utilizate în combinație cu un detergent non-ionic au oferit același rezultat – lipsa reducerii ADN-ului și eliminării elementelor celulare. Prezența elementelor celulare intacte a sugerat că reactivii nu au fost capabili să solubilizeze/distrugă membranele și să inducă îndepărtarea celulelor (figura 4).

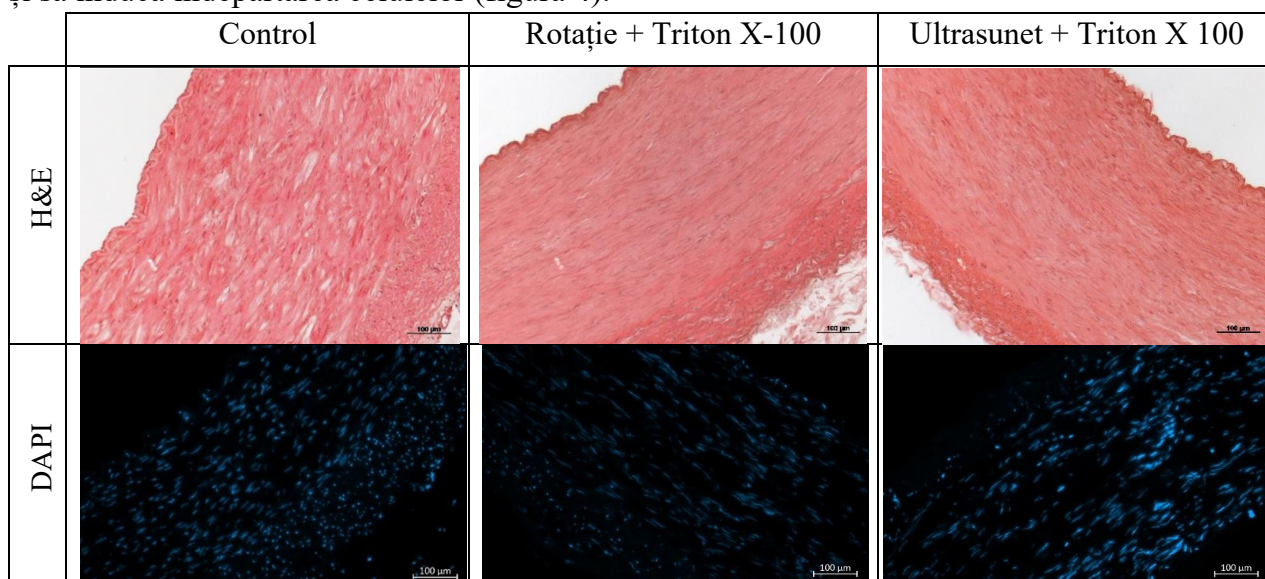


Figura 4. Utilizarea ultrasunetului în decelularizarea vaselor sanguine (colorațiile H&E și DAPI). Scală: 100 μm

### Caracterizarea matricelor porcine decelularizate

Arterele carotide porcine decelularizate au fost caracterizate prin diferite metode pentru studierea componentelor rămase după DC în matricea și calitatea acestora, pentru a evalua integritatea mecanică a suportului obținut și capacitatea de repopulare cu celule endoteliale. Fiecare test are propriile sale limitări și se concentrează pe diferite aspecte ale structurii sau compoziției vasului. Prin urmare, aplicarea unei varietăți de tehnici de evaluare are ca rezultat o mai bună descriere a matricei rezultate și înțelegerea amplă a procesului de decelularizare.

#### Metode calitative și cantitative

Metodele calitative precum colorarea H&E, DAPI și imunohistochimică oferă o reprezentare vizuală a integrității matricei rămase și a prezenței oricăror materiale celulare restante. Conținutul de ADN, GAG și collagen a fost cuantificat pentru a testa materialul



celular rămas și gradul de prezervare a componentelor matricei. Testul de retenție a suturii a fost efectuat pentru a avea o impresie despre rezistența mecanică a vasului rămas. Scanarea electron microscopică a suprafeței luminale a vaselor decelularizate a fost făcută pentru a avea o impresie despre orice deteriorare a laminei bazale. Biocompatibilitatea a fost testată prin popularea suprafeței luminale a matricelor decelularizate cu celule endoteliale GFP-marcate.

### Evaluarea histologică

Au fost efectuate și analizate trei replici biologice prin colorațiile H&E și DAPI (figura 5) pentru vizualizarea eficienței decelularizării. Inspecția histologică a confirmat îndepărtarea celulelor fără a afecta negativ structura MEC. Conform evaluării pe secțiunile H&E, diferența semnificativă statistică în grosimea peretelui arterial înainte ( $555,94 \pm 59,22 \mu\text{m}$ ) și după decelularizare ( $427,06 \pm 37,47 \mu\text{m}$ ) a fost detectată ( $p=0,0001$ ).

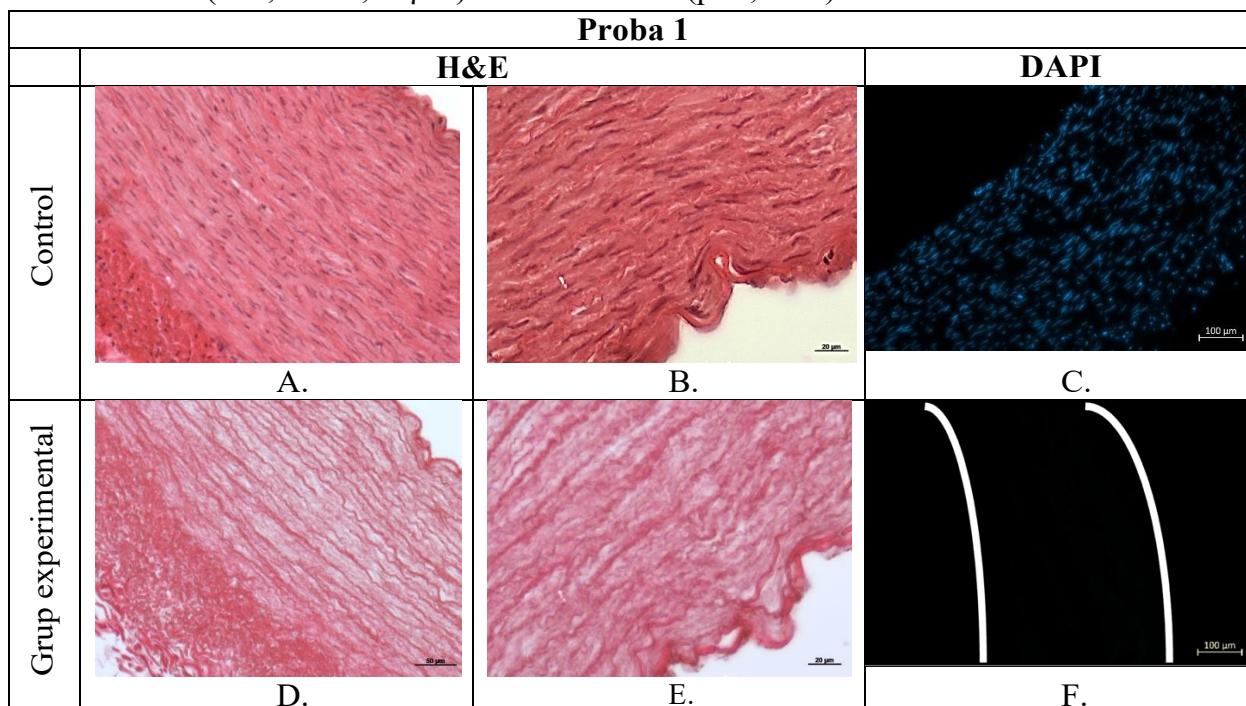


Figura 5. Decelularizarea eficientă a arterei carotide vizualizată prin colorațiile H&E și DAPI (PROBA 1). Lot martor (A, B, C). Grup experimental (D, E, F).

Scală. A, D: 50  $\mu\text{m}$ ; B, E: 20  $\mu\text{m}$ ; C, F: 100  $\mu\text{m}$

### Evaluarea membranei bazale prin imunohistochimie

Abordarea imunohistochimică a fost relevantă pentru analiza prezenței componentelor structurale comune ale matricei extracelulare. Elementul major al membranei bazale este colagenul de tip IV; pentru testarea prezervării acestuia au fost folosiți anticorpi monoclonali, ceea ce a permis efectuarea caracterizării calitative a arhitecturii membranei rămase și determinarea integrității acesteia. Colorația imunohistochimică împotriva colagenului IV a evidențiat un strat de colagen IV colorat în maro-galben de-a lungul suprafeței luminale și în interiorul peretelui vasului atât al arterelor de control, cât și al celor tratate (figura 6).

Această examinare a MEC a demonstrat că protocolul de decelularizare combinat nu a indus schimbări semnificative în morfologia peretelui vascular; cu toate acestea, teste cantitative suplimentare sunt obligatorii pentru o mai bună înțelegere a transformărilor matricei induse de agenții de decelularizare.

### Analiza prin scanarea electron microscopică a relevat o lamină bazală conservată

Analiza prin scanarea electron microscopică (SEM) a permis efectuarea unei examinări mai cuprinzătoare a structurii și morfologiei suprafeței luminale. De fapt, testul

SEM a fost folosit pentru a vizualiza impactul agenților de decelularizare asupra suprafeței luminate a țesutului tratat și pentru a evalua eficiența eliminării resturilor celulare.

Grupul control reprezintă o suprafață dens acoperită cu celule endoteliale alungite aliniată în direcția fluxului sanguin. Suprafața luminală a arterelor carotide porcine decelularizate a apărut aplatizată și lipsită de structuri asemănătoare celulelor. Lamina bazală a probelor tratate a apărut intactă, fibrele de colagen expuse fiind vizibile accidental în unele zone (figura 7) [35].

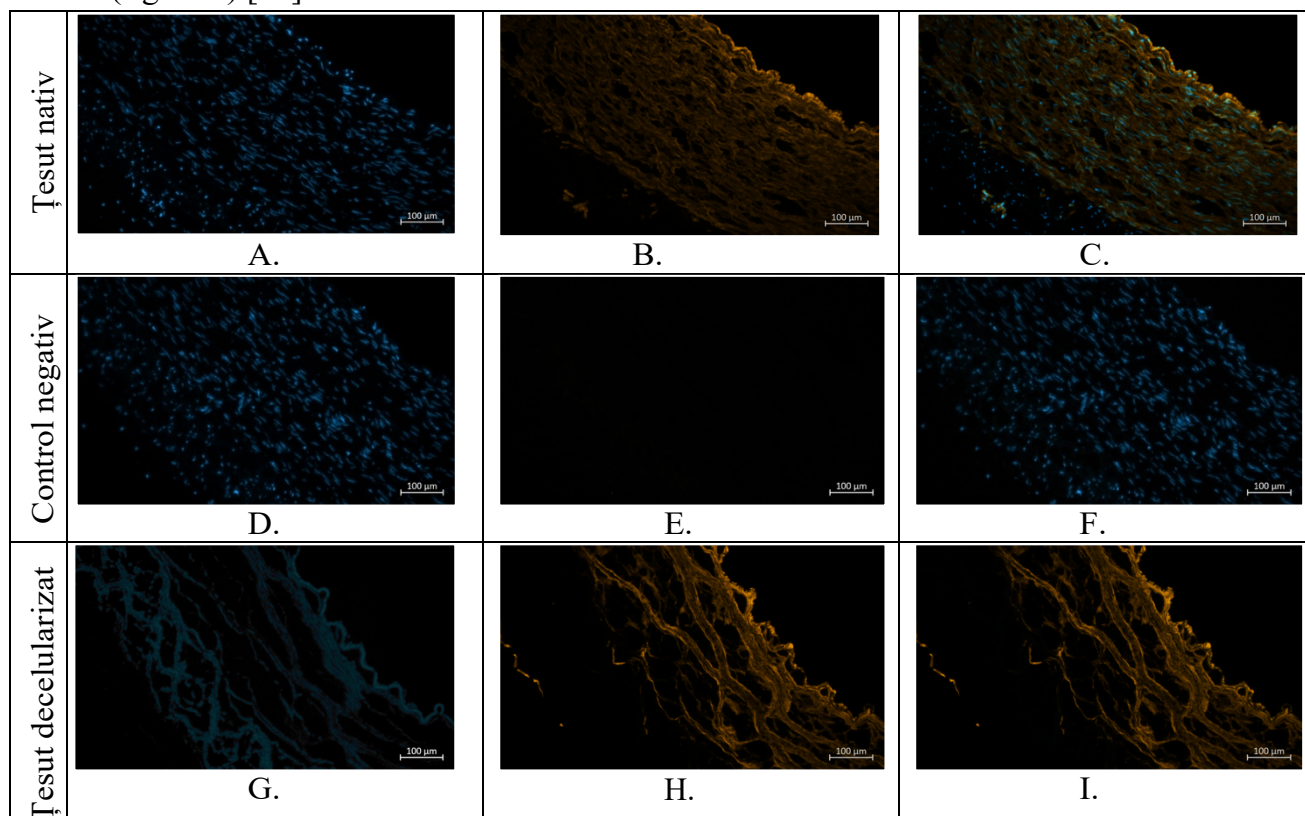


Figura 6. Evaluarea membranei bazale prin imunohistochimie pentru determinarea prezervării colagenului tip IV. Țesut nativ (A, B, C). Control negative (D, E, F). Țesut decelularizat (G, H, I). Scală: 100  $\mu$ m

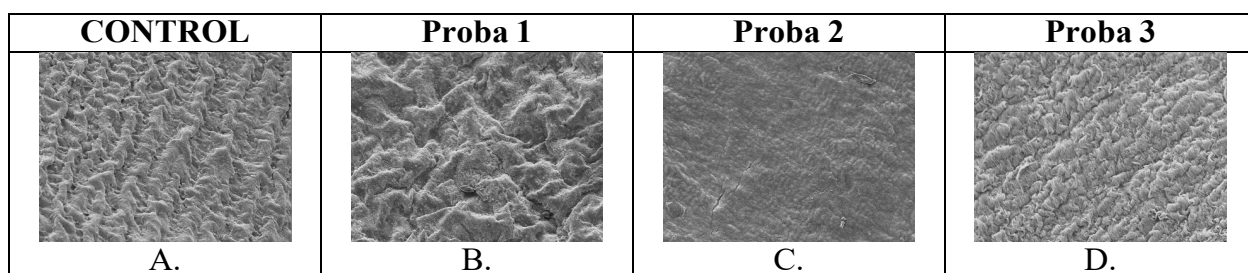


Figura 7. Analiza prin scanarea electron microscopică a suprafeței luminate a vasului decelularizat. Artera carotidă porcină proaspătă (A). Lot experimental: PROBA 1 (B). PROBA 2 (C). PROBA 3 (D). Suprafața luminală apare aplatizată și lipsită de structuri asemănătoare celulelor după decelularizare (B-D). Scală: 50  $\mu$ m

### Decelularizarea prin perfuziei

A fost evaluată metoda perfuzională pentru decelularizarea fragmentelor vasculare lungi (segment vascular cu lungime de 6 cm). Pentru a analiza dacă vasele au fost decelularizate uniform și omogen, au fost studiate prin teste histologice trei segmente prelevate din vasul

prelucrat. În plus, a fost efectuată analiza prin scanarea electron microscopică a suprafeței luminale a matricei decelularizate (figura 8).

S-a observat o eliminare consistentă și uniformă a nucleelor intacte pe lungimea vasului în probele decelularizate comparativ cu vasele native. La analiza SEM, suprafața luminală a apărut fără resturi celulare după decelularizare.

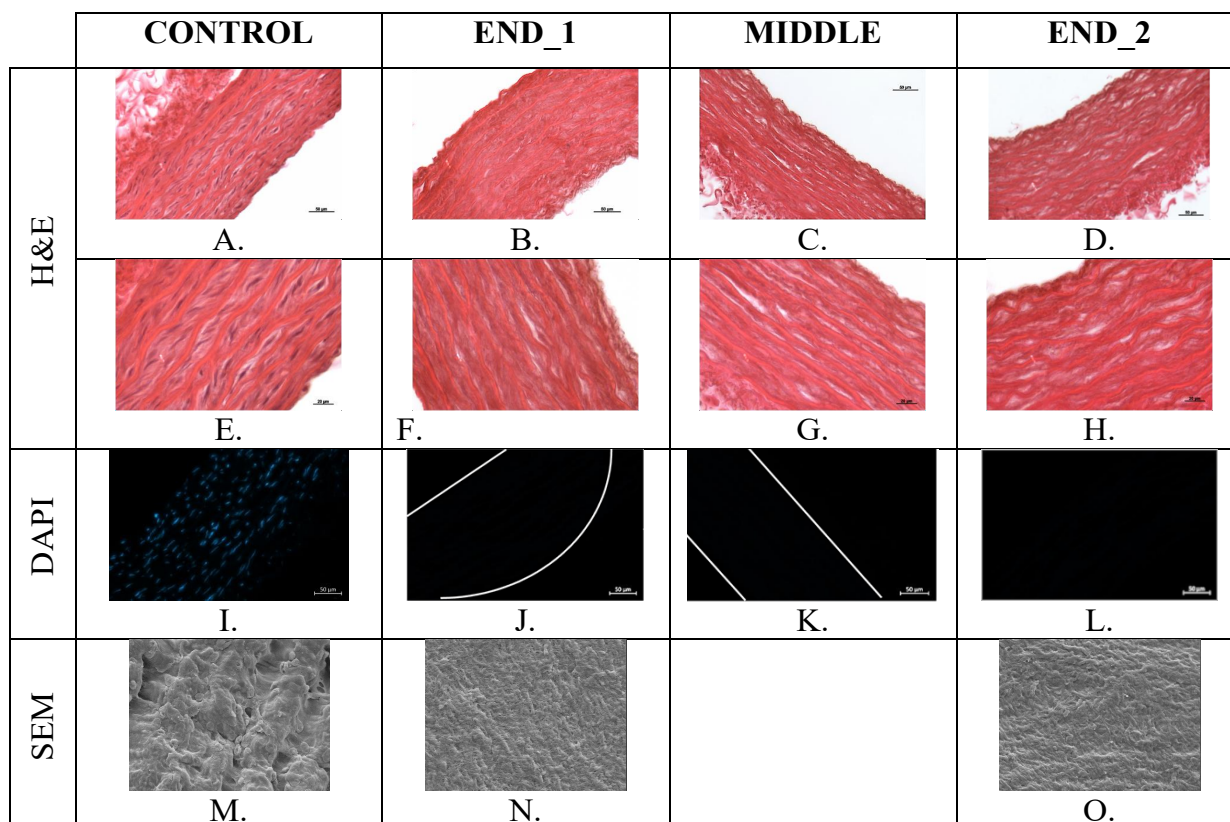


Figura 8. Decelularizarea perfuzională. Colorațiile H&E (A-H), DAPI (I-L). SEM (M-O).

Martor (A, B, I, M). END\_1 (B, F, J, N). Middle (C, G, K). END\_2 (D, H, L, O).

### Metode cantitative

Cuantificarea ADN-ului a confirmat rezultatele colorației DAPI și a arătat că la utilizarea protocolului combinat este posibil de a reduce cantitatea de ADN în vasele decelularizate. Cuantificarea a demonstrat că vasele netratate au conținut în medie  $23,56 \pm 4,73 \mu\text{g}/\text{mg}$  de ADN. Decelularizarea a permis de a reduce conținutul la  $1,03 \pm 0,49 \mu\text{g}/\text{mg}$  (tabelul 1). Post-procedural conținutul de ADN a fost redus cu 95,6% vs țesutul nativ, demonstrând eficiența protocolului intern în ceea ce privește îndepărtarea materialului celular. Testul Welch a arătat diferența statistic semnificativă dintre grupul experimental vs control ( $p=0,0001$ ) [36].

Cuantificarea GAG a relevat o scădere a conținutului de GAG în grupul experimental vs control. Cuantificarea GAG a arătat că vasele native au conținut în medie  $13,01 \pm 3,56 \mu\text{g}/\text{mg}$  de GAG. Decelularizarea a scăzut conținutul de GAG la  $1,30 \pm 0,72 \mu\text{g}/\text{mg}$  (tabelul 1), ceea ce a constituit o reducere statistic semnificativă de 90% comparativ cu grupul control ( $p=0,00001$ ) [36].

În schimb, în grupurile decelularizate, comparativ cu probele martor, au fost observate niveluri mai mari de hidroxiprolină. Cuantificarea hidroxiprolinei a arătat că vasele native au conținut în medie  $54,26 \pm 10,68 \mu\text{g}/\text{mg}$ . Vasele decelularizate au avut în medie un conținut de hidroxiprolină de  $69,70 \pm 7,60 \mu\text{g}/\text{mg}$  (tabelul 1), ceea ce înseamnă o creștere de 28,5% statistic



ne semnificativă a conținutului de hidroxiprolină comparativ cu probele control ( $p=0,0744$ ) [36].

### Testarea mecanică

Rezistența mecanică a fost determinată prin efectuarea testului de suturabilitate. Au fost testate nouă fragmente din grupul control și 8 probe (replicate tehnice) din grupul decelularizat. Rezistența grupului martor ( $n=9$ ) a fost de  $1,08 \pm 0,39$  N. Rezistența vaselor decelularizate ( $n=8$ ) a fost de  $1,14 \pm 0,38$  N (tabelul 1). Deci, nu a existat o diferență semnificativă statistic între probele control și cele decelularizate ( $p=0,0731$ ). Aceste rezultate au sugerat că greșa obținută are suficientă stabilitate mecanică pentru a rezista forțelor anastomotice [37].

Tabelul 1. Metoda cantitativă în caracterizarea țesutului vascular decelularizat

|         | ADN   |          | GAG         |          | Hyp         |          | Suturabilitate |          |
|---------|---|----------|-------------|----------|-------------|----------|----------------|----------|
|         | concentrație ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ țesut uscat) |          |             |          |             |          | Max forță (N)  |          |
|         | Țesut nativ   | Țesut DC | Țesut nativ | Țesut DC | Țesut nativ | Țesut DC | Țesut nativ    | Țesut DC |
| PROBA 1 | 25.93   | 1.05     | 14.48       | 2.69     | 45.13       | 65.75    | 0.7            | 1.44     |
|         | 24.58   | 0.84     | 13.35       | 1.56     | 51.62       | 70.24    | 1.27           | 1.32     |
|         | 24.81   | 0.84     | 13.01       | 0.44     | 53.37       | 71.60    | 0.94           |          |
|         | 31.15   | 2.30     | 14.83       | 8.21     | 45.87       | 52.09    |                |          |
|         | 30.54   | 1.40     | 14.64       | 0.26     |             | 60.67    |                |          |
|         | 30.42   | 1.70     | 14.39       |          |             | 61.62    |                |          |
| PROBA 2 | 26.94   | 0.80     | 12.47       | 0.87     | 63.29       | 65.27    | 0.79           | 0.92     |
|         | 24.41   | 1.52     | 10.41       | 1.39     | 71.89       | 69.76    | 0.93           | 0.62     |
|         | 24.87   | 1.08     | 10.55       | 1.23     | 72.68       | 71.40    | 0.66           | 0.80     |
|         | 25.71   | 0.53     | 13.01       | 1.53     | 58.39       | 76.09    |                |          |
|         | 23.33   | 1.02     | 13.36       |          | 65.17       | 82.94    |                |          |
|         | 23.22   | 1.11     | 13.72       | 67.49    | 80.36       |          |                |          |
| PROBA 3 | 17.37   | 0.60     | 10.22       | 1.78     | 41.81       | 70.35    | 1.74           | 1.16     |
|         | 15.75   | 1.01     | 10.48       | 1.03     | 46.67       | 69.14    | 1.61           | 1.82     |
|         | 16.50   | 0.98     | 10.50       | 0.62     | 48.05       | 77.20    | 1.04           | 1.05     |
|         | 20.28   | 0.38     | 11.99       | 2.19     | 41.20       | 65.81    |                |          |
|         | 19.39   | 0.42     | 5.19        |          | 46.65       | 106.93   |                |          |
|         | 18.86   | 3.50     | 10.40       | 48.97    | 74.63       |          |                |          |

### Evaluarea metodei de spălare pentru a elimina SDS rezidual

Îndepărtarea detergenților, în special a detergenților anionici ca SDS, din matrice este cunoscută a fi o problemă critică în metoda de decelularizare, deoarece detergentul restant poate provoca un răspuns nedorit al gazdei *in vivo* față de materialul implantat. Rezultatele examenului (tabelul 2) au arătat că metoda de decelularizare combinată cu repetate cicluri de spălare a permis eliminarea eficientă de SDS.

Tabelul 2. Cuantificarea SDS

| Tipul de țesut | SDS/țesut [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ ] |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |      |
|----------------|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
|                | CONTROL                               | 0.261 | 0.059 | 0.172 | 0.219 | 0.109 | 0.022 | 0.155 | 0.146 | 0.539 | 0.454 | 0.63 |
| Țesut DC       | 0.017                                 | 0.021 | 0.008 | 0.070 | 0.149 | 0.106 | 0.113 | 0.099 | 0.363 | 0.076 | 0.205 | 0.20 |

### Test de biocompatibilitate: citocompatibilitate *in vitro* prin test de contact

Biocompatibilitatea matricelor porcine decelularizate a fost testată prin popularea suprafeței luminale cu celule endoteliale GFP-marcate. În toate cazurile matricele decelularizate au susținut atașarea celulelor, un strat confluent fiind observat după 5 zile de

cultivare (figura 9); nu s-au observat diferențe aparente între probele experimentale și grupul de control. După 6 zile, analiza viu/mort a arătat prezența celulelor vii distribuite uniform pe suprafața studiată cu câteva celule moarte în eșantion.

Rezultatele au indicat că țesuturile tratate nu conțin detergenți reziduali sau alte componente dăunătoare care ar afecta supraviețuirea celulelor. În concluzie, protocolul actual cu componente specifice poate fi considerat eligibil pentru evaluarea ulterioară *in vivo* a biocompatibilității probelor [38].

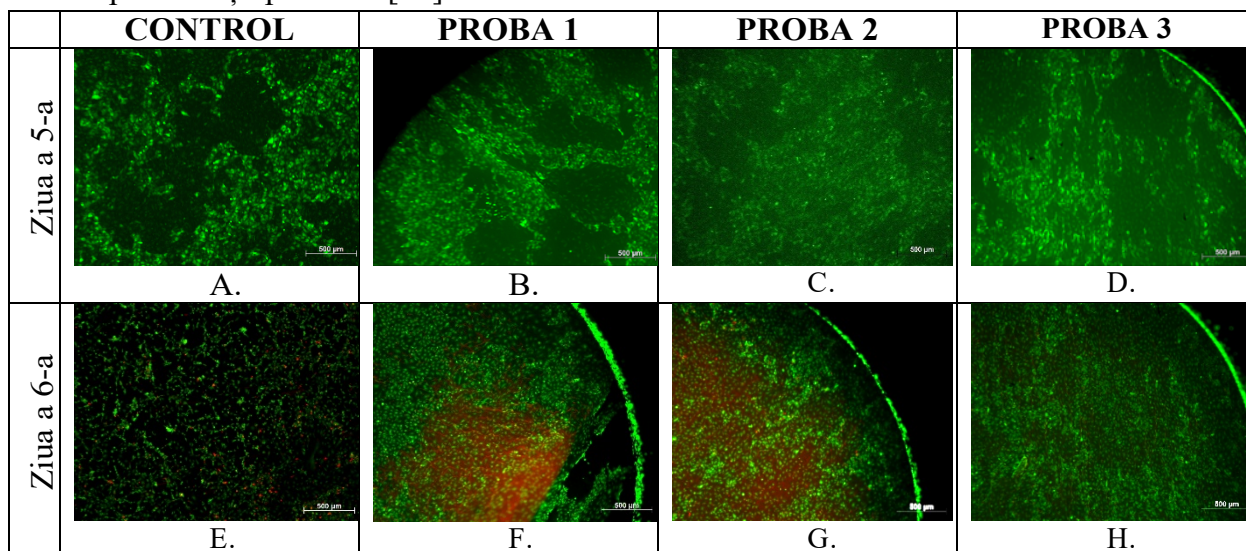


Figura 9. **Repopularea vaselor decelularizate cu celule endoteliale.** 200000 de celule per godeu populate pe suprafața luminală a matricei sau a recipientului de cultură din plastic ca martor. Imaginile au fost realizate cu un stereomicroscop la a 5-a și a 6-a zi după însămânțare. Toate probele experimentale au susținut atașarea celulelor endoteliale, un strat confluent a fost observat după 5 zile de cultivare (B-D). Testul viu/mort a arătat prezența celulelor vii distribuite uniform pe suprafața vasului decelularizat, în timp ce doar câteva celule moarte au fost observate (F-G). Grup martor (A, E). Artera carotidă decelularizată (PROBA 1 – B, F. PROBA 2 – C, G. PROBA 3 – D, H).

### CONCLUZII GENERALE

1. Metodele asistate cu ultrasunet nu par a fi strategic eficiente pentru îndepărtarea celulelor din țesutul vascular;
2. Undele ultrasonore de mare amplitudine sunt inadecvate pentru decelularizarea țesutului vascular din cauza efectelor sale nocive asupra matricei;
3. Vasele sanguine cu diametru mare necesită un timp de procesare mai lung decât cele cu diametru mic și, prin urmare, nu poate fi recomandat un protocol comun de decelularizare;
4. Abordarea chimico-enzimatică descrisă este un instrument eficient în dezvoltarea scheletelor vasculare acelulare; doar tratamentul chimic nu poate permite eliminarea completă a celulelor;
5. Abordarea chimico-enzimatică reprezentată poate fi aplicată atât pentru țesutul vascular proaspăt, cât și pentru țesutul vascular congelat-dezghetat;
6. H&E nu este un instrument calitativ eficient pentru confirmarea eliminării componentelor celulare;
7. Caracterizarea complexă (teste morfologice, biochimice și biomecanice) a schelei

decelularizate este obligatorie pentru a putea prezice performanța *in vivo* a grefelor vasculare obținute prin inginerie tisulară;

8. Decelularizarea prin perfuzie este un instrument eficient pentru decelularizarea uniformă a segmentelor lungi de vase sanguine.

#### **RECOMANDĂRI PRACTICE**

1. O caracterizare la scară largă a tehnicilor de decelularizare asistată de sonicare necesită testarea experimentală a altor metode de sonicare directe și indirecte existente;
2. Lipsa reducerii ADN-ului atunci când se aplică Triton X-100 sau soluție hipotonă în combinație cu ultrasunete sugerează necesitatea utilizării sonicării cu substanțe chimice mai puternice, cum ar fi dodecil sulfat de sodiu sau deoxicolat de sodiu, pentru decelularizarea vaselor sanguine;
3. Artera carotidă porcină este un model optim de testare pentru evaluarea eficienței protocoalelor de decelularizare și pentru dezvoltarea vaselor sanguine de diametru mic, obținute prin inginerie tisulară;
4. Detergenții nu permit eliminarea componentelor celulare de pe matrice și ar trebui să fie suplimentați cu un tratament enzimatic pentru eliminarea ADN-ului;
5. Colorația H&E nu poate fi utilizată ca dovadă unică a DC și ar trebui să fie completată, cel puțin, cu o colorație ADN, cum ar fi DAPI;
6. Etapele multiple de spălare și tratamentul cu Triton X-100 reprezintă un instrument optim pentru a spăla resturile de SDS din matrice.

#### **LIMITĂRI ALE STUDIULUI**

1. Este necesară o analiză histologică mai amănunțită; colorația tricromului Masson și colorarea cu roșu picrosirius pot dezvălui morfologia colagenului și a elastinei;
2. Testul de retenție a suturii nu este suficient pentru evaluarea mecanică a schelei, testele mecanice uniaxiale și biaxiale ar fi mai informative cu privire la comportamentul țesutului. Totodată, comportamentul după recelularizare ar fi un studiu interesant;
3. În cazul în care testele de biocompatibilitate *in vitro* au avut rezultate bune, testarea pe animale ar putea fi ultimul test important;
4. Testarea diferitor niveluri de proteine matriceale și celulare, precum și a antigenelor cunoscute și necunoscute, ar permite o mai bună înțelegere a potențialului imunologic al acestor grefe.

#### **BIBLIOGRAFIE**

1. Ratcliffe A. Tissue engineering of vascular grafts. *Matrix Biol.* 2010;19(4):353-357.
2. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine* [Internet]. 2006;3(11):e442.
3. Sontheimer DL. Peripheral Vascular Disease: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician.* 2006;73(11):1971-1976.
4. World Health Organization [Internet]. Cardiovascular diseases (CVDs). Key facts; 2017 May 17 [2018 Mar 23]. Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
5. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Baha MJ, et al. Executive summary: Heart disease and stroke statistics-2014 update: A Report from the American Heart Association. *Circulation.* 2014;129(3):399-410.
6. Head SJ, Davierwala PM, Serruys PW, Redwood SR, Colombo A, Mack MJ, et al. Coronary artery bypass grafting vs. percutaneous coronary intervention for patients with three-vessel disease: Final five-year follow-up of the SYNTAX trial. *Eur Heart J.*



2014;35(40):2821-2830.

7. Simsa R, Vila XM, Salzer E, Teuschl A, Jenndahl L, Bergh N, et al. Effect of fluid dynamics on decellularization efficacy and mechanical properties of blood vessels. PLoSOne. 2019;14(8):1-14.
8. Kuna VK, Xu B, Sumitran-Holgersson S. Decellularization and recellularization methodology for human saphenous veins. J Vis Exp [Internet]. 2018;137:57803.
9. Hasan A, Memicc A, Annabia N, Hossain M, Paul A, Dokmeci MR, et al. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. Acta Biomater. 2014;10(1):11-25.
10. Pellegata AF, Asnaghi MA, Stefani I, Maestroni A, Maestroni S, Dominioni T, et al. Detergent-enzymatic decellularization of swine blood vessels: insight on mechanical properties for vascular tissue engineering. BioMed Res Int. 2013;2013:918753.
11. Abdulhannan P, Russell DA, Homer-Vanniasinkam S. Peripheral arterial disease: A literature review. Br Med Bull. 2012;104(1):21-39.
12. Salacinski HJ, Goldner S, Giudiceandrea A, Hamilton G, Seifalian AM, Edwards A, et al. The mechanical behavior of vascular grafts: A review. J Biomater Appl. 2001;15(3):241-278.
13. Niklason L. Bioengineered human acellular vessels as dialysis access grafts. Supplement: Experimental Biology 2020 Meeting Abstracts. 2020;34(S1):1.
14. Chandra P, Atala A. Engineering blood vessels and vascularized tissues: Technology trends and potential clinical applications. Clin Sci. 2019;133(9):1115-1135.
15. Chlupác J, Filová E, Bačáková L. Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. Physiol Res. 2009;58(SUPPL.2):S119-S140.
16. Catto V, Farè S, Freddi G, Tanzi MC. Vascular tissue engineering: recent advances in small diameter blood vessel regeneration. Int Sch Res Notices. 2014;2014(ID923030):27.
17. Vorotnikova E, McIntosh D, Dewilde A, Zhang J, Reing JE, Zhang L, et al. Extracellularmatrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. Matrix Biol 2010;29:690-700.
18. Starnecker F, König F, Hagl C, Thierfelder N. Tissue-engineering acellular scaffolds - The significant influence of physical and procedural decellularization factors. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2018;106(1):153–162.
19. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. Acta Biomaterialia. 2009;5(1):1-13.
20. Li S, Henry JJ. Nonthrombogenic approaches to cardiovascular bioengineering. Annu Rev Biomed Eng. 2011;13(1):451-475.
21. Simsa R, Padma AM, Heher P, Hellström M, Teuschl A, Jenndahl L, et al. Systematic *in vitro* comparison of decellularization protocols for blood vessels. PLoS ONE. 2018;13(12):1-19.
22. Koenig F, Kilzer M, Hagl C, Thierfelder N. Successful decellularization of thick-walled tissue: Highlighting pitfalls and the need for a multifactorial approach. Int J Artif Organs.2019;42(1):17-24.
23. Sierad LN, Shaw EL, Bina A, Brazile B, Rierson N, Patnaik SS, et al. Functional heart valve scaffolds obtained by complete decellularization of porcine aortic roots in a novel differential pressure gradient perfusion system. Tissue Eng Part C Methods. 2015;21:1284-1296.
24. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ

- decellularization process. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233-3243.
25. Quint C, Kondo Y, Manson RJ, Lawson JH, Dardik A, Niklason LE. Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(22):9214-9219.
  26. Chircov C. Tissue engineered vascular grafts. *Biomaterials and Tissue engineering Bulletin*. 2018;5(3-4):110-118.
  27. Wang X, Chan V, Corridon PR. Decellularized blood vessel development: Current state-of-the-art and future directions. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:951644.
  28. Pashneh-Tala S, MacNeil S, Claeysens F. The tissue-engineered vascular graft - Past, present, and future. *Tissue Eng Part B Rev*. 2016;22(1):68–100.
  29. Benrashid E, McCoy CC, Youngwirth LM, Kim J, Manson RJ, Otto JC, et al. Tissue engineered vascular grafts: Origins, development, and current strategies for clinical application. *Methods*. 2016;99:13-19.
  30. Toumpaniari S, Hilfiker A, Haverich A, Korossis S. Decellularized vascular grafts. In: Walpoth BH, Bergmeister H, Bowlin GL, Kong D, Rotmans JI, Zilla P. (eds) *Tissue-Engineered Vascular Grafts*. Reference Series in Biomedical Engineering. Springer, Cham. 2020.
  31. Xu Y, Yan M, Gong Y, Chen L, Zhao F, Zhang Z, et al. Response of endothelial cells to decellularized extracellular matrix deposited by bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7:4997-5003.
  32. **Malcova T, Nacu V, Rojnoveanu Gh, Andrée B, Hilfiker A.** Decelularizarea de success a aortei porcine pentru generarea scaffoldului acelular necesar în obținerea grefelor vasculare ingineresti. Abstract Book. Conferința Științifică Anuală. Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță. 2021;250.
  33. **Malcova T, Nacu V, Rojnoveanu Gh, Andrée B, Hilfiker A.** Protocolul de decelularizare a vaselor sanguine este dependent de diametrul acestora. *Chirurgia (Bucur)*. 2021;116(Suppl.1):118-119.
  34. **Malcova T, Nacu V, Rojnoveanu Gh, Andrée B, Hilfiker A.** Evaluation of ultrasound application for the decellularization of small caliber vessels. Springer, Cham, 5<sup>th</sup> International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2021. IFMBE Proceedings. 2021;87:350-357.
  35. **Malcova T, Nacu V, Rojnoveanu Gh, Andrée B, Hilfiker A.** Qualitative evaluation of detergent-enzymatic decellularized small-caliber blood vessels. Abstract Book. MedEspera 2022: 9<sup>th</sup> International Medical Congress for Students and Young Doctors. 2020:437.
  36. **Malcova T, Rojnoveanu Gh, Ciubotaru A, Andrée B, Hilfiker A.** Cuantificarea AND și a proteinelor matricei extracelulare: instrument util în caracterizarea vaselor sanguine decelularizate. *Chirurgia (Bucur)*. 2023;118(Suppl.1):163-164.
  37. **Malcova T, Rojnoveanu Gh, Ciubotaru A, Nacu V.** Mechanical characterization of decellularized blood vessels: a valuable tool to provide comprehensive information about the scaffold. In: Sontea V, Tiginyanu I, Railean S (eds). Springer, Cham, 6<sup>th</sup> International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2023. IFMBE Proceedings. 2024;91(Volume 1):386-396.
  38. **Malcova T, Nacu V, Ciubotaru A, Rojnoveanu Gh.** Biocompatibilitatea țesutului vascular decelularizat: model *in vitro* pentru testarea grefelor obținute prin metode ingineresti. *Jurnalul de Chirurgie*. 2023;19(2):143-149.

## LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI PARTICIPĂRILOR LA FORUMURI ȘTIINȚIFICE

a dnei Malcova Tatiana, Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare,  
Catedra de anatomie și anatomie clinică, realizate la teza de doctor în științe medicale,  
cu tema „Modificările morfologice și biomecanice în decelularizarea vaselor sanguine”  
(Morphological and biomechanical modifications in blood vessels decellularization),  
341.01 Inginerie tisulară și culturi celulare

### I. Articole în reviste științifice

#### • Articole în reviste științifice peste hotare:

1. **Malcova T.**, Nacu V., Ciubotaru A., Rojnovceanu Gh. Biocompatibilitatea țesutului vascular decelularizat: model *in vitro* pentru testarea grefelor obținute prin metode ingineresti. În: *Jurnalul de Chirurgie*. 2023; 19(2): pp. 143-149. ISSN: 1584-9341 (Online).

#### • Articole în revistele științifice naționale acreditate:

##### ✓ articole în reviste de categoria B +

2. **Malcova T.**, Băluțel T., Ciubotaru A., Nacu V. Tissue engineering of heart valves- challenges and opportunities. În: *The Moldovan Medical Journal*. 2019; 62(4): pp. 49-55. ISSN: 2537-6373 (Print) / ISSN: 2537-6381 (Online).

3. Vișnevschi S., **Malcova T.**, Calistru A., Nacu V. Stem-cell therapies in critical limb ischemia. În: *The Moldovan Medical Journal*. 2021; 64(1): pp. 63-67. ISSN: 2537-6373 (Print) / ISSN: 2537-6381 (Online).

##### ✓ Articole în reviste de categoria B

4. **Malcova T.**, Cirimpei D., Cirimpei O., Nacu V. Tehnologii de cultivare *in vitro* a fibroblastelor din piele pentru tratamentul pacienților cu ulcere cronice. În: *Curierul Medical*. 2016; 59(3): pp. 74-81. ISSN: 2537-6373.

5. Popescu V., Jian M., **Malcova T.** Procedures for in situ monitoring of gene methylation in cancer prediction (literature review). În: *Revista de Știință, Inovare, Cultură și Artă „Akademos”*. 2021; 61(2), pp. 89-95. ISSN: 1857-0461 / E-ISSN: 2587-3687.

6. **Malcova T.** Tissue-engineered small-diameter vascular grafts: background and new technology trends. În: *Arta Medica*. 2023, 87(2): pp. 93-95. ISSN: 1810-1852.

#### • Articole în culegeri științifice internaționale:

##### ✓ În lucrările conferințelor științifice internaționale desfășurate în Republica Moldova (incluse în bazele de date Web of Science și SCOPUS):

7. **Malcova T.**, Globa L., Vascan A., Țugui E., Stoian A., Nacu V. Mechanical and morphological characterization of decellularized umbilical vessels as tissue engineering scaffolds. În: Tiginyanu I., Sontea V., Railean S. (eds). *Springer, Cham, 4<sup>th</sup> International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2019. IFMBE Proceedings*. 2020; 77: pp. 589-593. ISSN: 1680-0737 / ISSN: 1433-9277 (electronic). ISBN 978-3-030-31865-9 ISBN 978-3-030-31866-6 (eBook). DOI: 10.1007/978-3-030-31866-6 (**SJR: 0.155, SCOPUS**).

8. **Malcova T.**, Nacu V., Rojnovceanu Gh., Andrée B., Hilfiker A. Evaluation of ultrasound application for the decellularization of small caliber vessels. În: Tiginyanu I., Sontea V., Railean S. (eds). *Springer, Cham, 5<sup>th</sup> International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2021. IFMBE Proceedings*. 2022; 87: pp. 350-357. ISSN: 1680-0737 / ISSN: 1433-9277 (electronic). ISBN 978-3-030-92327-3. ISBN 978-3-030-92328-0 (eBook). DOI: 10.1007/978-3-030-92328-0\_46 (**SJR: 0.155, SCOPUS**).

9. **Malcova T.**, Rojnovceanu Gh., Ciubotaru A., Nacu V. Mechanical characterization of decellularized blood vessels: a valuable tool to provide comprehensive information about the

scaffold. În: Sontea V., Tiginyanu I., Railean S. (eds). *Springer, Cham, 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2023. IFMBE Proceedings*. 2024; 91(Volume 1): pp. 386-396. ISSN: 1680-0737 / ISSN: 1433-9277 (electronic). ISBN 978-3-031-42774-9. ISBN 978-3-031-42775-6 (eBook). DOI:/10.1007/978-3-031-42775-6\_42 (SJR: 0.155, SCOPUS).

## II. Teze în lucrările conferințelor științifice:

### ✓ internaționale desfășurate peste hotare

10. **Malcova T.**, Băluțel T., Popescu V., Nacu V. Characterization of decellularized porcine aorta as tissue engineering scaffolds for vascular application. *Timișoara Anatomical Days. În: Abstract Book. Research and Clinical Medicine*. Timișoara, România: 2019; 3 (1), p. 49. ISSN: 2360-1124.

11. **Malcova T.**, Globa L., Vascan A., Țugui E., Stoian A., Nacu V. Evaluation of the efficacy of decellularization treatment in preparing decellularized umbilical cord artery. În: *Abstract Book. International molecular medicine symposium*. Istanbul, Turcia: 2019; p. 76.

12. **Malcova T.**, Nacu V., Rojnoveanu Gh., Andrée B., Hilfiker A. Protocolul de decelularare a vaselor sanguine este dependent de diametrul acestora. În: *Chirurgia (Bucur). Conferința Națională de Chirurgie 2021*. Ediție on-line: 2021; 116(Suppl.1), pp. 118-119. ISSN: 1221-9118. ISSN (online): 1842-368X.

13. **Malcova T.**, Rojnoveanu Gh., Ciubotaru A., Andrée B., Hilfiker A. Cuantificarea ADN și a proteinelor matricei extracelulare: instrument util în caracterizarea vaselor sanguine decelularizate. În: *Chirurgia (Bucur). Conferința Națională de Chirurgie 2023*. 2023; 118(Suppl.1), pp. 163-164. ISSN: 1221-9118. ISSN (online): 1842-368X.

### ✓ internaționale desfășurate în Republica Moldova

14. **Malcova T.** Blood vessel decellularization—challenges and perspectives. În: *Abstract Book. MedEspera 2018: 7<sup>th</sup> Intern. Medical Congress for Students and Young Doctors*. Chișinău: 2018; p. 204-205.

15. **Malcova T.**, Băluțel T., Cociug A., Popescu V. Tissue engineered vascular grafts: decellularization of porcine aorta through three different methods. In: *Abstract Book. MedEspera 2020: 8<sup>th</sup> Intern. Medical Congress for Students and Young Doctors*. Chișinău: 2020; p. 101.

16. **Malcova T.**, Nacu V., Rojnoveanu Gh., Andrée B., Hilfiker A. Qualitative evaluation of detergent-enzymatic decellularized small-caliber blood vessels. În: *Abstract Book. MedEspera 2022: 9<sup>th</sup> Intern. Medical Congress for Students and Young Doctors*. Chișinău: 2022; p. 437.

### ✓ naționale

17. **Malcova T.**, Băluțel T., Globa T., Popescu V. Eficiența comparativă a procedurilor de decelularizare cu detergenți a grefelor vasculare. În: *Abstract Book. Congresul Consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău: 2020; p. 422.

18. Pavlovschi E., Stoian A., **Malcova T.**, Iordachescu R., Verega G., Nacu V. Decelularizarea combinată a alogrefei osoase vascularizate. Etapă de studiu experimental in vivo. În: *Abstract Book. Congresul Consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău: 2020; p. 519.

19. Stoian A., Nacu V., Pavlovschi E., Macagonova O., **Malcova T.**, Mihaluța V. Perspectiva de viitor a alotransplantului osos vascularizat. În: *Abstract Book. Congresul Consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău: 2020; p. 525.

20. **Malcova T.**, Nacu V., Rojnoveanu Gh., Andrée B., Hilfiker A. Decelularizarea de succes a aortei porcine pentru generarea scaffoldului acelular necesar în obținerea grefelor vasculare

ingineresti. În: *Abstract Book. Conferința Științifică Anuală. Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță*. Chișinău: 2021; p. 250.

### **III. Brevete de invenții, patente, certificate de înregistrare, materiale la saloanele de invenții:**

21. **Malcova T.**, Nacu V. Procedeu de decelularizare a vaselor sanguine de calibrul mic. Certificat de Inovator Nr. 5937, 12.08.2022.

22. **Malcova T.**, Nacu V. Procedeu de decelularizare a vaselor sanguine de calibrul mic. Act de implementare nr. 60, 20.03.2023.

23. **Malcova T.**, Rojnovceanu Gh., Ciubotaru A., Nacu V. *In vitro* model of biocompatibility evaluation: a new approach for testing the decellularized vascular scaffolds. Diploma GOLD MEDAL. EUROINVENT: 15<sup>th</sup> European Exhibition Of Creativity And Innovation. Special Award For The Invention. Titu Maiorescu University Of Bucharest. Certificate of Recognition. Innovation Award for Promoting Science and Technology at Euroinvent 2023. Iași, România. 11.05.-13.05.2023.

24. **Malcova T.**, Jian M., Cobzac V., Mostovei A., Bujor M., Nacu V. New methods in tissue engineering: decellularization of small-caliber blood vessels and collagen concentration. DIPLOMA of GOLD MEDAL. 2<sup>nd</sup> edition of the International Exhibition of Innovation and Technology Transfer EXCELLENT IDEA – 2023. Chișinău. 19.09.-21.09.2023.

### **IV. Participări cu comunicări la forumuri științifice:**

#### ✓ **internaționale**

25. **Malcova T.**, Globa L., Vascan A., Țugui E., Stoian A., Nacu V. Evaluation of the efficacy of decellularization treatment in preparing decellularized umbilical cord artery. The 4<sup>th</sup> International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering – ICNBME-2019. Chișinău, 18-21 septembrie 2019.

26. **Malcova T.**, Băluțel T., Cociug A., Popescu V. Tissue engineered vascular grafts: decellularization of porcine aorta through three different methods. The 8<sup>th</sup> MedEspera International Congress for Students and Young Doctors. Chișinău, 24-26 septembrie 2020. (DIPLOMA 1<sup>st</sup> Place Award Certification)

27. **Malcova T.**, Nacu V., Rojnovceanu Gh., Andrée B., Hilfiker A. Protocolul de decelularizare a vaselor sanguine este dependent de diametrul acestora. Conferința Națională de Chirurgie. Ediția online, România, 9-12 iunie 2021.

28. **Malcova T.**, Nacu V., Rojnovceanu Gh., Andrée B., Hilfiker A. Evaluation of ultrasound application for the decellularization of small caliber vessels. The 5<sup>th</sup> International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering – ICNBME-2021. Ediția online, Chișinău, 3-5 noiembrie 2021.

29. **Malcova T.**, Nacu V., Rojnovceanu Gh., Andrée B., Hilfiker A. Qualitative evaluation of detergent-enzymatic decellularized small-caliber blood vessels. The 9<sup>th</sup> International Medical Congress for Students and Young Doctors, MedEspera. Chișinău, 12-14 mai 2022. (DIPLOMA 1<sup>st</sup> Place Award Certification)

30. **Malcova T.**, Rojnovceanu Gh., Ciubotaru A., Nacu V. Mechanical characterization of decellularized blood vessels: a valuable tool to provide comprehensive information about the scaffold. 6<sup>th</sup> International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering – ICNBME 2023. Chișinău, 20-23 septembrie 2023. (Certificate of achievement 1<sup>st</sup> place in YOUNG INVESTIGATORS COMPETITION)

#### ✓ **naționale**

31. **Malcova T.** Lecție publică „Grefele vasculare decelularizate obținute prin inginerie tisulară vor fi un standard de tratament în viitor?”. MoldMedizin & MoldDent. Chișinău, 11-13 septembrie 2019.

32. **Malcova T.** Lecție publică „Inginerie tisulară și Medicină regenerativă: provocări și realizări”. Ziua Internațională a Științei. Chișinău, 09 noiembrie 2019.

33. **Malcova T.,** Nacu V., Rojnovceanu Gh., Andrée B., Hilfiker A. Decelularizarea de succes a aortei porcine pentru generarea scaffoldului acelular necesar în obținerea grefelor vasculare ingineresti. Conferința Științifică Anuală. Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță. Ediția online, Chișinău, 20-22 octombrie 2021.

34. **Malcova T.** Decelularizarea vaselor sanguine. Curs educațional „Medicina regenerativă și nanomedicina”. Conferința Științifică Anuală Cercetarea în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță. Chișinău, 19-21 octombrie 2022.

#### **V. Participări cu postere la forumuri științifice:**

##### **✓ internaționale**

35. **Malcova T.,** Globa L., Vascan A., Țugui E., Stoian A., Nacu V. Evaluation of the efficacy of decellularization treatment in preparing decellularized umbilical cord artery. International Molecular Medicine Symposium by the Bosphorus. Istanbul, Turcia, 16-18 mai 2019.

(Certificate of AWARD – Best Poster Presentation AWARD in Third Place)

36. **Malcova T.,** Băluțel T., Popescu V., Nacu V. Characterization of decellularized porcine aorta as tissue engineering scaffolds for vascular application. Timișoara Anatomical Days. Simpozionul „Zilele Anatomice Timișorene”, ediția I, cu participare internațională. Timișoara, România, 6-7 decembrie 2019.

37. **Malcova T.,** Rojnovceanu Gh., Ciubotaru A., Andree B., Hilfiker A. Cuantificarea ADN și a proteinelor matricei extracelulare: instrument util în caracterizarea vaselor sanguine decelularizate. Conferința Națională de Chirurgie 2023. Eforie Nord, România, 24-27 mai 2023.

##### **✓ naționale**

38. Pavlovschi E., Stoian A., **Malcova T.,** Iordachescu R., Verega G., Nacu V. Decelularizarea combinată a alogrefei osoase vascularizate. Etapă de studiu experimental *in vivo*. Congresul Consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”. Ediția online, Chișinău, 21-23 octombrie 2020.

39. Stoian A., Nacu V., Pavlovschi E., Macagonova O., **Malcova T.,** Mihaluța V. Perspectiva de viitor a alotransplantului osos vascularizat. În: Abstract Book. Congresul Consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”. Ediția online, Chișinău, 21-23 octombrie 2020.

40. **Malcova T.,** Băluțel T., Cociug A., Popescu V. Tissue-engineered vascular grafts: decellularization of porcine aorta through three different methods. Congresul consacrat aniversării a 75 ani de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”. Ediția online, Chișinău, 21-23 octombrie 2020.

(Laureat al Concursului „Performanțe în cercetare” pentru ciclul de lucrări în domeniul Chirurgiei generale, Ingineriei tisulare și culturilor celulare)

#### **VI. Participări la emisiuni media / proiecte consacrate științei și educației, inovării și transferului tehnologic:**

41. **Malcova T.** Ambasador-trainer al științei, Domeniul de activitate – Inginerie tisulară și culturi celulare, Chirurgie. Grant Agreement nr. 101060678, proiect „Green Science to the Service of Healthy Society” (GreenSCI), program HORIZON EUROPE (01.04.2022-30.11.2023).

(Diploma de Onoare a Academiei de Științe a Moldovei)

## VII. Stagiare peste hotare, burse:

42. Program de schimb la University of Chester, or. Chester, Marea Britanie, în cadrul European Union's Erasmus+ programme International Credit Mobility (agreement number: 2016-1-UK01-KA107-024078), 15 ianuarie 2018 – 15 iunie 2018.
43. Program de schimb la Hannover Medical School, or. Hanovra, Germania, în cadrul proiectul Orizont2020 NanoMedTwin „Promoting smart specialization at the Technical University of Moldova by developing the field of Novel Nanomaterials for BioMedical Applications through excellence in research and twinning” (Grant agreement ID: 810652), 01 septembrie 2020 – 28 februarie 2021.
44. Program de Burse oferit de Federația Mondială a Savanților pentru doctoranzi și tineri cercetători din Republica Moldova, Chișinău, 01 iunie 2023 – 31 mai 2024.

## VIII. Cursuri educaționale la tema tezei:

45. Autumn School on Nano-Bioengineering 2019. Chișinău, 14-17 septembrie 2019.
46. Advanced Training Course on Nanotechnologies and Biomedical Engineering organised in the framework of the Horizon2020 project „NanoMedTwin”. Chișinău, 19 Octombrie 2019 – 16 Mai 2020.
47. Training Course on Intellectual Property Protection and Technology Transfer in the framework of the Horizon2020 project „NanoMedTwin”. Chișinău, 01 octombrie – 19 decembrie 2020.
48. Școala de vară „Nanotehnologii și biomedicină în contextul provocărilor secolului XXI”. Ediția online, Chișinău, 5-13 iunie 2021.
49. Workshop of Polymerase Chain Reaction and Cell Culture, Bahçeşehir University Faculty of Medicine. Istanbul, Turcia, 16 mai 2019.

## ANNOTATION

Malcova Tatiana „**Morphological and biomechanical modifications in blood vessels decellularization**”. The thesis for the degree of PhD in medical sciences, Chisinau, 2023.

**Structure of the thesis.** The thesis includes annotations in Romanian, Russian and English, list of abbreviations, 48 figures, 6 tables, introduction, 4 chapters with general conclusions, practical recommendations, and study limitations. The paper is followed by the list of bibliographic references with 287 sources, author's disclaimer, and author's CV. The principal results of the study were published in 20 scientific papers.

**Keywords:** Cardiovascular diseases, peripheral arterial disease, bypass surgery, vascular graft, tissue engineering, tissue engineered vascular graft, decellularization, detergent, enzymatic treatment, sonication.

**The aim of study.** To develop new methods for decellularization of large- and small-diameter blood vessels.

**Objectives of the study.** (1) To evaluate the efficiency of sonication-assisted methods for decellularization of arterial vessels; (2) To test the effect of acoustic amplitude on the vascular matrix; (3) To evaluate the effectiveness of chemical (SDS, SDC, Triton X-100, hypotonic solution) and enzymatic (DNase-I) treatment in vascular tissue decellularization; (4) To evaluate whether the decellularization protocol efficiency is depending on the vessel diameter; (5) To check the informativeness of qualitative methods (H&E and DAPI) for confirmation of the decellularization process; (6) To do morphological, biochemical, and biomechanical characterization of treated blood vessels; (7) To assess the biocompatibility of acellular scaffold by performing *in vitro* contact test; (8) To determine the efficiency of perfusion

decellularization for uniform cells' elimination from long segments of blood vessels.

**Scientific originality and novelty.** Conducting the experimental study with comparison and multilateral characterization of decellularization efficiency of different decellularization approaches in term of cells' elimination and matrix strength preservation contributed to the completion of some gaps in the current scientific literature.

**The scientific problem solved in the thesis** consists in identifying the factors associated with efficient cells' removal and establishing a novel procedure for blood vessels decellularization and optimal characterization of acellular scaffold's structure, a fact that will allow the modification of the experimental paradigm through the scientifically reasoned selection of the optimal experimental conditions.

**Theoretical significance and applicative value.** Decellularization efficiency of different chemicals was specified; in addition, the indispensability of the enzymatic treatment in combination with strong detergents for acellular vascular scaffolds production was demonstrated. The data obtained during the research scientifically argue for the modification of the current research strategy through the preferential use of carotid artery *vs* aorta as testing model for development of small-diameter tissue-engineered vascular grafts. The failed attempt to use the ultrasound for vascular tissue DC defines the necessity to perform additional studies regarding the mechanism of ultrasound-induced cellular destruction.

**The practical impact of the present study** consists in implementation of a novel technique of blood vessels decellularization in the Laboratory of Tissue Engineering and Cell Culture, *Nicolae Testemitanu* State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova.

#### ADNOTARE

Malcova Tatiana „**Modificările morfologice și biomecanice în decelularizarea vaselor sanguine**”. Teza pentru obținerea titlului de doctor în științe medicale, Chișinău, 2023.

**Structura tezei.** Teza include adnotările în limbile engleză, română și rusă, lista abrevierilor, 48 de figuri, 6 tabele, introducere, 4 capitole cu concluzii generale, recomandări practice și limitări ale studiului. Lucrarea este urmată de lista de referințe bibliografice cu 287 de surse, declarația autorului și CV-ul autorului. Principalele rezultate ale studiului au fost publicate în 20 de lucrări științifice.

**Cuvinte-cheie:** boli cardiovasculare, boala arterială periferică, chirurgie bypass, grefă vasculară, inginerie tisulară, grefă vasculară obținută prin inginerie tisulară, decelularizare, detergent, tratament enzimatic, ultrasunet.

**Scopul studiului.** Dezvoltarea unor tehnici noi de decelularizare a vaselor sanguine de calibru mare și mic.

**Obiectivele studiului.** (1) Evaluarea eficienței metodelor asistate de sonicare în decelularizarea vaselor arterelor; (2) Testarea efectului amplitudinii acustice asupra matricei vasculare; (3) Determinarea eficacității tratamentului chimic (SDS, SDC, Triton X-100, soluție hipotonică) și enzimatic (DNază-I) în decelularizarea țesutului vascular; (4) Evaluarea eficienței protocolului de decelularizare în funcție de diametrul vasului; (5) Aprecierea informativității metodelor calitative (H&E și DAPI) pentru confirmarea procesului de decelularizare; (6) Caracterizarea morfologică, biochimică și biomecanică a vaselor sanguine prelucrate; (7) Testarea biocompatibilității matricei acelulare prin efectuarea testului de contact *in vitro*; (8) Determinarea eficienței decelularizării prin perfuzie pentru eliminarea uniformă a celulelor din segmentele lungi ale vaselor sanguine.

**Originalitatea și noutatea științifică.** Realizarea studiului experimental cu compararea și



caracterizarea multilaterală a eficienței diferitor tehnici de decelularizare în ceea ce privește eliminarea celulelor și păstrarea rezistenței matricei pentru completarea unor lacune din literatura științifică actuală.

**Problema științifică rezolvată în teză** constă în: identificarea factorilor asociați cu îndepărtarea eficientă a celulelor din matrice și stabilirea unei proceduri noi de decelularizare a vaselor sanguine de calibru mic, și caracterizarea optimă a structurii acelulare, fapt care va permite modificarea paradigmei experimentale prin selectarea rațională din punct de vedere științific a condițiilor experimentale optime.

**Semnificația teoretică și valoarea aplicativă.** A fost specificată eficiența de decelularizare a diferitor substanțe chimice; în plus, a fost demonstrat caracterul indispensabil al tratamentului enzimatic în combinație cu detergenți puternici pentru producerea matricei vasculare acelulare. Datele obținute argumentează științific modificarea strategiei actuale de cercetare prin utilizarea preferențială a arterei carotide față de aortă ca model de testare pentru dezvoltarea grefelor vasculare de diametru mic prin inginerie tisulară. Încercarea eșuată de a utiliza ultrasunetul pentru decelularizarea țesutului vascular definește necesitatea de a efectua studii suplimentare privind mecanismul de distrugere celulară indusă de undele sonore.

**Impactul practic al prezentului studiu** constă în implementarea unei tehnici noi de decelularizare a vaselor sanguine în cadrul Laboratorului de inginerie tisulară și culturi celulare, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.

## АННОТАЦИЯ

Малкова Татьяна «**Морфологические и биомеханические модификации при децеллюляризации кровеносных сосудов**». Диссертация на соискание степени кандидата медицинских наук, Кишинев, 2023.

**Структура диссертации.** Диссертация включает аннотации на румынском, русском и английском языках, список сокращений, 48 рисунков, 6 таблиц, введение, 4 главы с общими выводами, практические рекомендации и ограничения исследования, список из 287 библиографических источников, авторскую декларацию и резюме. Основные результаты исследования опубликованы в 20 научных работах.

**Ключевые слова:** сердечно-сосудистые заболевания, заболевания периферических артерий, шунтирование, сосудистый трансплантат, тканевая инженерия, сосудистый трансплантат полученный тканевой инженерией, децеллюляризация, детергент, ферментативная обработка, ультразвук.

**Цель исследования.** Развить новые техники децеллюляризации кровеносных сосудов большого и малого калибра.

**Задачи исследования.** (1) Оценить эффективность методов децеллюляризации сонной артерии свиньи с помощью ультразвука; (2) Проверить влияние акустической амплитуды на сосудистый матрикс; (3) Оценить эффективность химического (ДСН, ДДК, Тритон X-100, гипотонический раствор) и ферментативного (ДНКазы-I) лечения при децеллюляризации сосудистой ткани; (4) Оценить эффективность протокола децеллюляризации в зависимости от диаметра сосуда; (5) Проверить информативность качественных методов (H&E и DAPI) для подтверждения процесса децеллюляризации; (6) Провести морфологическую, биохимическую и биомеханическую характеристику обработанных кровеносных сосудов; (7) Оценить биосовместимость бесклеточного каркаса путем проведения контактного теста *in vitro*; (8) Определить эффективность перфузионной децеллюляризации для однородного удаления клеток из длинных сегментов кровеносных сосудов.

**Научная оригинальность и новизна.** Проведение экспериментального исследования со сравнением и многосторонней характеристикой эффективности различных методов децеллюляризации с точки зрения удаления клеток и сохранения прочности матрикса.

**Научная проблема, решаемая в диссертации,** заключается в выявлении факторов, связанных с эффективным удалением клеток, и создании новой процедуры децеллюляризации кровеносных сосудов и оптимальной характеристики структуры ацеллюлярного матрикса, что позволит модифицировать экспериментальную парадигму путем научно обоснованного выбора оптимальных условий эксперимента.

**Теоретическая значимость и прикладное значение.** Уточнена эффективность децеллюляризации различными химическими веществами; продемонстрирована незаменимость ферментативной обработки в сочетании с сильными детергентами для производства сосудистого ацеллюлярного матрикса. Неудачная попытка использования ультразвука определяет необходимость проведения дополнительных исследований относительно механизма разрушения клеток, индуцированного ультразвуком.

**Практическая значимость настоящего исследования** заключается во внедрении новой методики децеллюляризации кровеносных сосудов в Лаборатории Тканевой Инженерии и Культуры клеток Государственного Университета Медицины и Фармации им. Николае Тестемицану, Кишинев, Республика Молдова.